



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD - GANADERÍA

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN
CON BIOMASA DE DOS CULTIVARES DE *Cenchrus purpureus*
(Schumach.) MORRONE**

JOEL VENTURA RÍOS

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **Producción de bioetanol de segunda generación con biomasa de dos cultivares de *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone**, realizada por el alumno: **Joel Ventura Ríos**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD - GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	Ph. D. Alfonso Hernández Garay
ASESOR	Ph. D. José Amador Honorato Salazar
ASESOR	Ph. D. Jorge Arturo Aburto Anell
ASESOR	Dr. Javier Francisco Enríquez Quíroz
ASESOR	Ph. D. Isaias López Guerrero
ASESOR	Ph. D. Eusebio Ortega Jiménez
ASESOR	Ph. D. Humberto Vaquera Huerta

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio del 2016

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN CON BIOMASA DE DOS CULTIVARES DE *Cenchrus purpureus* (Schumach.) MORRONE

Joel Ventura Ríos, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

En México, los estudios de evaluación de biomasa para el uso industrial de los pastos del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone son limitados. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la composición química; análisis proximal; la hidrólisis ácida y el perfil de carbohidratos; el pretratamiento básico-oxidante; la hidrólisis enzimática y la fermentación; así como la producción de bioetanol vía fermentativa de dos cultivares del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone a diferentes frecuencias de corte. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en un diseño experimental de bloques al azar en parcelas divididas con tres repeticiones, y fueron analizados mediante el procedimiento GLM de SAS y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). Tanto en la composición y caracterización química, como en el análisis proximal, de los cultivares maralfalfa y taiwán hubo diferencias significativas a diferentes frecuencias de corte ($p<0.05$), por lo que con base en los resultados obtenidos se decidió fermentar solo la frecuencia de corte al día 120 para ambos cultivares, obteniendo un rendimiento de 1061 L ha⁻¹ y 1475 L ha⁻¹ de bioetanol, respectivamente. Los resultados obtenidos de los dos cultivares del *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, indican que pueden ser una alternativa bioenergética para la industria de combustibles líquidos en la zona tropical de México.

Palabras clave: *Cenchrus purpureus*, frecuencias de corte, composición química, análisis proximal, hidrólisis, pretratamiento, fermentación, bioetanol.

**BIOETHANOL PRODUCTION OF SECOND GENERATION OF TWO CULTIVARS
BIOMASS *Cenchrus purpureus* (Schumach.) MORRONE**

**Joel Ventura Ríos, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016**

ABSTRACT

In Mexico, the assessing biomass studies for industrial uses of grasses from the genus *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone are limited. The aims of this work were to evaluate the chemical composition; proximate analysis; acid hydrolysis and carbohydrate profile; basic-oxidative pretreatment; enzymatic hydrolysis and fermentation; as well as the fermentative production of bioethanol via two cultivars of the genus *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone to diferentes cutting frequencies. Treatments were distributed in a random block experimental design in divide plots with three replications and were analyzed using the SAS GLM procedure and comparison of means (Tukey, $\alpha = 0.05$). Both in composition and chemical characterization, as in the proximal analysis of maralfalfa and taiwán cultivars there were significant differences at different cutting frequencies ($p < 0.05$), so that based on the results it was decided to ferment only the cutting frequency of 120 days for both cultivars, obtaining a yield of 1061 L ha⁻¹ and 1475 L ha⁻¹ of bioethanol, respectively. The results of the two cultivars of *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, indicate that there may be a bioenergetic alternative to liquid fuels industry in the tropical area of Mexico.

Key words: *Cenchrus purpureus*, cutoff frequencies, chemical composition, proximate analysis, hydrolysis, pretreatment, fermentation, bioethanol.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado durante mi formación doctoral.

Al Colegio de Postgraduados y a la especialidad en ganadería por brindarme la oportunidad de formar parte de su privilegiada comunidad estudiantil.

A mi consejo particular, por su apoyo, comentarios y por compartir sus conocimientos y plasmarlos en cada uno de los escritos que conforman ésta pequeña obra del conocimiento.

Al Ph. D. Alfonso Hernández Garay, por la confianza y compartir sus conocimientos durante mi formación en este Colegio.

Al Dr. Javier F. Enríquez Quiroz y el M.C. Jesús Miguel Calzada Marin, por facilitarnos las muestras de los pastos colectados en campo.

Al Ph. D. José A. Honorato Salazar, por la confianza, por compartir sus conocimientos y por su apoyo incondicional durante la presente investigación. ¡Muchas gracias!

Al Ph. D. Jorge A. Aburto Anell, por darnos la oportunidad de trabajar en este proyecto y darnos toda facilidad en el laboratorio del Instituto Mexicano del Petróleo.

A la Dra. Iliana Barrera Martínez, por el apoyo en el laboratorio y por compartirnos sus conocimientos durante mi estancia en el Instituto Mexicano del Petróleo.

A los Ingenieros, Flora Apolinar Hidalgo, Gertrudis Colotl Hernández y José L. Montiel Rivas, por su valioso apoyo incondicional en el laboratorio de materiales lignocelulosicos y transformación de biomasa.

Al Fondo Sectorial CONACyT - SENER Sustentabilidad Energética a través del Proyecto No. 151370 por el apoyo en los análisis químicos y al laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP en Puebla, Méx.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por las facilidades otorgadas para la realización de los análisis químicos y producción de bioetanol en el laboratorio de transformación de biomasa.

Al equipo de trabajo, científicos en el área de forrajes, amigos todos ellos, por su motivación y por ser grandes personas, por los momentos inolvidables compartidos durante la estadía en esta casa de estudios.

DEDICATORIAS

Con todo cariño y amor para mi esposa Elizabeth, por todo tu esfuerzo y comprensión en todo momento, sin tu ayuda no hubiera sido posible culminar este objetivo. A mis hijas Ximena y Julieta y mi pequeño Eduardo que son fuente de inspiración y motivo de seguir adelante. Los amo. A mis padres y hermanos, que siempre están dispuestos a apoyarme cuando de un buen proyecto profesional se trata, gracias por todo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos particulares	3
3 HIPÓTESIS GENERAL	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Características del pasto taiwán y maralfalfa	4
4.2 Estructura química y composición de la biomasa de las gramíneas	5
4.2.1 Lignina	8
4.2.2 Hemicelulosas	11
4.2.3 Xilanos	12
4.2.4 Xiloglucanos	14
4.2.5 (Gluco) mananos	14
4.2.6 β-(1\rightarrow3,1\rightarrow4)-glucanos	15
4.2.7 Celulosa	15
4.2.8 Pectinas	16
4.2.9 Glicoproteínas (proteínas estructurales)	16
4.2.10 Extractivos	17
4.2.11 Análisis proximal de la biomasa	17
4.2.12 Humedad	19
4.2.13 Cenizas	19
4.2.14 Materia volátil	20
4.2.15 Carbono fijo	20
4.2.16 Poder calorífico	21
4.3 Situación actual de la producción de biocombustibles a nivel mundial	21
4.3.1 Principales cultivos bioenergéticos empleados en la producción de bioetanol y biodisel	24
4.4 Producción de bioetanol	24

4.4.1 Pretratamiento	24
4.4.2 Hidrólisis enzimática	26
4.4.3 Fermentación	27
5. LITERATURA CITADA	28
CAPÍTULO I.....	35
COMPOSICIÓN QUÍMICA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA DEL PASTO MARALFALFA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	35
RESUMEN.....	35
ABSTRACT.....	36
1. INTRODUCCIÓN	37
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1 Datos del experimento.....	39
2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha ⁻¹).	39
2.3 Composición química.....	40
2.4 Análisis proximal.....	40
2.5 Poder calorífico.....	40
2.6 Estimación del rendimiento teórico de bioetanol.	40
2.7 Análisis estadístico.....	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 Rendimiento de biomasa.....	41
3.2 Carbono fijo.....	42
3.3 Materia volátil.	42
3.4 Cenizas.....	42
3.5 Humedad.....	43
3.6 Poder calorífico.....	43
3.7 Holocelulosa.....	45
3.8 Celulosa.....	45

3.9 Hemicelulosas.	45
3.10 Lignina.	47
3.11 Extractivos.	47
3.12 Proteína.	47
3.13 Rendimiento de bioetanol.	48
4. CONCLUSIONES.....	51
AGRADECIMIENTOS.....	51
5. LITERATURA CITADA.....	52
CAPÍTULO II.....	56
EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE CORTE SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PASTO MARALFALFA PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	56
RESUMEN.....	56
ABSTRACT.....	58
1. INTRODUCCIÓN.....	59
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
2.1 Datos del experimento.....	60
2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha ⁻¹).	61
2.3 Caracterización de la biomasa lignocelulosica.	61
2.4 Pretratamiento.....	63
2.5 Hidrólisis enzimática.....	63
2.6 Fermentación.	64
2.7 Destilación.....	65
2.8 Análisis estadístico.....	65
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
3.1 Rendimiento de biomasa.....	66
3.2 Caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto maralfalfa.....	66

3.2.1 Azúcares totales y reductores.....	66
3.2.2 Lignina total, LSA, LIA y RIA.....	67
3.2.3 Humedad.....	67
3.2.4 Cenizas.....	67
3.2.5 Perfil de carbohidratos.....	68
3.3 Pretratamiento básico-oxidante.....	70
3.3.1 Azúcares totales y reductores.....	70
3.3.2 Lignina soluble en ácido.....	70
3.4 Hidrólisis enzimática.....	71
3.4.1 Azúcares totales y reductores.....	71
3.5 Fermentación.....	71
3.5.1 Azúcares reductores e índice de refracción.....	71
3.5.2 Contenido de biomasa.....	73
3.5.3 Etanol.....	73
3.6 Destilación y rendimiento de bioetanol.....	73
3.6.1 Concentración de etanol.....	73
3.6.2 Pureza.....	74
4. CONCLUSIONES.....	75
AGRADECIMIENTOS.....	75
5. LITERATURA CITADA.....	76
CAPÍTULO III.....	79
COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ANÁLISIS PROXIMAL DE LA BIOMASA DEL PASTO TAIWÁN <i>Cenchrus purpureus</i> (Schumach.) MORRONE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	79
RESUMEN.....	79
ABSTRACT.....	80
1. INTRODUCCIÓN.....	81
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	83

2.1 Datos del experimento.....	83
2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha ⁻¹).....	83
2.3 Composición química.....	84
2.4 Análisis proximal.....	84
2.5 Poder calorífico.....	84
2.6 Estimación del rendimiento teórico de bioetanol.....	84
2.7 Análisis estadístico.....	85
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
3.1 Rendimiento de biomasa.....	85
3.2 Análisis proximal.....	85
3.3 Humedad.....	86
3.4 Cenizas.....	86
3.5 Carbono fijo.....	88
3.6 Materia volátil.....	88
3.7 Poder calorífico.....	88
3.8 Extractivos.....	89
3.9 Holocelulosa.....	89
3.10 Celulosa.....	90
3.11 Hemicelulosas.....	90
3.12 Lignina.....	92
3.13 Proteína cruda.....	92
3.14 Rendimiento de bioetanol.....	93
4. CONCLUSIONES.....	96
AGRADECIMIENTOS.....	96
5. LITERATURA CITADA.....	97
CAPÍTULO IV.....	102
EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE CORTE SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PASTO TAIWÁN	

Cenchrus purpureus (Schumach.) MORRONE PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

.....	102
RESUMEN.....	102
ABSTRACT.....	104
1. INTRODUCCIÓN	105
2. MATERIALES Y MÉTODOS	107
2.1 Datos del experimento.....	107
2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha ⁻¹).....	107
2.3 Caracterización de la biomasa lignocelulosica.	108
2.4 Pretratamiento.....	109
2.5 Hidrólisis enzimática.....	110
2.6 Fermentación.....	110
2.7 Destilación.....	111
2.8 Análisis estadístico.....	112
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
3.1 Rendimiento de biomasa.....	112
3.2 Caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto taiwán	113
3.2.1 Azúcares totales y reductores.....	113
3.2.2 Lignina total, LSA, LIA y RIA.....	113
3.2.3 Humedad.....	114
3.2.4 Cenizas.....	114
3.2.5 Perfil de carbohidratos.....	114
3.3 Pretratamiento básico-oxidante	116
3.3.1 Azúcares totales y reductores.....	116
3.3.2 Lignina soluble en ácido.....	116
3.4 Hidrólisis enzimática.....	117
3.4.1 Azúcares totales y reductores.....	117
3.5 Fermentación	117
3.5.1 Azúcares reductores e índices de refracción.....	117

3.5.2 Contenido de biomasa.....	118
3.5.3 Etanol.....	118
3.6 Destilación y rendimiento de bioetanol.....	120
3.6.1 Concentración de etanol.....	120
3.6.2 Pureza.....	120
4. CONCLUSIONES.....	121
AGRADECIMIENTOS.....	121
5. LITERATURA CITADA.....	122

LISTA DE CUADROS

REVISIÓN DE LITERATURA

Página

Cuadro 1.	Composición aproximada de la pared celular primaria y secundaria de los pastos (% de materia seca).....	6
Cuadro 2.	Composición química de la biomasa de fuentes lignocelulosicas con uso industrial para biocombustibles.....	9
Cuadro 3.	Contenido de polisacáridos de hemicelulosas (%) de la pared celular primaria y secundaria de monocotiledóneas, dicotiledóneas y coníferas (ausente:-, presente sin dato cuantitativo:+).....	13
Cuadro 4.	Composición química y análisis proximal de materiales lignocelulosicos utilizados como fuentes bioenergéticas.....	18
Cuadro 5.	Producción de biocombustibles a nivel mundial.....	22
Cuadro 6.	Cultivos frecuentemente utilizados para la conversión y producción de biocombustibles.....	25

CAPÍTULO I

Cuadro 1.	Rendimiento anual de biomasa, análisis proximal y poder calorífico del pasto maralfalfa a seis frecuencias de corte.....	44
Cuadro 2.	Composición química del pasto maralfalfa a seis frecuencias de corte.....	46
Cuadro 3.	Rendimiento de bioetanol del pasto maralfalfa a seis frecuencias de corte.....	50

CAPÍTULO II

Cuadro 1.	Rendimiento, caracterización lignocelulosica y perfil de carbohidratos del pasto maralfalfa a tres frecuencias de corte.....	69
Cuadro 2.	Pretratamiento básico - oxidante en la composición de azúcares totales, reductores y lignina soluble en ácido del pasto maralfalfa a tres frecuencias de corte.....	72

Cuadro 3. Efecto de la hidrólisis enzimática en el contenido de azúcares totales y reductores del pasto maralfalfa a tres frecuencias de corte.....	72
--	----

CAPÍTULO III

Cuadro 1. Rendimiento de biomasa, análisis proximal y poder calorífico del pasto taiwán a seis frecuencias de corte.....	87
Cuadro 2. Composición química del pasto taiwán a seis frecuencias de corte.....	91
Cuadro 3. Rendimiento teórico de bioetanol del pasto taiwán a seis frecuencias de corte.....	95

CAPÍTULO IV

Cuadro 1. Rendimiento, caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto taiwán a tres frecuencias de corte.....	115
Cuadro 2. Pretratamiento básico - oxidante en la composición de azúcares totales, reductores y lignina soluble en ácido del pasto taiwán a tres frecuencias de corte.....	119
Cuadro 3. Efecto de la hidrólisis enzimática en el contenido de azúcares totales y reductores del pasto taiwán a tres frecuencias de corte.....	119

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Comportamiento de los azúcares reductores del pasto maralfalfa fermentados con levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol de segunda generación..... 74

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Comportamiento de los azúcares reductores del pasto taiwán fermentados con levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol de segunda generación..... 120

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La disminución en las reservas de petróleo junto con el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, han despertado el interés para buscar otras alternativas de combustibles líquidos a partir de biomasa lignocelulósica, la cual puede ser un valioso sustituto o complemento de hidrocarburos, debido a que es bastante favorable para el ambiente, por la reducción de CO₂ y otras emisiones (SO₂ y NO₂) que dañan la atmósfera (del Río *et al.*, 2012). En los últimos años, la producción de bioetanol de primera generación ha sido muy debatida por emplear materia prima de primera necesidad para la humanidad e incrementar sus costos, donde la producción es a base de maíz (almidón) y jugo de caña de azúcar (sacarosa).

Datos recientes, indican que la producción mundial de biocombustibles creció 7.4% (equivalente a 4.9 millones de toneladas de petróleo) en el 2015, impulsado por los aumentos en los Estados Unidos (+5.6%), Brasil (+5.5%), Indonesia (+40.4%) y Argentina (+30.9%) (Statistical Review of World Energy, 2015). Según los analistas en estas áreas de energías alternas, la producción de biocombustibles irá en aumento cada vez más, y se estima que para el 2030 se incremente a 1.3 mil millones de litros de bioetanol y más de 2 mil millones de vehículos de doble combustible para el 2050 (Balat, 2011).

La biomasa lignocelulósica a partir de gramíneas C4 está disponible en las regiones tropicales de México, donde en la última década se han introducido variedades del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, [previamente *Pennisetum purpureum*, (Chemisquy *et al.*, 2010)] para uso común en la producción animal, y estudios previos indican que tienen un mayor potencial de crecimiento y producción de biomasa por hectárea con rendimientos que fluctúan entre 37 y 46 Mg MS ha⁻¹ (Calzada *et al.* 2014; Rengsirikul *et al.*, 2013); sin embargo, hay pocos estudios que muestran la edad óptima en que se alcanza la mayor producción y composición química de la biomasa para un mejor aprovechamiento. Así mismo, se ha reportado que la edad del pasto es el factor que más influye en la proporción química de las paredes y contenido celular en la planta (Santana *et al.*, 2010).

Los pastos se caracterizan por un ciclo corto de cosecha que los hace más disponibles para la producción de bioetanol, debido a que son de rápido crecimiento, resistentes a enfermedades, y se requiere una inversión mínima para su establecimiento. Estudios recientes indican que la biomasa lignocelulosa de pastos puede ser considerada como una alternativa para producir bioetanol de segunda generación debido a sus propiedades, por ejemplo, Mohammed *et al.* (2015) reportaron para el pasto napier (*Pennisetum purpureum*) los contenidos de análisis proximal (% base seca): 74.2, 85.1, 6.3, 8.4 para humedad, materia volátil, cenizas, carbono fijo, respectivamente, y 16.5 MJ kg⁻¹; mientras que la composición estructural fue la siguiente (% base seca): 34.2, 20.4, 24.3 y 9.2, para celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos, respectivamente.

En México, los estudios utilizando biomasa lignocelulosa para la producción de bioetanol de segunda generación son limitados (Aburto, 2008; Vázquez, 2012), de tal manera que se están dirigiendo trabajos en el mundo entero, con la finalidad de incrementar los rendimientos y la conversión de estos carbohidratos a bioetanol con una relación costo – beneficio comercialmente factible (Mosier *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar química y energéticamente la biomasa de los pastos taiwán y maralfalfa (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone a diferentes frecuencias de corte, para determinar su potencial como materia prima lignocelulósica en la producción de bioetanol.

2.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar los contenidos de extractos, lignina, nitrógeno, holocelulosa, celulosa, hemicelulosas, de los cultivares taiwán y maralfalfa cosechados a diferentes frecuencias de corte.
2. Evaluar el análisis proximal (humedad, cenizas, materia volátil, carbono fijo) y poder calorífico de los de los cultivares taiwán y maralfalfa cosechados a diferentes frecuencias de corte.
3. Realizar la hidrólisis ácida y perfil de carbohidratos de los pastos taiwán y maralfalfa cosechados a diferentes frecuencias de corte.
4. Evaluar el pretratamiento básico-oxidante de los pastos taiwán y maralfalfa cosechados a diferentes frecuencias de corte.
5. Evaluar la hidrólisis enzimática y fermentación de los pastos taiwán y maralfalfa pretratados a 120 días de cosecha.
6. Determinar la producción de bioetanol de la biomasa de los pastos taiwán y maralfalfa a 120 días de cosecha.

3 HIPÓTESIS GENERAL

El contenido de azúcares fermentables de los cultivares taiwán y maralfalfa se incrementa a medida que aumenta el intervalo entre cortes, lo cual permite obtener mayor conversión a bioetanol con levaduras comerciales.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Características del pasto taiwán y maralfalfa

Los pastos taiwán y maralfalfa derivados del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, [previamente *Pennisetum purpureum*, (Chemisquy *et al.*, 2010)], son plantas originarias de la zonas tropicales húmedas del África, su centro de origen y diversificación enmarca desde el centro del continente Africano (Ghana, República de Guinea, Kenia) hasta el sur (Angola, Zimbawe y Mozambique), donde la precipitación promedio anual es de 1000 mm en promedio (Bruken, 1977; Singh *et al.*, 2013). Recientemente, este género y especie fue reclasificado por Chemisquy *et al.* (2010) al pasar de *Pennisetum purpureum* a *Cenchrus* L. La taxonomía propuesta por estos autores es la siguiente: Clase: Equisetopsida; Subclase: Magnoliidae; Super orden: Lilianae; Orden: Poales; Familia: Poaceae; Género: *Cenchrus* L.

Como se ha reportado anteriormente, el género *Pennisetum* es bastante diverso, y presenta un número base de cromosomas de 5, 7, 8 ó 9 y ploidia (diploide a octoploide) y su ciclo de vida puede ser anual, bianual o perenne (Martel *et al.*, 1997). Para el pasto maralfalfa, existe confusión sobre su origen y clasificación taxonómica, ya que en la literatura científica, se ha reportado como *Penisetum purpureum* x *Penisetum glaucum* (Mateus *et al.*, 2012) o *Penisetum* sp., (Calzada *et al.*, 2014), no obstante, Rueda *et al.* (2016) reportaron el nombre de *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, por lo que para fines de esta tesis y dadas sus similitudes con los cultivares de esta especie, el pasto maralfalfa se manejó como *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone.

Los cultivares derivados del género *Cenchrus* L., se ven favorecidos al alcanzar un alto potencial de producción de biomasa con una temperatura promedio de 30 y 35 °C, su crecimiento se detiene cuando las temperaturas están por debajo de 10 °C, se adaptan bien a suelos fértiles y bien drenados, no crecen bien en suelos arcillosos y pesados y no tolera inundaciones, puede resistir sequía debido a que poseen un sistema fibroso en la raíz (Herrera *et al.* 2012).

Los cultivares del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone son plantas robustas, perennes, erectas y de porte alto (4 m) con buen ahijamiento basal y poseen buen vigor en sus rebrotes (Roche y Hernández, 1993), los tallos pueden tener 20 o más entrenudos que miden de 20 a 25 cm de largo y hasta 3 cm de diámetro (Hanna *et al.*, 2004). Así mismo, el desarrollo del sistema radicular es bueno con un 75% de las raíces en los primeros 30 cm de profundidad y con raíces absorbentes a profundidades superiores a los 60 cm (Clavero y Urdaneta, 1997). Así también, las praderas pueden persistir por 7 años o más dependiendo del manejo (Ruíz, *et al.*, 1992). Los cultivares que se han derivado del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone son forrajes importantes, por su alto rendimiento de materia seca (>50 Mg ha⁻¹ año; Rengsirikul *et al.*, 2013) y por su composición química en etapas tempranas (Ramos *et al.*, 2013). En la actualidad se están recolectando ecotipos alrededor del mundo para evaluar el análisis de crecimiento y comportamiento (Calzada *et al.* 2014), composición química (Mateus *et al.* 2012) y producción de bioetanol (Rengsirikul *et al.* 2013; Rueda *et al.*, 2016).

4.2 Estructura química y composición de la biomasa de las gramíneas

La estructura química de las paredes celulares primarias de los pastos y sus progenitores difiere de todas las demás especies de plantas con flores (Carpita, 1996). La pared celular tiene tres aspectos fundamentales, de manera que la capa más vieja esta hacia afuera y la más joven hacia adentro, junto al protoplasma. Las tres capas de la pared celular, son: **la lámina media**; sustancia amorfa constituida principalmente por pectinas y agua que sirve para cementar las paredes de células adyacentes; su hidrólisis parcial determina la formación de espacios intercelulares. **La pared primaria**; el crecimiento de la pared celular tiene una estructura similar a la fibra de vidrio está constituida por un esqueleto de fibrillas de celulosa encajadas en una matriz de polisacáridos, pectinas y glicoproteínas (Carpita, 1996). La pared celular primaria está presente en todas las células vegetales, normalmente mide entre 100 y 200 nm de espesor y se forma inmediatamente después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento. Está asociada a protoplastos vivos, por lo tanto los cambios que experimenta son reversibles. **Pared secundaria**; no todas las células tienen pared celular secundaria (Cosgrove, 2005) su presencia está restringida a células de determinados tejidos, como el tejido mecánico, en el cual la pared secundaria es característica de las fibras y escleroides del esclerénquima, y el

tejido vascular, en los vasos y traqueidas del xilema. La pared secundaria de traqueidas y fibras generalmente constan de tres capas con características físico-químicas diferentes, que se denominan de la parte interna a la externa.

La composición cuantitativa y cualitativa en hemicelulosas y cuantitativa en pectinas, varía entre las especies vegetales y es la base para la distinción de los dos tipos de pared celular primaria. Tipo I, plantas con flores (dicotiledóneas y gimnospermas) consiste en fibras de celulosa encerrados en una red de xiloglucano, pectina y proteínas estructurales. Tipo II, solo se encuentra en las monocotiledóneas (gramíneas) se componen de fibras de celulosa encerrados en glucuronoarabinoxilanos, altos niveles de hidroxycinamatos y muy bajos niveles de pectina y proteínas estructurales (Smith y Harris, 1999). Vogel (2008) caracteriza a la composición de la pared celular primaria y secundaria de las gramíneas como se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición aproximada de la pared celular primaria y secundaria de los pastos (% de materia seca).

Componente	Pared celular primaria	Pared celular secundaria
Celulosa	20-30	35-45
Hemicelulosas		
• Xiloglucanos	2-5	-
• Glucuronoarabinoxilanos	20-40	40-50
• (Gluc) mananos	2	0-5
• β - (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) - glucanos	2-15	-
Pectinas	5	0.1
Proteínas estructurales	1	-
Fenólicos		
• (ácido ferulico y p -coumarico)	1-5	0.5-1.5
• Lignina	-	10-30
Silica	-	5-15

Fuente: Vogel (2008).

Las gramíneas son de rápido crecimiento y una buena fuente de energía renovable, debido a que los azúcares encerrados dentro de los polisacáridos de la pared celular pueden ser convertidos en combustible líquido (butanol, etanol) y toda la pared celular puede ser quemada para producir calor o electricidad (Service, 2007). La estructura de la pared celular de las plantas contiene, celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pépticas, β -glucanos y pequeñas cantidades de extractivos y cenizas (Girio *et al.*, 2010). El contenido celular contiene almidón, azúcares y fructanos y ocasionalmente ácidos orgánicos (Ishler y Varga, 1993).

En la pared primaria la matriz está formada por celulosa, hemicelulosas, pectinas y glicoproteínas, constituyendo del 60 al 75% del peso seco, siendo la porción fibrilar entre un 25 y 40%. En el caso de la pared secundaria la matriz está formada básicamente por celulosa, hemicelulosas y lignina, mientras que las pectinas y las proteínas desaparecen. Así pues, la relación entre los diferentes polisacáridos, y su composición exacta varía entre las diferentes partes de la pared celular al igual que a nivel filogenético, a nivel espacial entre tejidos de una misma planta y a nivel del desarrollo de una célula (Waldron *et al.*, 2003).

La composición química y la morfología de la pared celular están relativamente bien conocidos; sin embargo, las características estructurales de sus biopolímeros, sobre todo de lignina en relación con su biosíntesis y con la funcionalidad en la pared celular no han sido investigadas a profundidad sobre todo en pastos (Reddy *et al.*, 2012). La lignina representa aproximadamente entre 20 y 35% de la materia seca en la madera de latifoliadas; entre 10-25% en fibras no leñosas o herbáceas y entre 25 y 33% en la madera de coníferas (Aitken *et al.*, 1988). La morfología de fibras depende principalmente de la composición y la organización estructural de estos constituyentes. Sin embargo, contiene compuestos minoritarios no poliméricos que pueden ser de vital importancia para los procesos fisiológicos de la célula (Carroll y Somerville, 2009).

Las gramíneas son algunos de los cultivos más importantes en todo el mundo, y la composición de sus paredes celulares es fundamental para usos como la alimentación humana, alimentación animal y cultivos energéticos, se caracterizan por su bajo contenido leñoso, y en su gran mayoría la conforma la familia *Poaceae*, que es la de mayor importancia económica. En la

composición química, el contenido de hemicelulosas constituye del 25 al 50% de la biomasa seca, los cuales son un grupo de polímeros de hidratos de carbono bastante complejo (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012), que pueden variar en composición y cantidad, entre especies vegetales. En el Cuadro 2, se muestra la composición química de la biomasa de las principales fuentes lignocelulosicas ya documentadas con uso industrial para biocombustibles de segunda generación.

4.2.1 Lignina

La lignina es el segundo biopolímero más abundante dentro de la estructura de la pared celular de los materiales lignocelulósicos, generalmente contiene tres precursores aromáticos incluyendo alcohol coniferílico (4-hidroxi-3metoxicinamílico), sinapyl (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico) y ρ -coumarico (4-hidroxicinamílico), estos precursores forman dentro de la lignina moléculas de guaiacyl-(G), syringyl-(S) y ρ -hydroxyphenyl (H) respectivamente (Dashtban *et al.*, 2010). Las subunidades y secuencia de la lignina varían entre grupo de plantas, debido a los enlaces que no se repiten con cierta frecuencia, es decir, tiene una estructura tridimensional (Bomati y Noel, 2005). La lignina representa aproximadamente entre 20 y 35% de la materia seca en fibras madereras y entre 10-25% en fibras no-madereras.

El peso de la lignina ha sido difícil de determinar debido a que está altamente dispersada dentro de las plantas, es un biopolímero aromático y rígido, unido a través de enlaces covalentes a la celulosa, hemicelulosas y pectinas (Bozell *et al.*, 2011b). Los precursores dentro de la biosíntesis de la lignina se diferencian en la sustitución con un grupo metoxilo (-OMe) en las posiciones 3 y 5 de la unidad aromática, estos biopolímeros proveen de estructura, rigidez y soporte a la planta, encapsulando la celulosa y hemicelulosa, impidiendo el ataque microbiano sobre éstas (Hückelhoven, 2007).

Cuadro 2. Composición química de la biomasa de fuentes lignocelulosicas con uso industrial para biocombustibles.

Biomasa	Composición química (%)						
	Celulosa	Lignina	Ácido urónico	Arabinano	Xilano	Manano	Galactano
<i>Sorghum bicolor</i>	34.0	16.0	1.0	1.6	14.1	0.2	0.52
<i>Panicum virgatum</i>	30.9	17.5	1.17	2.7	20.4	0.29	0.92
Rastrojo de maíz	37.6	18.5	2.9	2.4	21.6	0.38	0.87
Paja de trigo	32.6	16.8	2.24	2.3	19.2	0.31	0.75
Bagazo de caña	39.0	23.0	2.1	2.0	22.0	0.3	0.46
<i>Pinus radiata</i>	41.7	25.9	2.5	1.6	5.9	10.7	2.4
Álamo híbrido	39.2	25.18	4.3	0.8	13.0	1.8	0.88
<i>Eucalyptus</i>	48.0	26.9	4.0	0.3	10.4	1.2	0.74

Fuente: Caroll y Somerville, 2009.

La lignina representa del 10 al 30% del total de la biomasa seca en gramíneas (Vogel, 2008) y es de vital importancia, dado que cumple funciones de transporte de agua, nutrientes y metabolitos en el sistema vascular, sobre todo a nivel de xilema (Hückelhoven, 2007). La biomasa lignocelulósica de bajo contenido de lignina están compuestas principalmente por unidades de alcohol coniferílico con pequeñas cantidades de unidades de alcohol sinapílico y trazas de alcohol *p* – cumarílico, mientras que las biomásas lignocelulósicas con alto contenido de lignina, contienen proporciones iguales de unidades *p* – cumarílico y sinapílico.

Cardona *et al.* (2013) reportaron concentraciones de lignina 19.4% y 15.4% para *Pennisetum purpureum* cultivares elefante y king grass, respectivamente, mientras que Lima *et al.* (2014) reportaron cantidades de lignina de 25.3% en *Panicum máximum* y de 23% en *Pennisetum purpureum*. No obstante, Mohammed *et al.* (2015) reportó 25.6% de lignina en napier grass (*Pennisetum purpureum*). Aunque los contenidos de lignina reportados por estos autores son parecidos entre cultivares de pastos, para especies maderables, Lima *et al.* (2014) reportaron 21.5 y 22.1% en la madera de especies de Eucaliptos.

En la industria de biocombustibles, los materiales lignocelulósicos están teniendo gran importancia, sin embargo, la estructura química de la lignina y su compleja estructura espacial impide el proceso eficiente de hidrólisis y fermentación (Ladisch *et al.*, 2010), por ejemplo, el complejo celulosa-lignina requiere grandes cantidades de enzimas para hidrolizarla y sin embargo, en esta reacción las enzimas celulolíticas son poco productivas, la cual hace más difícil e ineficiente el proceso impidiendo la degradación de celulosa (Chen *et al.*, 2006), también, se forman grupos fenólicos, estos compuestos desactivan las enzimas celulíticas y por tanto disminuyen la eficiencia de la hidrólisis. Este impacto negativo por el alto contenido de lignina, ha despertado el interés en la reducción y efectos negativos de este compuesto.

Cheng *et al.* (2006) demostraron que la modificación de la lignina a través de prácticas de ingeniería genética dirigida a sus rutas biosintéticas podría reducir considerablemente la formación de lignina y mejorar el rendimiento de bioetanol, sin embargo, esto podría ser problemático, ya que los componentes de la lignina sirven como el principal sistema de defensa

en la planta que protege contra patógenos e insectos y su modificación podría alterar los vegetales (Limayen y Ricke, 2012).

4.2.2 Hemicelulosas

En contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con mínima solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidas (Zabel y Morrel, 1992). Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido D-glucoronico (Scheller y Ulvskov 2010).

Las hemicelulosas constituyen del 25 al 50% de la biomasa en gramíneas (Ebringerová *et al.*, 2005; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012), comprenden un grupo de polisacáridos almacenados dentro de la pared celular de plantas anuales y perennes que no son celulosa y que representan una buena fuente de azúcares renovables (Ebringerová *et al.*, 2005). Se presentan en una gran variedad de tipos estructurales, dividido en cuatro grupos generales, que son: *xilanos*, $(1-3)$, $(1-4)$ - β -D-glucanos, *xiloglucanos* y *mananos*, en general su estructura es amorfa y variable, formada de pentosas (β -D-xylosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-glucosa, α -D-galactosa y β -D-manosa), así también, puede contener ácidos urónicos (α -D-glucorónico, α -D-4-O-metilgalacturónico y α -D-galacturónico (Girio *et al.*, 2010). Los autores no siempre clasifican las hemicelulosas de la misma forma. Se pueden clasificar según la cadena principal en xilanos (Xyl), xiloglucanos (XyG), mananos y glucomananos (Vogel, 2008). En el Cuadro 3, se muestra la diferencia en el contenido de polisacáridos de hemicelulosas de la pared celular primaria y secundaria de monocotiledóneas, dicotiledóneas y coníferas.

Las plantas herbáceas suelen contener más hemicelulosas y menos ramificadas, que otras fuentes de biomasa. Por ejemplo, las pajas de cereales (trigo, arroz, centeno, cebada, etc.) suelen contener entre 30 y 40% de hemicelulosas mientras que los residuos agrícolas contienen aproximadamente entre 40-50% (Sun *et al.*, 2000b). En estudios recientes, Lima *et al.* (2014) reportaron hemicelulosas de 28% en *Panicum máximum*, 28% en *Pennisetum purpureum*, 26% en *Brachiaria brizantha* y 27.4% en bagazo de caña, no obstante, el mismo autor reporta 18.8 y

16.4% de hemicelulosas en clones de Eucaliptos, lo cual es un contenido menor a lo reportado en gramíneas. Por otro lado, Mohammed *et al.* (2015) reportaron 20.4% en el cultivar napier grass (*Pennisetum purpureum*). Como se puede apreciar en el Cuadro 3, el contenido de algunos polisacáridos principalmente Glucurono-arabinosilanos es bastante alto en gramíneas (20-40% en la pared primaria) y (40-50% en la pared secundaria) comparado con dicotiledóneas y coníferas, las cuales solo contienen menos del 15%.

Las hemicelulosas de la pared celular de las gramíneas normalmente contienen una cadena principal de β - (1,4) xilopiranosil con α -L-arabinofuranosa en las ramificaciones (Sun *et al.*, 2002a). En algunos casos de gramíneas principalmente cereales, se alternan los enlaces β - (1 \rightarrow 4) con β -(1 \rightarrow 3). Sin embargo, las unidades constituyentes, en la estructura y contenido total de hemicelulosas varían entre los tipos de especies, dentro de la misma especie e incluso según el tejido anatómico y fisiológico del organismo vegetal.

4.2.3 Xilanos

Los xilanos son grupo diverso de polisacáridos con la característica común que la cadena principal está formada de β - (1 \rightarrow 4) - ligada a residuos de xilosa (Scheller y Ulvskov, 2010). Los xilanos son el principal componente de polisacáridos que forman a la hemicelulosa dentro de la pared celular primaria de monocotiledóneas, donde se han reportado concentraciones por arriba del 50% (Ebringerová *et al.*, 2005). Los xilanos debido a los residuos laterales pueden clasificarse en: Arabinosilanos (ramificados con arabinosa), glucuronosilanos (ramificados con ácido glucurónico), glucuronoarabinosilanos (ramificados con ácido glucurónico y arabinosa) y 4-O-metil-glucuronosilanos (ramificados con ácido 4-O-metilglucurónico (Carpita, 1996), aunque esta distinción no es muy clara (Scheller y Ulvskov, 2010).

Por otro lado, los polisacáridos presentes en la pared celular pueden formar enlaces de hidrógeno con la superficie de fibrillas de celulosa y las pectinas que se encuentran en las paredes primarias de la pared celular y el componente de ácido urónico, juntos desempeñan papeles significativos en la determinación de la porosidad de la pared celular y el intercambio iónico (Caffall y Mohnen, 2009). La composición y porcentajes de estos polímeros puede variar

Cuadro 3. Contenido de polisacáridos de hemicelulosas (%) de la pared celular primaria y secundaria de monocotiledóneas, dicotiledóneas y coníferas (ausente: -, presente sin dato cuantitativo: +).

Polisacáridos	Pared celular monocotiledóneas		Pared celular dicotiledóneas		Pared celular coníferas	
	Primaria	Secundaria	Primaria	Secundaria	Primaria	Secundaria
Xiloglucanos	2-5	Menor	20-25	Menor	10	-
Glucuronoxilanos	-	-	-	20-30	-	-
Glucorono-arabinosilanos	20-40	40-50	5	-	2	5-15
(Gluc) mananos	2	0-5	3-5	2-5	-	-
Galactoglucomanos	-	-	-	0-3	+	10-30
β -(1→3, 1→4)- glucanos	2-15	Menor	-	-	-	-

Fuente: Scheller y Ulvskov, 2010.

dentro de una misma planta, entre especies, así como también con la edad, estado de crecimiento y otras condiciones ambientales (Jeffries, 1994). Los xilanos de recursos forestales y residuos agrícolas son de gran aporte dentro de la industria de la pulpa y papel ya que estas fuentes primarias poseen altas concentraciones de estos polisacáridos.

4.2.4 Xiloglucanos

Los xiloglucanos son los más abundantes en las paredes primarias de espermatofitas; sin embargo, en pastos el contenido es alrededor del 1 al 5% comparado con el 20% en dicotiledóneas (Scheller y Ulvskov, 2010). Consisten en una cadena principal de β - (1,4)-D-Glcp. Su estructura base es muy similar a la de celulosa, ya que está constituida por una cadena lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces de tipo β - (1-4); más del 75% de este esqueleto está ramificado: la cadena celulósica principal presenta residuos laterales de xilosa, que a su vez pueden estar unidos a residuos de fucosa o galactosa, formando una red con la celulosa. La fijación de xilanoligosacáridos a celulosa es un proceso complejo y puede mostrar varias conformaciones, el grado de ramificación determina el grado de bioconversión por β - (1,4) - glucanasas (Scheller y Ulvskov, 2010).

4.2.5 (Gluco) mananos

Glucomananos (GM) y galactoglucomananos (GGM), componentes comunes de paredes celulares de las plantas, son los principales componentes de hemicelulosas en paredes celulares secundarias de maderas de coníferas, mientras que en paredes celulares secundarias de maderas latifoliadas se producen en cantidades menores. GM y GGM muestran algunas variaciones en las características estructurales en función de las especies de plantas y la etapa de desarrollo. El grado de galactosilación es difícil debido a la asociación de las microfibrillas de celulosa y por tanto su capacidad de extracción de la matriz de la pared celular se complica (Whitney *et al.*, 1998).

Las extracciones de GMs con álcalis de las paredes secundarias se caracteriza por un bajo grado de sustitución de cadenas laterales de galactosil donde la proporción de la cadena

galactosil: glucosa: mananos es de aproximadamente 0.1:1:3 – 4 respectivamente, mientras que los polímeros extraíbles con agua tienen proporciones más o menos iguales de galactosa y glucosa y la Glc: mananos varía entre 1: 1.4 – 3.1, respectivamente (Ebringerová *et al.*, 2005).

4.2.6 β -(1→3,1→4)-glucanos

Los glucanos no celulósicos se encuentran ramificados en ciertas etapas del desarrollo de las gramíneas: β -D-glucanos contiene enlaces (1–3) y (1–4), ligados en una relación de aproximadamente 1:2 y 1:3 (Scheller y Ulvskov, 2010). Estos polímeros presentan una estructura química similar a la celulosa, pero los enlaces β – (1–4) que unen las unidades de glucosa están intercalados al azar con enlaces de tipo β – (1–3), por lo que su definición exacta es de enlaces mixtos β – (1–3), (1–4) glucanos, aunque son comúnmente denominados β – glucanos, que son características de la pared celular primaria de tipo II (Smith y Harris, 1999).

4.2.7 Celulosa

La celulosa constituye del 28 a 49% del total de la biomasa en gramíneas (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012). Este polímero lineal se compone de subunidades D-glucosa unidas por enlaces β –1, 4 glicosídicos formando moléculas de celobiosa. Estas cadenas largas (llamadas fibrillas elementales) unidas entre sí por enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, juntas forman la fibra de celulosa (Pérez *et al.*, 2002); basado en estos datos su fórmula empírica fue deducida a $C_6H_{10}O_5$.

La celulosa, por su estructura, es altamente cristalina (~50 y 90%) debido a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares que influyen en su morfología, rigidez, orientación, resistencia y reactividad, las zonas de alta cristalinidad son difíciles de hidrolizar en sus unidades monoméricas (Jacobsen y Wyman, 2000) mientras que las zonas de menor cristalinidad, es decir amorfas, son accesibles y susceptibles a las reacciones químicas y susceptible a la degradación enzimática (Béguin y Aubert, 1994). En gramíneas el contenido de celulosa es alto, estudios indican un contenido de 46% en *Pennisetum purpureum*, 44% en

Brachiaria brizantha, 44.0% en *Panicum máximum* y 39.4% en bagazo de caña (Lima *et al.*, 2014).

4.2.8 Pectinas

Las pectinas forman un grupo complejo y heterogéneo de polisacáridos hidratados y ramificados con estructuras y funciones altamente complejas dentro de la pared celular vegetal, donde su principal componente es el ácido D – galacturónico, incluyendo, homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I y los galacturonanos sustituidos por ramnogalacturonano II (RG–II) y xylogalacturonanos (XGA) unidos a través de enlaces covalentes. En plantas dicotiledóneas la proporción de pectinas es por arriba del 35% aproximadamente, mientras que en gramíneas es del 2 al 10% (Mohnen, 2008).

4.2.9 Glicoproteínas (proteínas estructurales)

En las paredes celulares tipo I, los carbohidratos de la pared celular son alargados y están reticulados con proteínas estructurales para producir una inextensible estructura, sin embargo, en la pared primaria de los pastos, esta función se lleva a cabo en gran medida por sustancias fenólicas (Showalter, 1993).

Las proteínas de la pared celular son ricas en aminoácidos, serina e hidroxiprolina, tienen dominios con secuencias repetidas y están glicosiladas en mayor o menor grado (Gleeson *et al.*, 1989). Se cree que dichas glicoproteínas actúan como elementos estructurales, porque tienen estructura fibrilar y se inmovilizan mediante enlaces covalentes entre ellas o con azúcares como arabinosa, glucosa y galactosa. Se acumulan en la pared en diferentes etapas del desarrollo y en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Entre ellas están las *extensinas* o proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), las proteínas ricas en prolina (PRPs), las ricas en glicina (GRPs) y las arabinogalactanas (AGPs) (Carpita, 1996).

4.2.10 Extractivos

Es necesario eliminar el material no estructural de la biomasa antes del análisis para evitar interferencia con etapas analíticas posteriores (Sluiter *et al.*, 2008). El proceso de extracción se lleva a cabo en dos pasos eliminando material soluble en agua y etanol. Materiales solubles en agua pueden incluir material inorgánico, azúcares no estructurales y material nitrogenado, entre otros. El material inorgánico soluble en agua puede proceder tanto de la biomasa y cualquier material soluble que se asocia con la biomasa, tales como el suelo o fertilizante. El material soluble en etanol incluye la clorofila, ceras u otros componentes menores (Goldstein, 1991).

Algunas fuentes lignocelulosicas pueden requerir tanto etapas de extracción, mientras que otras biomasa solo pueden requerir la extracción de etanol exhaustiva (Sluiter *et al.*, 2008). La concentración de extractos en el material lignocelulosico es variable, según la especie (Dien y Bothast, 2009). Los extractivos en materiales lignocelulosicos se encuentran presentes entre un 4 y 10%; sin embargo, Mateus *et al.* (2012) reporta 10.7% de extractivos para el cultivar maralfalfa (*Pennisetum* sp.).

4.2.11 Análisis proximal de la biomasa

El uso de fuentes lignocelulosicas en la producción de bioetanol, requiere la evaluación de parámetros fisicoquímicos, como la humedad, cenizas, carbono fijo y materia volátil, así mismo, es necesario evaluar la composición química (celulosa, hemicelulosa y lignina), ya que juntos condicionan la cinética de degradación (Saldarriaga *et al.*, 2013).

En el Cuadro 4, se muestran datos reportados en diferentes estudios donde se ha evaluado la composición química y análisis proximal de diferentes materiales lignocelulósicos con capacidad para producir biocombustible de segunda generación. Cada tipo de biomasa tiene propiedades específicas y que deben ser evaluadas para determinar su desempeño como combustible (McKendry, 2002).

Cuadro 4. Composición química y análisis proximal de materiales lignocelulosicos utilizados como fuentes bioenergéticas.

Biomasa	Composición química (%)					Análisis proximal (%)				Referencias
	CL	HL	LK	E	Otros	Cenizas	CF	MV	H	
Maderas de latifoliadas	45-47	25-40	20-25	-	0.80	1	17	82	20	McKendry, 2002; Limayen y Ricke, 2012
Nogal	46.2	20.9	21.9	2.8	-	0.70	20.8	78.5	10.0	Sun y Cheng, 2002
<i>Eucalyptus grandis</i> bark	39.5	18.8	21.5	28.2	-	0.30	-	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
Arce	44.9	23.0	28.0	-	-	-	-	-	-	Sun y Cheng, 2002
<i>Eucalyptus</i> sp.	48.0	16.6	26.9	4.1	-	1.2	-	-	-	Carroll y Somerville, 2009
Álamo	49.9	25.1	18.1	6.8	-	2.1	-	-	45	Carroll y Somerville, 2009; McKendry, 2002
Chopo	43.5	21.8	26.2	-	-	3.4	6.8	89.6	9.0	Sun y Cheng, 2002
<i>E. grandis x urophylla</i> bark	40.3	16.4	22.1	28.1	-	0.75	-	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>Pinus radiata</i>	46.4	20.6	29.4	2.7	-	11.30	15.7	73.6	-	Carroll y Somerville, 2009
Maderas de coníferas	40-45	22-29	27-60	-	0.50	-	-	-	-	Limayen y Ricke, 2012; McKendry, 2002
Residuos Agrícolas	37-50	25-50	5-15	-	12-16	-	-	-	-	Limayen y Ricke, 2012
Paja de trigo	33.8	20.6	20.8	12.9	-	13.7	24	69.6	16	Parikh <i>et al.</i> 2005; Carroll y Somerville, 2009
Rastrojo de maíz	36.8	30.6	23.1	5.61	-	3.7	17.6	78.7	-	Carroll y Somerville, 2009; Parikh <i>et al.</i> 2005
Paja de cebada	33.1	24.9	16.1	-	-	6	18	46	30	McKendry, 2002
Bagazo de agave	42	12	-	-	9.0	8.8	-	-	71	González <i>et al.</i> 2005
Bagazo de caña	39.4	27.4	27.7	3.7	-	3.66	15.0	83.6	51.0	Parikh <i>et al.</i> 2005; Carroll y Somerville, 2009
Pastos	25-40	35-50	10-30	9.2	-	6.3	8.4	85.1	74.2	Kumar <i>et al.</i> 2009; Mohammed <i>et al.</i> 2015
<i>Miscanthus</i> sp.	50.3	24.8	12.1	-	-	2.8	16.0	66.8	11.5	McKendry, 2002; Hodgson <i>et al.</i> , 2010
<i>Sorghum drummondii</i>	34.0	17.4	16.0	22.0	-	8.6	18.6	72.7	-	Carroll y Somerville, 2009
<i>Panicum máximum</i>	39.8	28.0	26.3	-	-	-	-	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>Panicum virgatum</i>	45.0	31.4	12.0	16.9	-	8.9	14.4	76.7	15	Kumar <i>et al.</i> 2009; Carroll y Somerville, 2009
<i>Digitaria decumbens</i>	33.7	36.7	-	-	-	-	-	-	-	Wongwatanapaiboon <i>et al.</i> 2012
<i>Pennisetum</i> sp. cv. napier	34.2	20.4	24.3	-	-	-	-	-	-	Rengsirikul <i>et al.</i> 2013
<i>Pennisetum</i> sp. cv. elefante	22.6	20.9	19.4	9.9	16.1	11.1	12.4	87.2	-	Cardona <i>et al.</i> 2013
<i>Panicum máximum</i> cv. guinea	34.1	33.1	-	-	-	-	-	-	-	Wongwatanapaiboon <i>et al.</i> 2012
<i>Brachiaria brizantha</i>	45.3	26.3	23.8	12.1	-	-	-	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>Pennisetum</i> sp. cv. maralfalfa	34.3	22.5	16.1	10.7	10.7	2.4	-	-	-	Mateus <i>et al.</i> 2012
<i>Pennisetum</i> sp. cv. taiwán	42.4	24.0	11.0	-	-	-	-	-	-	Rengsirikul <i>et al.</i> 2013
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	34.5	35.0	23.0	-	29.1	0.39	-	-	-	Lima <i>et al.</i> 2014
<i>Pennisetum</i> sp. cv. king grass	23.6	21.9	15.4	16.9	7.6	14.6	-	-	-	Cardona <i>et al.</i> 2013

(CL=Celulosa; HL=Hemicelulosas; LK= Lignina Klason; E= Extractos; CF= Carbono fijo; MV=Materia volátil; H= Humedad).

Actualmente, el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en inglés), es el encargado de monitorear y aprobar las técnicas para evaluar la biomasa con fines bioenergéticos. Existen métodos propuestos por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC; <http://www.aoac.org/>) métodos para pentosas, donde el Laboratorio Nacional de Energías Renovables argumenta que estos métodos son precisos y rápidos, pero no necesariamente exactos para cuestiones de biorefinerías. Actualmente las técnicas que se usan en la industria de biocombustibles son dictadas por la ASTM (<http://www.astm.org/>) y TAPPI (<http://www.tappi.org/>), y adaptadas a la NREL (<http://www.nrel.gov/biomass/>).

4.2.12 Humedad

El contenido de humedad de la biomasa indica la pérdida de peso cuando la muestra es secada en una estufa a 105 °C y se expresa como el porcentaje de agua presente sobre el peso total (Bux *et al.*, 2012). El contenido de humedad en la biomasa tiene el mayor efecto en los procesos de reacciones para la pirólisis y combustión y se busca que el contenido sea bajo para obtener mayor concentración energética a la hora de determinar su poder calorífico.

Normalmente las fuentes lignocelulosicas superan el 50% de humedad, así mismo, dependen de la estación del año, especie y ubicación geográfica y etapa fenológica al corte, también puede modificarse entre las etapas anatómicas de la planta en el transcurso del año (Rengsirikul *et al.*, 2013). Evidentemente, el contenido de energía por masa húmeda cae fuertemente con el aumento de humedad; sin embargo, para procesos de conversión energética siempre se busca que la biomasa tenga un contenido de humedad por abajo del 30%. Las normas ASTM (2012; E-871) se usan para evaluar el contenido de humedad en la biomasa.

4.2.13 Cenizas

La ceniza en fuentes lignocelulosicas generalmente es considerada como el residuo remanente del material una vez que fue incinerada. Sin embargo, la ceniza presente como fuente inorgánica, no es un valor energético en cuestiones de biotecnología, altos contenidos de cenizas pueden causar problemas en esquemas de reacciones para la pirólisis y combustión. El contenido

de cenizas puede variar ampliamente entre especies de plantas y es generalmente alta en gramíneas, comunmente los bagazos y residuos agrícolas contienen altas concentraciones de cenizas, sílice y potasio (Clarke *et al.*, 2011). En gramíneas las concentraciones de cenizas se relacionan con el estado fenológico, siendo de mayor concentración en edades tempranas (Rengsirikul *et al.*, 2013), así mismo las estaciones del año y la ubicación geográfica. Las Normas ASTM (2012; D-1102) se usan para evaluar el contenido de cenizas en biomasa con fines energéticos.

4.2.14 Materia volátil

Durante este proceso de calor dentro de una mufla a 400 a 500 °C para algunas fuentes y a 900 °C durante 7 min, para otros (McKendry, 2002), la biomasa es descompuesta en productos gaseosos y líquidos, como agua, hidrógeno, dióxido de carbono, metano y otros hidrocarburos de bajo peso molecular. El contenido en volátiles de una muestra sólida constituye una importante propiedad de éste, proporcionando una indicación de su reactividad y facilidad de ignición.

Generalmente la biomasa contiene altos contenidos de materia volátil por arriba del 80% mientras que el carbón tiene un bajo contenido de materia volátil por abajo del 20% en gramíneas y bagazos se pueden encontrar concentraciones de 48% a 87% (Parikh, *et al.*, 2005). Las Normas ASTM (2012; E-872) se usan para evaluar el contenido de materia volátil en biomasa con fines energéticos.

4.2.15 Carbono fijo

Es la parte no volátil y se quema en estado sólido, este parámetro es calculado, obteniéndose por diferencia a 100 de la suma de los contenidos de humedad residual, materia volátil y cenizas de la muestra secada al aire. El contenido en carbono fijo es un parámetro indicativo de la calidad del combustible y para su cálculo se emplean las Normas ASTM (2012; E-870).

4.2.16 Poder calorífico

Las Normas ASTM (1996) se usan para evaluar el poder calorífico en la biomasa con fines energéticos. El poder calorífico o valor calorífico superior (HHV; por sus siglas en inglés), de cualquier combustible es la energía liberada por unidad de masa o por unidad de volumen del combustible cuando es quemado por completo mediante un calorímetro de bomba. Dicho de otra manera el poder calorífico neto es la energía real disponible para la transferencia de calor, la cual es explicada por la composición química de la biomasa como la humedad y el contenido de cenizas.

Las unidades internacionales para expresar el poder calorífico son MJ/kg o Btu/lb (Clarke *et al.*, 2011; Parikh *et al.*, 2005). El valor calorífico de un combustible depende del contenido de moléculas de agua disueltas en el material, de tal manera que un elevado porcentaje de humedad en la biomasa reduce la eficiencia en la combustión, debido a que gran parte del calor liberado se usa para evaporar el agua y no se aproveche la reducción química del material (Parikh *et al.*, 2005). Siempre que se reporta el poder calorífico, se debe hacer en material libre de humedad, por ejemplo, gramíneas y residuos agrícolas tienen valores de 8.8 a 20 MJ/kg (Parikh *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2011).

4.3 Situación actual de la producción de biocombustibles a nivel mundial

La producción de energía renovable, particularmente biocombustible líquido a partir de biomasa lignocelulósica es una alternativa con el fin de coadyuvar a la producción de hidrocarburos, disminuir la contaminación ambiental y reducir la acumulación de CO₂ en la atmósfera (Lima *et al.*, 2014). Actualmente, la mayoría de los biocombustibles se producen a partir de cultivos que también pueden ser utilizados para la producción de alimentos. Aunque los biocombustibles ofrecen una serie de beneficios para la sociedad, se ha producido un debate mundial en los últimos años en relación con el impacto de los biocombustibles y la producción de alimentos ya que los precios se han incrementado.

Cuadro 5. Producción de biocombustible a nivel mundial.

País	Producción equivalente a miles de toneladas de petróleo	Proporción (%)
Estados Unidos	30056	42.5
Canadá	1143	1.6
México	53	0.1
Total Norte América	31252	44.1
Argentina	2577	3.6
Brasil	16656	23.5
Colombia	655	0.9
Otros estados Centro América	406	0.6
Total Sudamérica y Centroamérica	20294	28.7
Austria	310	0.4
Bélgica	550	0.8
Finlandia	47	0.1
Francia	2269	3.2
Alemania	2684	3.8
Italia	432	0.6
Holanda	1445	2.0
Polonia	696	1.0
Portugal	246	0.3
España	938	1.3
Suiza	305	0.4
Inglaterra	482	0.7
Resto de Europa	1280	1.8
Total Europa y Eurasia	11683	16.5
Total África	21	-
Australia	152	0.2
China	2083	2.9
India	320	0.5
Indonesia	2444	3.5
Corea del Sur	302	0.4
Tailandia	1402	2.0
Otros países asiáticos	834	1.2
Total Asia	7538	10.6
Producción mundial	70792	100

Fuente: Statistical Review of World Energy, 2015.

El escenario actual en la industria de biocombustibles, se muestra en el Cuadro 5, donde los países con mayor producción mundial son Estados Unidos (42.5%), Brasil (23.5%), Alemania (3.8%), Argentina (3.6%) e Indonesia (3.5%). México, solo representa el 0.1% de la escala mundial de producción y en los últimos años, el crecimiento ha sido nulo. La economía

mundial depende en gran medida de la energía derivada de fuentes de carbono fósil, principalmente petróleo, carbón y gas cada vez más natural. Las fuentes de energías renovables, energía para uso doméstico y transporte ha ido en aumento al pasar de 0.9% en décadas pasadas a 3.0% en el 2014 (International Energy Agency, 2015).

La producción mundial de bioetanol a partir de caña de azúcar, maíz y la remolacha de azúcar aumentó alrededor de 39 mil millones de litros en 2006 a más de 85 mil millones de litros en 2012. Análisis recientes, indican que la producción mundial de biocombustibles creció 7.4% (equivalente a 4.9 millones de toneladas de petróleo) en el 2015, impulsado por los aumentos en los Estados Unidos (+5.6%), Brasil (+5.5%), Indonesia (+40.4%) y Argentina (+30.9%) (Statistical Review of World Energy, 2015).

En los Estados Unidos de Norte América, el bioetanol se produce casi en su totalidad a partir de maíz (90%), y se encuentra por encima de la caña de azúcar. Las estadísticas muestran un aumento de 178%, al pasar de 18 a 50 millones de litros producidos del 2006 al 2012 respectivamente, a la par, el aumento de biodiesel fue de 0.9 a 4 millones de litros para el mismo periodo, mostrando un incremento de 344%. Como resultado final hubo 16,435 millones de toneladas de materias primas utilizadas para la producción de biocombustibles en 2012 (UNCTAD, 2014).

Por otro lado, Brasil produce bioetanol a partir de caña de azúcar (sacarosa). En el periodo del 2006 al 2007, se produjeron 18 000 millones de litros, supliendo la demanda interna y un excedente de 3.5 millones de litros para exportación (Lima *et al.*, 2014). En conjunto, Brasil y Estados Unidos de Norte América, representan la mayor producción mundial aportando el 42.5% y 23.5% de la producción total en los últimos años, sin embargo, la Unión Europea y Asia, en conjunto suman un total de 26.5% de la producción mundial. Según los analistas en estas áreas de energías alternas, la producción de biocombustibles irá en aumento cada vez más, y se estima que para el 2030 se incremente a 1.3 mil millones de litros de bioetanol y más de 2 mil millones de vehículos de doble combustible para el 2050 (Balat, 2011).

4.3.1 Principales cultivos bioenergéticos empleados en la producción de bioetanol y biodisel

Cualquier materia prima con un alto contenido de azúcar o de compuestos que se convierten en azúcar como el almidón o la celulosa, se puede usar para producir biocombustible, el bioetanol producido a través de jugo de caña de azúcar, maíz, trigo y sorgo, se considera de primera generación y la producción a partir de desechos forestales, desechos agrícolas, bagazos y gramíneas, se considera de segunda generación. En el Cuadro 6, se muestran los principales cultivos empleados en la producción de bioetanol y biodisel, a partir de materias lignocelulosicas, sin embargo, algunos cultivos o fuentes primarias están en vías de investigación (Mohammed *et al.*, 2015).

4.4 Producción de bioetanol

La producción de bioetanol con materiales lignocelulosicos es una alternativa viable para el futuro, dado que estos recursos son bastante abundantes en la naturaleza. En trabajos previos con gramíneas, bagazos, pajas y rastrojos, indican que poseen altos contenidos de carbohidratos; según van der Weijde *et al.* (2013) los pastos contienen 28-49% de celulosa, 24-34% hemicelulosa y 10-30 % de lignina, lo cual hace que esta materia sea considerada como fuente bioenergética en la industria del bioetanol.

En estudios con gramíneas, Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) reportaron los siguientes rendimientos de etanol ($L\ ha^{-1}$): pasto elefante 6331, king grass 2562, pángola 12654, atratum 6143. Por otro lado, Parrish y Fike (2005) reportan de 5000 a 6000 $L\ ha^{-1}$ con pasto stiwchgrass (*Panicum virgatum* L.), Gulati *et al.* (1996) reportaron 4000 $L\ ha^{-1}$ utilizando almidón del maíz y con rastrojo de maíz Perlack y Turhollow (2003) reportaron 2000 $L\ ha^{-1}$.

4.4.1 Pretratamiento

La biomasa está compuesta por carbohidratos y lignina (alcoholes polifenólicos), entre otros extraíbles, estos compuestos no todos son fermentables por levaduras o algún otro microorganismo. Por lo tanto la biomasa debe ser pretratada, para que la complejidad de estas

Cuadro 6. Cultivos frecuentemente utilizados para la conversión y producción de biocombustibles.

Cultivo	Biocombustible	Conversión (L/t materia prima)	Rendimiento (t ha⁻¹)	Rendimiento promedio (L ha⁻¹)
Yuca	etanol	180	11.5	2071
Higuerilla	biodisel	393	0.9	364
Coco	biodisel	130	5.3	690
Cacahuate	biodisel	309	1.6	484
Jatropha	biodisel	340	-	-
Maíz	etanol	410	4.8	1988
Aceite de palma	biodisel	223	14.1	3136
Papas	etanol	110	16.9	1860
Colza	biodisel	392	1.8	704
Arroz	etanol	430	4.1	1754
Sésamo	biodisel	440	0.5	200
Sorgo	etanol	402	1.3	532
Soya	biodisel	183	2.3	419
Caña de azúcar	etanol	81	66.4	5376
Girasol	biodisel	418	1.3	538
Trigo	etanol	389	2.9	1118

Fuente: Mitchell, 2011.

estructuras sea disminuida y se favorezca la acción de enzimas hidrolíticas para la generación de azúcares simples (Lin y Tanaka, 2006).

El pretratamiento se requiere para alterar la estructura de la biomasa celulósica, con un objetivo principal que es remover la lignina, remover parte de la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa, tratando de evitar pérdidas de carbohidratos, de tal manera que la hidrólisis de la fracción de carbohidratos sea eficiente y permita que la celulosa este más disponible a las enzimas, para convertir los carbohidratos en azúcares fermentables. El

pretratamiento dentro del proceso de la producción de bioetanol es de suma importancia debido a que de ello depende la eficiencia en la producción, se ha demostrado que la fase del pretratamiento puede incrementar hasta 30 centavos de dólar por galón producido de bioetanol (Mosier *et al.*, 2005), de tal manera que es muy importante considerar la relación costo-beneficio en esta fase.

4.4.2 Hidrólisis enzimática

La eficiencia de la hidrólisis es alta siempre y cuando el pretratamiento sea efectivo. La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada a cabo por celulasas las cuales son un sistema complejo formado por tres enzimas que actúan sinérgicamente hidrolizando la celulosa. Estos tres componentes de las enzimas son: 1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa y β -glucosidasa, que actúan en condiciones deseables a un pH de 4.5 y temperatura cercana a 50 °C (Keshwani y Cheng, 2009).

Según Kumar *et al.* (2008) las 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasas catalizan las rupturas de enlaces a partir de los extremos de la cadena mientras que las endoglucanasas catalizan las rupturas de los enlaces internos de la cadena de celulosa al azar, y las β -glucosidasas solo utilizan como sustrato celooligosacáridos y celobiosas para liberar monómeros de glucosa. En menor proporción se encuentran las hemicelulasas, que hidrolizan xilanos, debido a la complejidad de la hemicelulosa hace de la hidrólisis un proceso de mayor complejidad comparado con el de la celulosa (Wyman *et al.*, 2005).

Las principales enzimas que participan en la degradación del xilano son la endo 1,4- β -xilanasas, β -xilosidasa, α -glucoronidasa, α -L-arabinofuranosidasa y acetil-xilano esterasa. Los principales productos obtenidos con la acción de estas enzimas son xilobiosa, xilotriosa y residuos de 2-4 xilosil sustituidos (Wyman *et al.*, 2005). La fase de la hidrólisis es cara dependiendo del costo de las enzimas, sin embargo, se espera que los costos vayan disminuyendo conforme se incrementan sus usos en la industria del bioetanol, para 50 millones de galones por año el costo de la enzimas fue de 50 centavos de dólar por galón en el 2009, para el 2015 se espera que el costo sea de 44 centavos por galón (Schnepf, 2010). Por otro lado, también la

hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo usando ácidos concentrados o agentes alcalinos (Wyman, 1994).

4.4.3 Fermentación

Después del pretratamiento y la hidrólisis, los azúcares obtenidos se transformaran en bioetanol con ayuda de cultivos microbianos capaces de llevar a cabo una fermentación. Las hexosas o azúcares de seis carbonos pueden ser fermentados por bacterias, hongos y levaduras fácilmente, sin embargo, pentosas o azúcares de cinco carbonos como la xilosa no son metabolizados por la mayoría de los microorganismos, e investigaciones son conducidas actualmente para desarrollar microorganismos específicos para este tipo de azúcares presentes en materiales lignocelulosicos (Jeffries y Shi, 1999; Lynd *et al.*, 2002; Sun y Cheng, 2002; Schnepf, 2010).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más usada comercialmente para la producción de bioetanol, presentando como principales ventajas metabólicas gran tolerancia a altas concentraciones de etanol y producir etanol en altas concnetraciones, además es reconocido como un microorganismo seguro (GRAS). Puede metabolizar glucosa, manosa, fructosa, sacarosa y galactosa para producir etanol, entre otros metabolitos, sin embargo no puede fermentar los hidrolizados provenientes de la hemicelulosa (xilosa) azúcares de cinco carbonos, de ahí, la complejidad de los hidrolizados provenientes de materiales lignocelulosicos comparados con los jugos de caña de azúcar o granos. Por otro lado, la eficiencia en la fermentación no es del 100 %, en teoría 100 gramos de glucosa producirán 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono, en la práctica, los microorganismos usan parte de la glucosa para su crecimiento y el rendimiento real es menor al 100% (Badger, 2002).

5. LITERATURA CITADA

- Aburto, J., Martínez, T. y F. Murrieta. 2008. Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnol. Ciencia. Ed. (IMIQ)*. 23 (1): 23-30.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 2009. Standard test method for ash in wood. ASTM D1102, Annual Book of ASTM Standards, Volume 04.10 Wood pp. 174-175.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 2012. Annual book of ASTM standards, volume 11.16 Biological effects and environmental fate; biotechnology. ASTM E870 pp. 96-97, ASTM E871, pp.98-99, ASTM E-872, pp.100-102.
- American Society for Testing and Materials (ASTM).1996. Standard Test Method for Gross Calorific Value of Refuse-Derived fuel by the bomb calorimeter. ASTM E711, Annual Book of ASTM Standards. Waste management, pp. 265-271.
- Aitken I., Cadel F. y C. Voillot. 1988. Constituants fibreux des pates papiers et cartons pratique de l'analyse, 1st edition. *Pratique de l'analyse*, Centre Technique du Papier, Grenoble.
- Badger, C. P. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. *Trends in new crops and new uses*. J. Janick y A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 52: 858-875.
- Béguin, P. y J. P. Aubert .1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13:25-58.
- Bozell, J. J., O'Lenick, J. C. y S. Warwick. 2011b. Biomass fractionation for the biorefinery: heteronuclear multiple quantum coherence-nuclear magnetic resonance investigation of lignin isolated from solvent fractionation of switchgrass. *J. Agric. Food Chem.* 59(17): 9232-9242.
- Bomati, E. K. y J. P. Noel. 2005. Structural and kinetic basis for substrate selectivity in *Populus tremuloides* sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 17(5): 1598-1611.
- Bux, M. R., Razaque, S. A. y M. A. Uqaili. 2012. Biomethanization potential of waste agricultural biomass in Pakistan: a case study. *Int. J. of biomass y renewables*. 1:32-37.

- Brunken, N. J. 1977. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (Gramineae). Amer. J. Bot. 64(2):161-176.
- Calzada, M. J. M., Enríquez, Q. J. F., Hernández, G. A., Ortega, J. E., S. I. M. Pedroza. 2014. Análisis de crecimiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) en clima cálido subhúmedo. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 5(2): 247-260.
- Cardona, M. E., Ríos, A. J., Peña, D. J. y A. L. Ríos. 2013. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum* sp) y king grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de bioetanol. Inf. Tecnológica. Vol. 24(5): 69-80.
- Carrier, M., Loppinet, S. A., Denux, D., Lasnier, J. M., Ham, P. F., Cansell, F. y C. Aymonier. 2011. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. Biomass y Bioenergy. 35 (1):298-307.
- Carroll, A. y Somerville, C. 2009. Cellulosic biofuels. Annual Review of Plant Biology. 60: 165-182.
- Carpita, C. N. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. Plant Mol. Biol. 47:445-76.
- Caffall, K. H. y D. Mohnen. 2009. The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. Carbohydr. Res. 344:1879-1900.
- Chen, F., Srinivasa, R. M. S., Temple, S., Jackson, L., Shadle, G. y R. A. Dixon. 2006. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Plant. 48:113-124.
- Chemisquy, A. M., Giussani M. L., Scataglioni, A.M., Kellogg, A. E. y O. Morrone. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. Annals of Botany 106: 107-130.
- Clarke, S. y F. Preto. 2011. Biomass burn characteristics. Factsheet. 11:033. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/engineer/facts/11-033.htm>. Accesado el 28/06/2016.
- Clavero, T. y R. Urdaneta. 1997. Root growth of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* cv. Mott). Rev. Fac. Agron. Luz. Vol. 14:657-663.
- Cosgrove, J. D. 2005. Growth of the plant cell wall. Molecular cell biology. 6:850-861.

- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, A. T. y W. Qin. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J. Biochem. Mol. Biol.* 1(1):36-50.
- Dien B. y R. Bothast. 2009. A primer for lignocellulose biochemical conversion to fuel ethanol. En: Industrially robust enzymes and microorganisms for production of sugars and ethanol from agricultural biomass. National Center for Agricultural Utilization Research. pp.73-93.
- Ebringerová, A., Hromadkova, Z., y T. Heinze. 2005. Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.* 186: 1-67.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. y R. Bogel-Lukasik. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol.* 101(13):4775-800.
- Gleeson, P. A., McNamara, M., Wettenhall, R. E. H., Stone, B. A., G. B. Fincher. 1989. Characterization of the hydroxyproline-rich protein core of an arabinogalactan-protein secreted from suspension-cultured *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) endosperm cells. *Biochem. J.* 264:857-862.
- Goldstein, I. 1991. Overview of the chemical composition of wood. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-5.
- González, G. Y., González, R. O. y J. N. Arellano. 2005. Potential of the pulp from the “agave tequilana weber” plant to produce biopolymers and carbohydrases via cellulolytic bacteria and obtain phenolic compounds. *Producción de biopolímeros y carbohidrasas.* 3 (14): 1-18.
- Gulati, M., Kohlmann, K., Ladisch, M. R., Hespell, R. y R. J. Bothast. 1996. Assessment of ethanol production options for corn products. *Bioresour. Technol.* 58 (3): 253- 264.
- Hanna, W. W., C. J. Chaparro, B. W. Mathews, J. C. Burns y L. E. Sollenberger. 2004. *Perennial Pennisetums*. In L. E. Moser *et al.* (ed.) Warm-season (C4) grasses. American Society of Agronomy Monograph Series, Madison, WI.
- Herrera, S. R., García, M. Cruz, M. A. y A. Romero. 2012. Assessment of *Pennisetum purpureum* clones obtained by *in vitro* tissue culture. *Cuban J. Agric. Sci.* 46 (4): 427-433.
- Hodgson, E.M., Nowakowski, D.J., Shield, I., Riche, A., Bridgwater, A.V., Clifton, B. J.C. 2010. Variation in *Miscanthus* chemical composition and implications for conversion by

- pyrolysis and thermo-chemical bio-refining for fuels and chemicals. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2010.10.017
- <http://www.nrel.gov/biomass/>. Biomass Characterization Capabilities. Accesado el 03/02/2016.
- http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC. Accesado el 03/02/2016.
- <http://www.tappi.org/>. Accesado el 03/02/2016.
- <http://www.astm.org/>. Accesado el 03/02/2016.
- <http://www.nrel.gov/biomass/>. Accesado el 03/02/2016.
- Hückelhoven, R. 2007. Cell-wall associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Rev. Phytopatology.* 45:101-127.
- Ishler, V. y G. Varga. 1993. Carbohydrate nutrition for lactating dairy cattle. Department of Dairy and Animal Science. The Pennsylvania State University. DAS 01-29.
- International Energy Agency. 2015. Key World Energy Statistics, France: OECD/IEA.
- Jeffries, T. W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: *Biochemistry of microbial degradation.* Ratledge C (ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 233–277.
- Jeffries, T. W. y N. Q. Shi. 1999. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. In *Recent progress in bioconversion of lignocellulosics* (pp. 117-161). Springer Berlin Heidelberg.
- Jacobsen, S. y C. Wyman. 2000. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84: 81–96.
- Kumar, R., Singh, S., y O. V. Singh. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 35: 377-391.
- Lima, M. A., Gomez, D. L., Steele-King, G. C., Simister, R., Bernardinelli, D., Carvalho, M. A., Rezende, A. C., Labate, C. A., R deAzevedo, E., McQueen-Mason, S. J. y I. Polikarpov. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnol. Biofuels.* 7:1-19
- Limayen, A. y S. C. Ricke. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Comb. Sci.* 38: 449-467.
- Lin, Y. y S. Tanaka. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69: 627- 642.
- Ladisich, M. R., Mosier, N. S., Kim, Y., Ximenes, E. y D. Hogsett. 2010. Converting cellulose to biofuels. *Chemistry Engineering Progress.* 106 (3):56-63.

- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. y I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66: 506–577.
- Mateus, L., Hernández, O., Velázquez, M. y J. De J. Díaz. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of goliath grass (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) for ethanol cellulosic. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV: 146-156.
- Martel, E., De Nay, D., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S. y A. Sarr. 1997. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *The Journal of Heredity.* 88: 139–143.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology* 83: 37- 46.
- Mitchell, D. 2011. *Biofuels in Africa: Opportunities, Prospects, and Challenges*, Washington: The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Plant biology.* 11:266-277.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M. y M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology.* 96: 673–686.
- Mohammed, Y. I., Abakr, A. Y., Kazi, K. F., Yusup, S., Alshareef, I. y A. S. Chin. 2015. Comprehensive characterization of napier grass as a feedstock for thermochemical conversion. *Energies.* 8: 3403-3417.
- Parikh, J. Channiwala, S. A. y G. K. Ghosal. 2005. A correlation for calculating HHV from proximate analysis of solid fuels. *Fuel.* 84: 487-494.
- Parrish, D. J. y J. H. Fike. 2005. The biology and agronomy of switchgrass for biofuels. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24 (5–6), 423–459.
- Pérez, J., Muñoz, D. A., De la Rubia, T. y E. Martínez. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63.
- Perlack, R. D. y A. F. Turhollow. 2003. Feedstock cost analysis of corn stover residues for further processing. *Energy* 28 (14): 1395-1403.
- Ramos, T. O., Canul, S. J. R. y F. J. D. Vera. 2013. Production of three varieties of *Pennisetum purpureum* fertilized with two different sources of nitrogen in Yucatan, Mexico. *Rev. Bio Ciencias.* 2 (2): 60-68.

- Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Prapa, S., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., Nakamane, G. y T. Sayan. 2013. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand. *J. of Sustainable Bioenergy Systems*. 3:107-112.
- Reddy, O. K., Maheswari, U. C., Shukla, M. y A.V. Rajulu. 2012. Chemical composition and structural characterization of napier grass fibers. *Materials Letters* 67:35–38
- Roche, R. y J. E. Hernández. 1993. Estudio comparativo de somaclones de king grass (*Pennisetum purpureum*) con riego. *Pastos y Forrajes*, Vol. 16, No. 2:135-146.
- Ruiz, T. M., Sanchez, K. W. y C. R. Staples. 1992. Comparison of "Mott" dwarf elephantgrass silage and corn silage for lacting dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:533-543.
- Rueda, J. A., Ortega, J. E., Hernández, G. A., Enríquez, Q. J. F., Guerrero, R. J. D. y A. R. Q. Carrillo. 2016. Growth, yield, fiber content and lodging resistance in eight varieties of *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone intended as energy crop. *Biomass and Bioenergy*. XXX:1-7.
- Saldarriaga, J. F., Pablos, A., Amutio, M., Aguado, R. y M. Olazar. 2013. Determination of moisture content, proximate and lignocellulosic analysis of biomass by thermogravimetric analysis. 17th International Congress on Project Management and Engineering. Logroño, Spain.
- Service, R. F. 2007. Biofuel researchers prepare to reap a new harvest. *Science*. 315:1488-1491.
- Singh, P. B., Singh, P. H. y E. Obeng. 2013. *Biofuel Crops*. pp. 271-291.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. y D. Templeton. 2008. Determination of Extractives in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619.
- Scheller H.V. y P. Ulvskov. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61, 263-289.
- Smith, B. G. y P. J. Harris. 1999. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem. Syst. Ecol.* 27:33-53.
- Showalter, A. M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9–23.
- Schnepf, R. 2010. Cellulosic ethanol: feedstocks, conversion technologies, economics, and policy options. CRS Report for Congress. 7-5700: 1-73.
- Schmer, M. R., Vogel, K. P., Mitchell, R. B. y R. K. Perrin, 2008. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2), 464-469.

- Sun, Y. y J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1–11.
- Sun, R. C., Tomkinson J., Ma P.J. y S. F. Liang. 2000b. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydrate Polymers*. 42: 111-122.
- Statistical Review of World Energy. 2015. Renewable energy. 64th. Printed London. UK. pp. 48.
- UNCTAD. 2014. The State of the biofuels market: Regulatory, trade and development perspectives. pp. 104.
- van der Weijde, Alvim, K, C. L., Torres, F. A., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, F.G.R. y M. S. Trindade. 2013. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Plant Sci*. 4(107):1-18.
- Vázquez, B. T. R. 2012. Evaluación de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo para la obtención de azúcares fermentables a etanol y efecto de diferentes pretratamientos. Tesis. Química en alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 154.
- Vogel, J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:301–307.
- Waldron, K. W., Parker, M. L. y A. C. Smith. 2003. Plants cell walls and food quality. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2:101-119.
- Whitney, S. E., Brigham, J. E., Darke, A.H., Reid, J.S.G. y M. J.Gidley. 1998. Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. *Carbohydr. Res*. 307:299-309.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. y W. Chulalaksanankul. 2012. The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. *J. Biomed. Biotech*. 2012: 303748.
- Wyman, C. E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass—Technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol*. 50 (1): 3-16.
- Wyman, C. E., Decker, R. S., Himmel, E. M., Brady, W. J., Skopec, E. C. y L. Viikari. 2005. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. *In Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. New York, USA: Marcel Dekker. pp.995-1033.
- Zabel, R. y J. Morrel. 1992. Decay and its prevention. San Diego California: Academic press.

CAPÍTULO I

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA DEL PASTO MARALFALFA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

Joel Ventura Ríos, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El objetivo de este experimento fue evaluar la producción de biomasa, composición química, análisis proximal, poder calorífico y rendimiento de bioetanol del pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone, cosechado a seis frecuencias de corte. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en un diseño experimental de bloques al azar en parcelas divididas con tres repeticiones. El análisis de resultados se efectuó mediante el procedimiento GLM de SAS y comparación de medias (Tukey, $\alpha= 0.05$). La mayor producción de biomasa, poder calorífico y rendimiento de bioetanol se encontró en la frecuencia de corte de 180 días con 28.5 Mg MS ha⁻¹; 18.2 MJ kg⁻¹ MS; 6982 L ha⁻¹ de etanol ($p<0.05$), respectivamente. El contenido de cenizas y materia volátil fue mayor ($p<0.05$) en la frecuencia de corte de 60 y 150 días (9.6% y 77.8%, respectivamente); mientras que el contenido de humedad y carbono fijo fue mayor en la frecuencia de corte de 30 días (8.4% y 18.4%, respectivamente). La composición química varió de manera significativa ($p<0.01$) entre los diferentes estados fisiológicos, mientras el contenido de extractivos fue mayor ($p<0.05$) en la frecuencia de corte de 150 días (15.1%). El rendimiento de biomasa, composición química, poder calorífico y análisis proximal del pasto maralfalfa permiten que sea una buena fuente bioenergética para la industria de los combustibles líquidos.

Palabras clave: *Cenchrus*, bioetanol, composición química, análisis proximal, poder calorífico.

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOMASS YIELD OF MARALFALFA GRASS FOR PRODUCTION OF SECOND GENERATION BIOETHANOL

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate biomass production, chemical composition, proximate analysis, calorific value and yield of bioethanol maralfalfa grass (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone under six cutting frequencies. Treatments were allocated randomly in a randomized block design in split plots with three replications. Analysis of results was performed using SAS's GLM procedure and then a comparison of means (Tukey, $\alpha = 0.05$) was used. The highest biomass production, calorific value and bioethanol yield were found in the cutting frequency of 180 days with 28.5 Mg DM ha⁻¹; 18.2 MJ kg⁻¹ DM; 6982 L ha⁻¹ of ethanol ($p < 0.05$), respectively. The highest ash concentration and volatile matter ($p < 0.05$) were found in the cutting frequency of 60 and 150 days (9.6% and 77.8%, respectively); while the moisture content and fixed carbon was greater in the cutting frequency of 30 days (8.4% and 18.4%, respectively). The chemical composition varied significantly ($p < 0.01$) among the different physiological states, while extractive content was higher ($p < 0.05$) in the cutting frequency of 150 days (15.1%). The biomass yield, chemical composition, heating value and proximate analysis of maralfalfa grass allow it to be a good bioenergetic source for the industry of liquid fuels.

Keywords: *Cenchrus*, bioethanol, chemical composition, proximate analysis, calorific value.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de energía renovable, particularmente biocombustible líquido a partir de biomasa lignocelulósica es una estrategia de investigación con el fin de coadyuvar a la producción de hidrocarburos, disminuir la contaminación ambiental y reducir la acumulación de CO₂ en la atmósfera (Mohammed *et al.*, 2015). En los últimos años, la producción de bioetanol de primera generación ha sido muy debatida por emplear materia prima para la producción de alimentos e incrementar sus costos, donde Brasil y Estados Unidos de Norte América, en conjunto representan 89% de la producción mundial de bioetanol, a partir de maíz (almidón) y jugo de caña de azúcar (sacarosa).

La producción de bioetanol de segunda generación es una alternativa futura, dado que los recursos agrícolas son abundantes en la naturaleza; sin embargo, los estudios en esta área aún son limitados. En trabajos previos se ha evaluado la composición química de gramíneas con el fin de generar bioenergía; así, van der Weijde *et al.* (2013) reportaron del 28-49% de celulosa, 24-34% de hemicelulosa y 10-30% de lignina; por su parte, Parikh *et al.* (2005) encontraron en el análisis proximal concentraciones de 18.6%, 72.7%, 8.6%; para carbono fijo, materia volátil y cenizas, respectivamente y, 17.3 MJ kg⁻¹ de poder calorífico. Debido a su composición química, las gramíneas pueden ser consideradas una fuente importante en la industria del bioetanol. Por otro lado, las gramíneas son de rápido crecimiento, resistentes a plagas y enfermedades y para su establecimiento se requiere una inversión mínima comparado con otros cultivos agrícolas.

En el trópico subhúmedo de México, en la última década se han introducido variedades del género *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, [previamente *Pennisetum purpureum*, (Chemisquy *et al.*, 2010)] para uso común en la alimentación animal, con el propósito de incrementar los índices de producción de carne y/o leche, debido a su mayor potencial de crecimiento y capacidad de producción de 37 Mg MS ha⁻¹ (Calzada *et al.* 2014); sin embargo, hay pocos estudios que muestran la edad óptima en que se alcanza la mayor producción y composición química de la biomasa para un mejor aprovechamiento (Ramos *et al.*, 2013).

Los estudios con gramíneas como fuentes lignocelulosicas para la producción de bioetanol son limitados en México (Aburto *et al.*, 2008), aunque actualmente se han incrementado las investigaciones con la finalidad de aumentar los rendimientos y la conversión de sus carbohidratos en azúcares fermentables y obtención de etanol con una relación costo - beneficio factible para las empresas. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la composición química, poder calorífico, análisis proximal y rendimiento teórico de bioetanol del pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone cosechado a diferentes frecuencias de corte con el fin de utilizarse como materia prima en la producción de bioetanol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Datos del experimento.

El experimento se realizó en el Sitio Experimental “Papaloapan” de INIFAP, a 18° 06' LN y 95° 31' LO y 65 msnm, en Cd. Isla, Veracruz, con clima A_{wo} y temperatura media anual de 25.7 °C (García, 1988). La siembra se efectuó el 22 de julio de 2011, en surcos con separación de 0.50 m, en parcelas experimentales de 5 metros de ancho por 16 metros de largo. Las praderas se fertilizaron con la siguiente formula: 120-80-00 kg/ha de N y P₂O₅, el N se dividió en dos aplicaciones a los 43 y 112 días después de la siembra. El suelo es acrisol órtico, franco-arenoso, con pH de 4 a 4.7, pobre en materia orgánica, nitrógeno, calcio, potasio y contenidos medios a altos de fósforo y magnesio (Enríquez y Romero, 1999). Los tratamientos consistieron en seis frecuencia de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días) distribuidos en un diseño de bloques al azar en parcelas divididas, donde la parcela mayor fue el pasto y la menor la frecuencia de corte, con tres repeticiones. Las determinaciones físico-químicas de materia seca (MS) del pasto, se realizaron en el laboratorio de materiales lignocelulósicos del INIFAP, en San Martinito, Puebla, con excepción del contenido de N, el cual se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos y química ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se determinó: rendimiento de biomasa, composición química, extractivos, holocelulosa, celulosa, lignina y N; análisis proximal: humedad, carbono fijo, materia volátil, cenizas y poder calorífico.

2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha⁻¹).

Se determinó para cada frecuencia de corte [30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del corte de homogeneización (**ddch**)], mediante muestreos destructivos, durante un año. Para ello, en cada parcela se cosecho un área central de 2 m x 3 m, dejando un metro de borde en cada lado y 50 cm entre frecuencias de corte (6 m²) y se cortó el forraje total (planta entera), dejando el remanente a 20 cm de altura, para la recuperación de la planta. La biomasa cosechada se pesó en balanza de precisión (Ohaus, Mod. GT-4000; 6.200 kg ± 0.1 g). Posteriormente, se tomó una submuestra, se registró el peso fresco y se introdujo en una estufa de aire forzado (Felisa, Mod. FE-243A), a 55°C hasta peso constante y se calculó la cantidad de materia seca (MS). Las muestras secas fueron después pulverizadas en un molino Wiley[®] (Arthur H. Tomas, Philadelphia, PA, USA) y tamizadas en mallas del No. 40 (0.42 - 1.00 mm) y No. 60 (0.25 - 0.42 mm), para posteriormente realizar las determinaciones químicas y de poder calorífico.

2.3 Composición química.

Para liberación de extractivos, se utilizó la norma TAPPI T-264. El contenido de holocelulosa se determinó por el método de cloración ácida (Rowell *et al.*, 2005) y la norma ASTM D1104, para celulosa. La hemicelulosa se obtuvo substrayendo la celulosa de la holocelulosa. La lignina se determinó conforme a la norma TAPPI T-222 os-74 y el N por el método semi-micro Kjeldahl (AOAC-984.13; 1990). Se tomaron dos sub-repeticiones por parcela, realizando seis determinaciones por frecuencia de corte.

2.4 Análisis proximal.

Para la determinar humedad, material volátil y cenizas se utilizaron las Normas ASTM E871, ASTM E872 y ASTM D 1102-84, respectivamente, y para carbono fijo se empleó la fórmula: $(CF) = 100 - (\text{Humedad} + \text{Cenizas} + \text{Material Volátil})$. Se efectuaron 3 muestras por repetición, realizando nueve determinaciones por frecuencia de corte.

2.5 Poder calorífico.

Se determinó en un calorímetro de bomba adiabática (Isoperibol, Parr 1266) acorde a la norma ASTM (E711) y una temperatura de 30 ± 0.5 °C, con pastillas comprimidas de peso igual o menor a 1 g. Al mismo tiempo, se determinó contenido de humedad de las muestras en balanza térmica Ohaus MB45[®]. Se realizaron cinco determinaciones por repetición, es decir 15 muestras por frecuencia de corte.

2.6 Estimación del rendimiento teórico de bioetanol.

Se utilizó la fórmula propuesta por Badger (2002) en base a la composición química de la materia seca.

Para Celulosa: $B = C * ER * E * EFG$

Dónde:

$B =$ kg de bioetanol/tonelada biomasa

$C =$ kg de celulosa/tonelada de biomasa

$ER =$ Eficiencia de recuperación (0.76)

$E =$ Estequiometría del etanol (0.51)

$EFG =$ Eficiencia de la fermentación de la glucosa (0.75)

Para Hemicelulosa: $B = H * ER * E * EFX$

Dónde:

$B =$ kg de bioetanol/tonelada biomasa

$H =$ kg de hemicelulosa/tonelada de biomasa

$ER =$ Eficiencia de recuperación (0.90)

$E =$ Estequiometría del etanol (0.51)

$EFX =$ Eficiencia de la fermentación de la xilosa (0.50)

2.7 Análisis estadístico.

Los datos se agruparon de manera anual, para su análisis estadístico. Se utilizó un modelo de análisis de varianza de bloques al azar donde los factores de estudio fueron: la frecuencia de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 ddch) con tres repeticiones. La comparación múltiple de las medias de tratamientos se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), mediante el procedimiento estadístico PROC GLM del software SAS para Windows versión 9.3 (SAS, 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento de biomasa.

La producción anual de forraje se incrementó linealmente a medida que la planta avanzó en su desarrollo fisiológico; la mayor producción se obtuvo en la frecuencia de corte de 180 días con 28.5 Mg MS ha⁻¹ y fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1). La frecuencia de corte de 180 días superó considerablemente a las demás frecuencias ($p < 0.05$) y produjo 248 y 97% más biomasa que las frecuencias de corte de 30 y 60 días, respectivamente. Las frecuencias de corte al día 90, 120 y 150 fueron similares ($p > 0.05$) y produjeron 18, 20.2 y 18.7 Mg MS ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente. La cosecha a cada 120 días fue superior en 4.8 Mg MS ha⁻¹ a lo reportado por Rengsirikul *et al.* (2013) en pasto taiwán quienes obtuvieron 15.4 Mg MS ha⁻¹ cuando el pasto fue cortado a cada 120 días. Por su parte, Cárdenas *et al.* (2012) reportaron 18.2 Mg MS ha⁻¹ cortando a cada 90 días al pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), rendimiento similar al registrado en este estudio (18 Mg MS ha⁻¹). No obstante, que la frecuencia de corte de 180 días, fue inferior en 2.3 y 1.9 Mg MS ha⁻¹ a lo obtenido por Amador *et al.* (2010) quienes reportaron 30.8 y 30.4 Mg MS ha⁻¹ en *Pennisetum* sp. cultivar morado y verde cortado a cada 120 días.

3.2 Carbono fijo.

Es la masa residual después de la liberación de volátiles, excluyendo ceniza y humedad (McKendry, 2002). El mayor contenido de carbono fijo se encontró en edades tempranas (Cuadro 1), al cosechar a cada 30 (18.4%), 60 (17.5%) y 90 (17.7%) días, sin presentar diferencias ($p>0.05$); sin embargo, la frecuencia de corte a cada 30 días fue diferente ($p<0.05$) a las frecuencias de corte de 120 (16.7%), 150 (16.9%) y 180 (16.6%) días, los cuales mostraron el menor contenido (Cuadro 1). En estudios previos, Parikh *et al.* (2005) obtuvieron 18.6% de carbono fijo en pasto sudán (*Sorghum drummondii*), el cual es similar a la frecuencia de corte a cada 30 días, que presentó el mayor contenido de carbono fijo. Por otro lado, Jenkins *et al.* (1998) reportaron 17.7% en paja de trigo, el cual coincide con las frecuencias de corte a cada 60 (17.5%) y 90 (17.7%) días; así mismo, en la frecuencia de corte al día 120 (16.7%), 150 (16.9%) y 180 (16.6%) los contenidos de carbono fijo fueron similares ($p>0.05$) y coinciden con lo reportado en paja de arroz (16.7%). Al respecto, Brosse *et al.* (2012) argumentan que el contenido de carbono fijo es variable en gramíneas, ya que está relacionado con la composición química de la pared celular.

3.3 Materia volátil.

El contenido en volátiles es una variable importante, ya que indica la reactividad y velocidad de combustión de la biomasa y generalmente las gramíneas y bagazos contienen entre 48% y 87% (Parikh, *et al.*, 2005). En material volátil, las frecuencias de corte de 120 (76.5%), 150 (77.8%) y 180 (77.6%) días, no fueron diferentes ($p>0.05$); sin embargo, fueron superiores ($p<0.05$) a las frecuencias de corte a cada 90 (74.8%), 60 (72.8%) y 30 (72.2%) días, que mostraron el menor contenido volátil (Cuadro 1). En estudios previos, Demirbas (2004) reportó material volátil de 76.7% en el pasto switchgrass (*Panicum virgatum*) el cual es similar a las frecuencias de corte de 120, 150 y 180 días, que mostraron el mayor contenido ($p>0.05$). Por otro lado, Brosse *et al.* (2012) reportaron volátiles de 72.6% en *Miscanthus giganteus*, el cual es similar a las frecuencias de corte al día 30 (72.2%) y 60 (72.8%) que registraron el menor contenido ($p>0.05$).

3.4 Cenizas.

El mayor contenido de cenizas se presentó en edades tempranas, en las frecuencias de corte de 30 (9.2%) y 60 (9.6%) días, con cantidades similares de cenizas ($p>0.05$) pero superiores

($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1). Las frecuencias de corte a cada 90 (7.3%) y 120 (6.7%) días, fueron similares en su contenido de cenizas ($p > 0.05$) pero superiores y diferentes ($p < 0.05$) a las frecuencias de corte de 150 (5.1%) y 180 (5.6%) días. Similarmente, Cárdenas *et al.* (2012) obtuvieron cantidades de ceniza en pasto maralfalfa de 8.6% a 30 días y de 6% a 60 días de corte, los cuales son menores en 6.5% y 37.5% a lo encontrado en este estudio, en la misma frecuencia de corte; así mismo, reportaron 7% a los 150 días de corte, el cual fue superior en 37.2% a lo observado en el presente experimento. Al respecto, Rengsirikul *et al.* (2013) argumentan que el contenido de material inorgánico y el contenido de humedad están relacionados con la especie, las condiciones de crecimiento y la edad al corte, siendo mayor su contenido en edades tempranas.

3.5 Humedad.

El mayor contenido de humedad se presentó en el corte a cada 30 días (8.4%), el cual fue superior y diferente ($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1); entre los cortes a cada 60 (7.5%), 90 (7.2%), 120 (6.9%), 150 (7.4%) y 180 (7.4%) días no hubo diferencias estadísticas ($p > 0.05$). En trabajos previos, Channiwala y Parikh (2002) reportaron 8.1% en paja de arroz, el cual es similar al corte de 30 días que mostró el mayor contenido de humedad. Por otro lado, Demirbas (2004) registró 7.4% de humedad para paja de trigo, el cual es similar a las frecuencias de corte a cada 60, 90, 120, 150 y 180 días ($p > 0.05$). En los materiales lignocelulósicos se busca que el contenido de humedad sea menor a 50%, ya que el contenido de energía disponible (MJ kg^{-1} MS) depende del contenido de humedad; así mismo, las condiciones ambientales de secado y almacenamiento del material pueden modificar el desempeño energético (McKendry, 2002).

3.6 Poder calorífico.

El mayor contenido de poder calorífico se presentó en la frecuencia de corte de 180 días (18.2 MJ kg^{-1} MS), el cual fue superior y diferente ($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1); entre los cortes a cada 30 (15.7 MJ kg^{-1} MS), 60 (16.1 MJ kg^{-1} MS), 90 (16.1 MJ kg^{-1} MS), 120 (16.3 MJ kg^{-1} MS) y 150 días (16.7 MJ kg^{-1} MS) no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). En trabajos previos, Jenkins *et al.* (1998) y Parikh *et al.* (2005) reportaron 18.0 y 17.8 MJ kg^{-1} MS para switchgrass (*Panicum virgatum*) y rastrojo de maíz, respectivamente, los cuales concuerdan con el mayor poder calorífico registrado en la frecuencia de corte de 180 días. Al

Cuadro 1. Rendimiento anual de biomasa, análisis proximal y poder calorífico del pasto maralfalfa a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte	Rendimiento de biomasa (Mg ha ⁻¹ año ⁻¹)	Análisis proximal				Poder calorífico (MJ kg ⁻¹ MS)
		Carbono fijo (%)	Materia volátil (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	
30	8.2(±0.99) ^d	18.46(±1.40) ^a	72.28(±1.47) ^c	9.25(±0.22) ^a	8.48(±0.49) ^a	15.70(±0.51) ^b
60	14.5(±1.57) ^c	17.51(±0.82) ^{ab}	72.81(±0.69) ^c	9.66(±0.83) ^a	7.57(±0.54) ^b	16.14(±0.30) ^b
90	18.0(±4.33) ^b	17.78(±0.61) ^{ab}	74.84(±1.58) ^b	7.37(±1.21) ^b	7.29(±0.53) ^b	16.14(±0.16) ^b
120	20.2(±5.99) ^b	16.74(±0.66) ^b	76.52(±0.90) ^a	6.72(±0.39) ^b	6.94 (±0.37) ^b	16.39(±0.38) ^b
150	18.7(±4.18) ^b	16.94(±0.53) ^b	77.86(±0.90) ^a	5.18(±0.45) ^c	7.46(±0.35) ^b	16.73(±0.42) ^b
180	28.5(±4.16) ^a	16.65(±0.66) ^b	77.65(±1.11) ^a	5.68(±0.66) ^c	7.48(±0.81) ^b	18.27(±2.74) ^a
MEDIA	18.0 (±7.2)	17.35 (±1.06)	75.33 (±2.51)	7.31(±1.83)	7.54 (±0.72)	16.5(±1.4)

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma columna, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

respecto, Parikh *et al.* (2005) reportaron 15.6 MJ kg⁻¹ MS en paja de arroz, el cual concuerda con la frecuencia al día 30 que mostró el menor contenido energético (15.7 MJ kg⁻¹ MS).

3.7 Holocelulosa.

El mayor contenido de holocelulosa se encontró en la frecuencia de corte al día 60 (66.0%) el cual fue diferente ($p<0.05$) y superior a la frecuencia de corte de 150 (60.2%) y 180 (63.3%) días (Cuadro 2). En trabajos previos, Rengsirikul *et al.* (2013) reportaron 67.4% de holocelulosa para el cultivar taiwán (*Pennisetum purpureum*), el cual es superior en 2% a la frecuencia de corte de 60 días. Por otro lado, Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) obtuvieron un contenido de holocelulosa de 63.8% para pasto king grass (*Pennisetum* sp.), similar al registrado en las frecuencias de corte de 30, 90, 120, y 180 días, los cuales no mostraron diferencias estadísticas entre ellos, en su contenido de holocelulosa ($p>0.05$).

3.8 Celulosa.

La celulosa constituye del 28 a 49% del total de la biomasa seca en gramíneas (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012). El mayor contenido de celulosa se encontró en la frecuencia de corte al día 60 (39.4%), el cual fue diferente ($p<0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 2). La frecuencia de corte a cada 60 días superó en 4.8% a la frecuencia de corte a cada 150 días, la cual presentó el menor contenido; sin embargo, entre las demás frecuencias de corte no hubo diferencias estadísticas ($p>0.05$) en el contenido de celulosa. En estudios previos, Rengsirikul *et al.* (2013) reportaron 35.4% de celulosa para el cultivar enano (*Pennisetum* sp.), el cual superó en 2% al corte del día 150 que presentó el menor contenido; sin embargo, el corte cada 60 días superó en 11% a lo obtenido por Rengsirikul *et al.* (2013). Por otro lado, Mateus *et al.* (2012) reportaron 34.3% de celulosa en el pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), similar al contenido de celulosa observado al cosechar cada 90, 120, 150 y 180 días.

3.9 Hemicelulosas.

El mayor contenido de hemicelulosas se presentó en el corte a cada 120 (28.5%) días y superó ($p<0.05$) a la frecuencia de corte de 150 días (25.5%) (Cuadro 2). En trabajos previos, Mateus *et al.* (2012) reportaron 22.5% de hemicelulosas para el cultivar maralfalfa, el cual es menor en tres unidades porcentuales al corte del día 150. Por otro lado, Wongwatanapaiboon *et al.* (2012), registraron concentraciones de hemicelulosas de 31.1% en pasto king grass (*Pennisetum* sp.), el cual es superior en 2.6% al obtenido por la frecuencia de corte de 120 días. Las hemicelulosas

Cuadro 2. Composición química del pasto maralfalfa a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte	Holocelulosa (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Extractivos (%)	Proteína (%)
30	64.47(±0.22) ^{ab}	36.92(±0.76) ^b	27.55(±0.61) ^{ab}	18.41(±0.67) ^b	7.84(±0.27) ^{cd}	8.79(±1.14) ^a
60	66.09(±0.71) ^a	39.44 (±0.59) ^a	26.64(±0.43) ^{bc}	18.55 (±0.68) ^b	6.93(±0.52) ^d	7.87(±1.68) ^a
90	64.11(±1.86) ^{ab}	36.09(±1.18) ^{bc}	28.02(±0.87) ^{ab}	18.80(±2.29) ^b	9.64(±3.23) ^{bcd}	4.90(±0.99) ^b
120	65.00(±1.31) ^{ab}	36.40(±2.16) ^{bc}	28.59(±1.41) ^a	19.49(±1.56) ^{ab}	10.06(±1.9) ^{bc}	4.13(±0.87) ^b
150	60.20(±0.47) ^c	34.63(±0.30) ^c	25.57(±0.26) ^c	20.37(±0.52) ^{ab}	15.18(±0.40) ^a	3.04(±0.23) ^b
180	63.39(±1.23) ^b	34.94(±0.49) ^{bc}	28.45(±1.46) ^{ab}	21.61(±0.63) ^a	11.68(±0.87) ^b	3.21(±0.15) ^b
MEDIA	63.88(±2.18)	36.40 (±1.95)	27.47(±1.45)	19.54(±1.71)	10.22 (±3.18)	5.32(±2.47)

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma columna, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

son polímeros de hidratos de carbono bastante complejos y constituyen entre 25 y 50% a la biomasa seca en gramíneas (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012), las cuales varían con forme se incrementa la edad en la planta.

3.10 Lignina.

La lignina representa del 10 al 30% del total de la biomasa seca en gramíneas (Vogel, 2008). El mayor contenido de lignina se presentó en la frecuencia de corte de 180 días con 21.6%, siendo superior y diferente ($p < 0.05$) a las frecuencias de corte de 30 (18.4%), 60 (18.5%) y 90 (18.8%) días (Cuadro 2). Por su parte, Lima *et al.* (2014) reportaron 22.8% para el género *Pennisetum purpureum*, el cual es superior en 1.2% a la frecuencia de corte de 180 días. Sin embargo, la lignina en las frecuencias de corte al día 30, 60 y 90 fueron superior en 13%, 13.4% y 15%, respectivamente, a lo reportado por Mateus *et al.* (2012) quienes encontraron 16.3% de lignina en el cultivar maralfalfa (*Pennisetum* sp.). El contenido de lignina es variable dependiendo de la especie, ya que el estado fenológico de la planta se ve modificado conforme se incrementa la edad, así también la época de lluvias o seca pueden modificar la estructura de la pared celular (Rengsirikul *et al.*, 2013).

3.11 Extractivos.

Para realizar la determinación de los compuestos químicos principales es necesario eliminar el material no estructural de la biomasa antes del análisis para evitar interferencia con etapas analíticas posteriores (Sluiter *et al.*, 2008). El mayor contenido de extractos se presentó en la frecuencia de corte a cada 150 días (15.5%) que fue diferente ($p < 0.05$) y superior a las demás frecuencias de corte (Cuadro 2). En promedio el contenido de extractos fue de 10.2%, el cual es similar a lo registrado por Mateus *et al.* (2012) quienes reportaron 10.7% para el cultivar maralfalfa (*Pennisetum* sp.).

3.12 Proteína.

El mayor contenido de proteína se presentó en etapas tempranas, la frecuencia de corte a cada 30 y 60 días registraron un contenido del 8.7% y 7.8% (Cuadro 2); la proteína en estas frecuencias de corte, fueron superiores y diferentes a las demás frecuencias de corte ($p < 0.05$). La cantidad de proteína, fue disminuyendo a medida que se incrementó la edad, lo cual es un comportamiento

normal en las gramíneas. Al respecto, Ramírez *et al.* (2013) argumentan que el nitrógeno se absorbe rápidamente por el sistema radical en etapas vegetativas tempranas, cuando el pasto acelera su crecimiento la cantidad de nitrógeno se diluye dado que el incremento de MS no-nitrogenada supera a la absorción de este elemento.

Por otro lado, Chacón y Vargas (2009) reportaron concentraciones de 9.5% y 8.4% ($p<0.05$) para el cultivar king grass cortado a 60 y 90 días, los cuales son superiores en 9.1% y 7.6% respectivamente, a lo encontrado en el presente estudio. Así mismo, Cárdenas *et al.* (2012) reportaron concentraciones de 12%, 9.5% y 8.2% de proteína cruda en hoja a 30, 60 y 90 días, respectivamente en pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), lo cual indica reducciones del 2.5% al pasar del corte 30 a 60 días, y una disminución del 4% al pasar del corte 30 a 90 días ($p<0.05$); estos resultados siguen una tendencia similar a lo obtenido en el presente estudio que mostró una disminución en el contenido de proteína conforme aumento el intervalo entre cortes. La composición química está relacionada con los componentes morfológicos de la planta y, en cultivares con mayor proporción de hojas, la cantidad de proteína tiende a ser mayor. Sin embargo, en estudios previos los resultados reportados para pastos tropicales indican que conforme aumenta la edad de corte del pasto corresponde una mayor producción de materia seca y un menor contenido de proteína (Villarreal, 1994).

3.13 Rendimiento de bioetanol.

En base a los cálculos propuestos por Badger (2002) el mayor contenido de glucosa y xilosa provenientes de la celulosa y hemicelulosas respectivamente, indicaron que el mayor rendimiento de bioetanol por hectárea se obtiene en la frecuencia de corte a cada 180 días con 2893.5 (± 395.8) y 1875.5 (± 352.3) kg ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente, los cuales fueron diferentes ($p<0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 3); estas cantidades pueden producir un total de 4769 (± 747.0) kg ha⁻¹ año⁻¹ de bioetanol o su equivalente 6037 (± 945.6) L ha⁻¹ año⁻¹ (Cuadro 3). La frecuencia de corte a cada 180 días produjo 2002 litros más que la frecuencia de corte cada 30 días ($p<0.05$), así mismo superó en 1229 litros a la frecuencia de corte de 60 días ($p<0.05$); entre las frecuencias de corte a cada 90 (3839 L), 120 (4430 L) y 150 (3781 L) días no hubo diferencias estadísticas ($p>0.05$); aunque la cantidad de bioetanol en estas frecuencias fueron superiores a la frecuencia de corte de cada 30 días (1789 L ha⁻¹ año⁻¹), que presentó el

menor rendimiento. El pasto maralfalfa cortado a cada 180 días produjo 6037 (± 945.6) litros ha^{-1} año $^{-1}$, éste rendimiento es menor en 195 litros comparado con el obtenido por Lima *et al.* (2014) quienes reportaron 6231.4 L ha^{-1} en el pasto *Brachiaria brizanta*.

Así mismo, Lima *et al.* (2014) obtuvieron 8478.6 L ha^{-1} para bagazo de caña de azúcar y 8571 L ha^{-1} en *Panicum maximum*, los cuales son superiores en 2442 y 2534 litros a lo encontrado en el presente estudio cuando el pasto fue cortado a cada 180 días. El rendimiento de bioetanol fue variable en cada frecuencia de corte, al respecto Badger (2002) argumenta que se debe al contenido de celulosa y hemicelulosas presente en la planta al momento del corte, el cual se ve modificado con respecto al estado fenológico de la planta; así mismo, menciona que aunque microorganismos como la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sean utilizados de manera comercial y con buenos rendimientos en la fermentación, aún no se logra obtener el 100% de eficiencia, ya que en este proceso los microorganismos usan parte de la glucosa para su crecimiento, siendo así el rendimiento teórico menor al 100%; por ejemplo 100 g de glucosa producen 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono.

Al respecto, Basilio *et al.* (2008) mencionan que las hexosas (azúcares de seis carbonos), principalmente la glucosa, pueden ser fermentados fácilmente por levaduras; sin embargo, pentosas o azúcares de cinco carbonos, como la xilosa, provenientes de las hemicelulosas, no son fermentados fácilmente e investigaciones son conducidas actualmente para desarrollar microorganismos específicos para este tipo de azúcares que están presentes en los materiales lignocelulósicos. Es importante recalcar que la eficiencia en la conversión de azúcares simples a bioetanol depende del contenido de extractivos, lignina y material volátil, ya que estos compuestos no son deseables en los procesos industriales, para el presente estudio, estos contenidos fueron en aumento conforme la edad fisiológica de la planta incremento, lo cual limitó una mejor eficiencia en cada frecuencia de corte. Así mismo, Demirbas (2005), menciona que los pastos son altos en sílice y material inorgánico y, algunas especies contienen por arriba del 15%, lo cual limita aún más la eficiencia en la conversión de azúcares reductores a bioetanol.

Cuadro 3. Rendimiento de bioetanol del pasto maralfalfa a seis frecuencias de corte.

Días después del corte de homogeneización	Rendimiento de bioetanol (kg ha ⁻¹ año ⁻¹)			Litros ha ⁻¹ año ⁻¹
	Glucosa	Xilosa	Total	
30	890.9 (±124.21) ^c	522.5(±53.6) ^d	1413.4(±176.9) ^d	1789.1(±223.9) ^d
60	1664.5(±174.5) ^b	888.7(±103.6) ^{cd}	2553.2(±277.0) ^c	3231.9(±350.7) ^c
90	1877.0(±404.4) ^b	1155.6(±273.17) ^{bc}	3032.6(±677.0) ^{bc}	3838.7(±857.0) ^{bc}
120	2174.7(±750.8) ^b	1324.6(±377.5) ^b	3499.3(±1122.7) ^b	4429.5(±1421.2) ^b
150	1885.8(±421.7) ^b	1100.8(±253.7) ^{bc}	2986.6(±675.3) ^{bc}	3780.6(±854.9) ^{bc}
180	2893.5(±395.8) ^a	1875.5(±352.3) ^a	4769.0(±747.0) ^a	6036.7(±945.6) ^a
MEDIA	1898±745.82	1145±496.91	3042±1237	3851±1566

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma columna, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

4. CONCLUSIONES

La biomasa que proporciona el mejor sustrato (glucosa y xilosa) por unidad de área para la producción de bioetanol y poder de combustión, se obtuvo al cosechar a cada 180 días. En edades tempranas las plantas contienen mayor proporción de N, elementos inorgánicos, humedad y carbono fijo, de tal manera que estos compuestos van disminuyendo conforme incrementa la etapa fenológica de la planta. El rendimiento de biomasa y características químicas del pasto maralfalfa lo convierten en una alternativa potencial para la obtención de bioetanol en áreas tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial CONACyT-SENER Sustentabilidad Energética a través del Proyecto No. 151370 por el apoyo en los análisis químicos y al laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP en Puebla, Méx.

5. LITERATURA CITADA

- Aburto, J., Martínez, T. y F. Murrieta. 2008. Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnol. Ciencia. Ed. (IMIQ)*. 23 (1): 23-30.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA. 1298 p.
- Amador, M., Rodríguez, J.C. y A. Arroyo. 2010. Dinámica del rendimiento y digestibilidad del King grass en tres frecuencias de corte. *Tierra tropical*. 6(1):63-69.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1977. Method of test for Holocellulose in wood ASTM D1104-56. *Annual book of ASTM standards. Part 22: Wood; Adhesives*. Pennsylvania: ASTM. pp.346-348.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 2009. Standard test method for ash in wood. ASTM D1102, *Annual Book of ASTM Standards, Volume 04.10 Wood* pp. 174-175.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 2012. *Annual book of ASTM standards, volume 11.16 Biological effects and enviromental fate; biotechnology*. ASTM E870 pp. 96-97, ASTM E871, pp.98-99, ASTM E-872, pp.100-102.
- American Society for Testing and Materials (ASTM).1996. Standard test method for gross calorific value of refuse-derived fuel by the bomb calorimeter. ASTM E711, *Annual Book of ASTM Standards. Waste management*, pp. 265-271.
- Badger, C. P. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. *Trends in new crops and new uses*. J. Janick y A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA.
- Basílio, A. C. M., De Araújo P. R. L., De Moraes, J. O. F., Da Silva F. E. A., De Moraes, M. A. y D. A. Simões. 2008. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr. Microbiol.* 56: 322-326.
- Brosse, N., Dufour, A., Meng, X., Sung, Q. y A. Ragauskas. 2012. *Miscanthus*: a fast - growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6:580-598.
- Calzada, M. J. M., Enríquez, Q. J. F., Hernández, G. A., Ortega, J. E. y S. I. M. Pedroza. 2014. Análisis de crecimiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) en clima cálido subhúmedo. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 5(2): 247-260.

- Cárdenas, M. J. V., Sandoval, C. C. y S. F. J. Solorio. 2003. Composición química de ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas de Yucatán, México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 41(3): 283-294.
- Cárdenas, R. L. R., Pinto, R. R., Medina, F. J., Guevara, F., Gómez, H., Hernández, A. y J. Carmona. 2012. Producción y calidad del pasto maralfalfa (*Pennisetum sp*) durante la época seca. *Quehacer Científico en Chiapas.* 1(13): 38-46.
- Cardona, M. E., Ríos, A. J., Peña, D. J. y A. L. Ríos. 2013. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum sp*) y king grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de bioetanol. *Información Tecnológica.* Vol. 24(5), 69-80.
- Chacón, H. P. A. y R. C. F. Vargas. 2009. Digestibilidad y calidad del *Pennisetum purpureum* cv. king grass a tres edades de rebrote. *Agronomía mesoamericana* 20(2): 399-408.
- Channiwala, A. S. y P.P. Parikh. 2002. A unified correlation for estimating HHV of solid, liquid and gaseous fuels. *Fuel* 81: 1051-1063.
- Chemisquy, A. M., Giussani M. L., Scataglini, A.M., Kellogg, A. E. y O. Morrone. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany* 106: 107-130.
- Demirbas, A. 2005. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. *Prog. Energy. Combust. Sci.* 31:171-192.
- Demirbas, A. 2004. Combustion characteristics of different biomass fuels. *Prog. Energy. Combust. Sci.* 30: 219-230.
- Enríquez, Q. J. F. y J. M. Romero. 1999. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria sp.* en Isla, Veracruz. *Agrociencia.* 33(2):141-148.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM; México. 217p.
- Jenkins, M. B., Baxter, L. L., Miles Jr, T. R. y R. T. Miles. 1998. Combustion properties of biomass. *Fuel Process Technol.* 54: 17-46.
- Lima, M. A., Gomez, D. L., Steele-King, G. C., Simister, R., Bernardinelli, D., Carvalho, M. A., Rezende, A. C., Labate, C. A., R deAzevedo, E., McQueen-Mason, S. J. y I. Polikarpov.

2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnol. Biofuels.* 7:1-19
- Mateus, L., Hernández, O., Velázquez, M. y J. De J. Díaz. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of goliath grass (*Pennisetumglaucum* x *Pennisetumpurpureum*) for ethanol cellulosic. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV: 146-156.
- Martínez, M. D., Hernández, G. A., Enríquez, Q. J. F., Pérez, P. J., González, M. S. S. y G. J. H. Herrera. 2008. Producción de forraje y componentes del rendimiento de pasto *Brachiaria humidicola* CIAT 6133 con diferente manejo de la defoliación. *Téc. Pecu. Méx.* 46:427-438.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol.* 83: 37- 46.
- Mohammed, Y. I., Abakr, A. Y., Kazi, K. F., Yusup, S., Alshareef, I. y A. Chin. 2015. Comprehensive characterization of napier grass as a feedstock for thermochemical conversion. *Energies.* 8: 3403-3417.
- Parikh, J., Channiwala, S. A. y K. G. Ghosal. 2005. A correlation for calculating HHV from proximate analysis of solid fuels. *Fuel.* 84: 487-494.
- Ramos, T. O., Canul, S. J. R. y J. F. Vera. 2013. Production of three varieties of *Pennisetum purpureum* fertilized with two different sources of nitrogen in Yucatan, Mexico. *Rev. Bio Ciencias.* 2 (2): 60-68.
- Ramírez, O. S., Domínguez, D. D., Salmerón, Z. J. J., Villalobos, V. G. y J. A. G. Ortega. 2013. Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (4): 395-403.
- Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Prapa, S., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., Nakamane, G. y T. Sayan. 2013. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand. *J. Sustainable Bioenergy Systems.* 3:107-112.
- Rowell, R. M., R. Pettersen, J. S. Han, J. S. Rowell y A. M. Tshabalala. 2005. Cell Wall Chemistry. *In: Rowell, R. M. Ed. Handbook of wood chemistry and wood composites.* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp: 35-74.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Release 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. y D. Templeton. 2008. Determination of extractives in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006-2007. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing. CD Version, Atlanta, GA.,U.S.A. 5 p.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006-2007. Preparation of wood for chemical analysis. T 264 cm-97. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing. CD Version, Atlanta, G.
- van der Weijde, T., Kamei, A. C. L., Torres, A. F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R. G. F. y M. L. Trindade. 2013. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Plant Sci.* 4(107):1-18.
- Villarreal, M. 1994. Valor nutritivo de gramíneas y leguminosas forrajeras en San Carlos, Costa Rica. *Pasturas Tropicales* 16(1):27-31.
- Vogel, J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology.* 11:301–307.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. y W. Chulalaksananukul. 2012. The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. *J. Biomed Biotechnol* 2012: 1-10.

CAPÍTULO II

EFECTO DE LA FRECUENCIA DE CORTE SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PASTO MARALFALFA PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Joel Ventura Ríos, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rendimiento de biomasa, caracterización química y producción de bioetanol a tres frecuencias de corte del pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en un diseño experimental de bloques al azar en parcelas divididas con tres repeticiones. La mayor producción de biomasa ($28.5 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) se obtuvo en la frecuencia de corte al día 180. La frecuencia de corte de 120 días mostró el mayor contenido (%) de azúcares totales, lignina total, lignina soluble en ácido (LSA), lignina insoluble en ácido (LIA), residuo insoluble en ácido (RIA), humedad, cenizas, glucosa, que fue de 71.8, 21.8, 1.7, 20.0, 26.3, 7.4, 6.2, 34.0, respectivamente, mientras que la xilosa (10.9%) fue mayor en el corte de 180 días. El contenido de azúcares reductores no mostro diferencias ($p>0.05$), entre los distintos tiempos de corte. La concentración de azúcares totales obtenidos con pretratamiento básico oxidante no presentó diferencias significativas ($p>0.05$) en las diferentes frecuencias de corte; mientras que para los azúcares reductores (1.1%; $p<0.05$) y LSA (0.62%; $p<0.05$) si se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de corte de 150 y 120 días, respectivamente. Por otro lado, la hidrólisis enzimática generó 47.3% de azúcares totales ($p<0.05$) y 39.7% de azúcares reductores ($p<0.05$), en las frecuencias de corte de 180 y 120 días, respectivamente y diferentes de las demás frecuencias de corte. Durante la fermentación alcohólica los azúcares reductores disminuyeron desde 300 g/L hasta 168 g/L, luego de 70 horas de reacción, con capacidad para producir 1061 L ha^{-1} de bioetanol. De acuerdo con el rendimiento de biomasa y la composición química del pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone, la biomasa de esta especie puede ser utilizada como fuente bioenergética.

Palabras clave: *Cenchrus*, composición química, pretratamiento, sacarificación, bioetanol, frecuencia de corte.

**EFFECT OF THE CUTTING FREQUENCY ON THE CONCENTRATION OF
FERMENTABLE SUGARS AND CHEMICAL COMPOSITION OF MARALFALFA
GRASS FOR THE BIOETHANOL PRODUCTION**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate biomass production, chemical characterization, and bioethanol yield from maralfalfa grass (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone at three cutting frequencies. The treatments were distributed irregularly in a randomized block experimental design in split plots with three replications. A highest biomass production (28.5 Mg ha⁻¹ yr⁻¹) was obtained in the cutting frequency of 180 days. The cutting frequency of 120 days showed the highest content (%) of total sugars, total lignin, acid soluble lignin (ASL), acid insoluble lignin (AIL), acid insoluble residue (AIR), moisture, ash, glucose, which was 71.8, 21.8, 1.7, 20.0, 26.3, 7.4, 6.2, 34.0 respectively, while xylose (10.9%) was greater for the cutting frequency of 180 days. The reducing sugar content did not show differences ($p>0.05$) among the different cutting times. The concentration of total sugars obtained with basic oxidizing pretreatment showed no significant differences ($p>0.05$) at the several cutting frequencies; while for reducing sugars (1.1%; $p<0.05$) and ASL (0.62%; $p<0.05$) significant differences were detected in the cutting frequencies of 150 and 120 days, respectively. On the other hand, enzymatic hydrolysis generated 47.3% of total sugars ($p<0.05$) and 39.7% reducing sugars ($p<0.05$) in the cutting frequencies of 180 and 120 days, respectively and they were different from other cutting frequencies. During alcoholic fermentation reducing sugars decreased from 300 g/L to 168 g/L after 70 hours of reaction, with a capacity to produce 1061 L ha⁻¹ of bioethanol. According to biomass yield and chemical composition of maralfalfa grass (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone, biomass of this species can be used as a bio-energy source.

Key words: *Cenchrus*, chemical composition, pretreatment, saccharification, bioethanol cutoff frequency.

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de biocombustibles creció 7.4% (equivalente a 4.9 millones de toneladas de petróleo) en el 2015, principalmente en los Estados Unidos (+5.6%), Brasil (+5.5%), Indonesia (+40.4%) y Argentina (+30.9%) (Statistical Review of World Energy, 2015). En Estados Unidos el bioetanol se produce casi en su totalidad a partir de maíz (90%). Las estadísticas muestran un aumento de 178%, al pasar de 18 a 50 millones de litros producidos del 2006 al 2012 respectivamente, a la par, el aumento de biodiesel fue de 0.9 a 4 millones de litros para el mismo periodo, mostrando un incremento de 344% (UNCTAD, 2014). Por otro lado, Brasil produce bioetanol a partir de caña de azúcar (sacarosa), en el periodo del 2006 al 2007, se produjeron 18 000 millones de litros, supliendo la demanda interna y un excedente de 3.5 millones de litros para exportación (Lima *et al.*, 2014). En conjunto, Brasil y Estados Unidos tienen la mayor producción mundial aportando el 42.5% y 23.5% de la producción total en los últimos años.

Los biocombustibles líquidos a partir de biomasa lignocelulósica, como desechos agrícolas y pastos, tienen el potencial de ser un sustituto y/o complemento de la gasolina, así mismo, coadyuvan en mejorar el ambiente reduciendo la acumulación de CO₂ en la atmósfera, las principales fuentes de energía de uso común como el carbón y petróleo liberan CO₂ a la atmósfera que es una de las principales causas del calentamiento global (Rengsirikul *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, el incremento en el precio de la gasolina y productos derivados de los hidrocarburos han dado lugar a nuevas líneas de investigación sobre fuentes de combustibles líquidos renovables a partir de materiales lignocelulósicos de segunda generación, dado que las fuentes de primera generación han generado escases y como consecuencia un incremento en los precios de fuentes de alimentos de uso común para la humanidad (Mohammed *et al.*, 2015).

Por su composición química, las gramíneas C₄ contienen un alto porcentaje de celulosa (40%), hemicelulosa (35%) y lignina (30%), por lo que pueden considerarse una alternativa para la producción de bioetanol de segunda generación, una vez que la biomasa se haya sometido a

pretratamiento, sacarificación y los azúcares estén disponibles para una fermentación eficiente (Kumar *et al.*, 2009). Sin embargo, su principal limitante es el contenido de lignina, la cual forma una barrera protectora restringiendo la disposición de los azúcares para una fácil fermentación. Los polisacáridos como celulosa y hemicelulosa deben ser hidrolizados en azúcares más simples, de tal manera que los microorganismos puedan utilizarlos de una manera eficiente para la producción de bioetanol (Mateus *et al.*, 2012; Cardona *et al.*, 2013).

En México, en la última década se han introducido variedades del género *Cenchrus purpureus* (Schum.) Morrone, [previamente *Pennisetum purpureum*, (Chemisquy *et al.*, 2010)], la cual es originaria de las zonas tropicales de África (Brunken, 1977; Singh *et al.*, 2013) y, normalmente es utilizado para la alimentación animal, sin embargo, debido a los altos rendimientos de materia seca (51 t MS ha⁻¹; Rengsirikul *et al.*, 2013) y composición química (46% de celulosa y 28% de hemicelulosa; Lima *et al.*, 2014), se ha considerado como una buena fuente de azúcares para la producción de bioetanol de segunda generación. En México, los estudios son limitados utilizando biomasa de pasto a diferentes frecuencias de corte en la producción de biocombustibles, por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento de biomasa, caracterización química y producción de bioetanol del pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone cosechado a diferentes frecuencias de corte.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Datos del experimento.

El estudio se realizó en el Sitio Experimental “Papaloapan” de INIFAP, a 18° 06' LN y 95° 31' LO y 65 msnm, en Cd. Isla, Veracruz, con clima A_{wo} y temperatura media anual de 25.7 °C (García, 1988). La siembra se efectuó el 22 de julio de 2011, en surcos con separación de 0.50 m, en parcelas experimentales de 5 metros de ancho por 16 metros de largo. Las praderas se fertilizaron con la siguiente formula: 120-80-00 kg/ha de N y P₂O₅, y el N se dividió en dos aplicaciones a 43 y 112 días después de la siembra. El suelo es acrisol órtico, franco-arenoso, con pH de 4 a 4.7, pobre en materia orgánica, nitrógeno, calcio, potasio y contenidos medios a altos de fósforo y magnesio (Enríquez y Romero, 1999). Los tratamientos consistieron en tres frecuencia de corte (120, 150 y 180 días) distribuidos en bloques al azar en parcelas divididas, donde la parcela mayor fue el pasto y la menor la frecuencia de corte, con tres repeticiones. Las

determinaciones físico-químicas de materia seca (MS) del pasto se realizaron en el laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP, San Martinito, Puebla, y en el Instituto Mexicano del Petroléo, Méx., D.F.

2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha⁻¹).

Se determinó para cada frecuencia de corte [120, 150 y 180 días después del corte de homogeneización (**ddch**)], mediante muestreos destructivos, durante un año. Para ello, en cada parcela se cosechó un área central de 2 m x 3 m, dejando un metro de borde en cada lado y 50 cm entre frecuencias de corte (6 m²) y se cortó el forraje total (planta entera), dejando el remanente a 20 cm de altura, para la recuperación de la planta. La biomasa cosechada se pesó en balanza de precisión (Ohaus, Mod. GT-4000; 6.200 kg ± 0.1 g). Posteriormente, se tomó una submuestra, se registró el peso fresco y se introdujo en una estufa de aire forzado (Felisa, Mod. FE-243A), a 55 °C hasta peso constante y se calculó la cantidad de materia seca (MS). Las muestras secas fueron después pulverizadas en un molino Wiley® (Arthur H. Tomas, Philadelphia, PA, USA) y tamizadas entre las mallas del No. 40 (0.42 - 1.00 mm) y No. 60 (0.25 - 0.42 mm), para posteriormente realizar las determinaciones químicas.

2.3 Caracterización de la biomasa lignocelulosica.

La humedad se determinó agregando 0.5 g de biomasa en una termobalanza (Ohaus, Mod. GT-4000). El porcentaje de cenizas se determinó pesando 3 g de biomasa en un crisol de porcelana a peso constante, posteriormente se incinero con un mechero bunsen durante 30 minutos y se llevó a una mufla a 550 °C durante 24 horas. El contenido de cenizas se calculó bajo la siguiente formula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Biomasa (g)} - \text{biomasa salida de la mufla (g)}}{\text{Biomasa (g)}} \times 100$$

Para evaluar el contenido de azúcares totales, azúcares reductores, perfil de carbohidratos, lignina soluble en ácido (LSA), lignina insoluble en ácido (LIA) y residuo insoluble en ácido (RIA), la biomasa fue hidrolizada con ácido sulfúrico, la hidrólisis se evaluó por triplicado, para lo cual se pesaron 300 mg de pasto y se vertieron en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico al 75% v/v a las tres muestras, los matraces se agitaron a 150 rpm durante una hora a 30 °C. Después se agregaron 51 mL de agua destilada para diluir la solución al 4% v/v de

H₂SO₄ y se colocaron en una autoclave a 121 °C durante una hora. Una vez que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se filtraron al vacío utilizando filtros de vidrio. El sólido obtenido se secó en una estufa a 105 °C durante 24 horas y se midió el volumen de filtrado obtenido en cada muestra. El residuo insoluble en ácido, se obtiene pesando el sólido después de 24 h de secado en la estufa y se calculó de la siguiente manera:

$$\%RIA = \frac{\text{sólido seco (g)}}{3 \text{ g pasto}} * 100$$

Las tres muestras líquidas se neutralizaron en carbonato de calcio y a partir de ellas se determinó azúcares totales (AT; Dubois *et al.*, 1956), azúcares reductores (AR; Nielsen, 2007), lignina soluble en ácido, lignina insoluble en ácido, residuo insoluble en ácido (Sluiter *et al.*, 2011) y perfil de carbohidratos. Para determinar el porcentaje de lignina soluble en ácido (% LSA), se tomó una alícuota de 0.25 mL de muestra, se adicionó 0.75 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a longitud de onda de 320 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic Helios, USA. La determinación de % LSA debe hacerse en un tiempo menor a 4 horas después de obtener las muestras de la hidrólisis ácida. El porcentaje de lignina insoluble en ácido (% LIA) es la diferencia entre el % RIA y el % de cenizas, la suma del % LSA y el % LIA constituye la lignina total del pasto (Sluiter *et al.*, 2011).

Determinación de azúcares reductores (AR). Se tomó una alícuota de 0.25 mL de filtrado y se adicionó 0.75 mL de agua destilada, después se agregó 1 mL de ácido 3,5 dinitro salicilico (DNS) y se calentó la muestra durante 5 min en un baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic Helios, USA. La concentración de azúcares reductores se determinó mediante una curva patrón de absorbancia (540 nm) contra concentración de glucosa.

Determinación de azúcares totales. Se tomó una alícuota de 0.02 mL de filtrado y se adicionó 0.98 mL de agua destilada, después se agregó 1 mL de solución de fenol al 5% v/v y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (grado reactivo). Se dejó enfriar la muestra durante 30 min y se determinó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic Helios, USA. La concentración de azúcares totales se determinó mediante una curva patrón de absorbancia (490 nm) contra concentración de glucosa.

El perfil de carbohidratos se obtuvo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se tomó una alícuota de 0.4 mL de filtrado, se adicionó 0.1 mL de alanina (3 mg/L, como estándar interno) y 0.5 mL de agua grado HPLC. La muestra se analizó en un cromatógrafo de líquidos marca HP, equipado con una columna BioradAminex HPX-87P y una precolumna adecuada. Como fase móvil se utilizó una mezcla acetonitrilo-agua y un detector de dispersión de luz ELSD. Para determinar el contenido de azúcares en la muestra (perfil de carbohidratos), se hicieron curvas de patrón de glucosa, xilosa, fructosa, manosa, sacarosa y celobiosa.

2.4 Pretratamiento.

La biomasa del pasto maralfalfa se pre trató con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno; la reacción entre estos dos compuestos y el efecto que causa en el pasto constituye el pretratamiento básico-oxidante. El pretratamiento se llevó a cabo en un reactor Parr horizontal de 1 L, en él se agregaron 50 g de pasto maralfalfa seco (tamiz 60), 196 mL de hidróxido de sodio 1.1 M y 83.3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Después se programó la agitación a 150 rpm y la temperatura interna de 50 °C. La presión (180 psi) generada por oxígeno que es uno de los productos de la reacción, obliga a despresurizar el reactor antes de abrirlo. La pasta obtenida luego del pretratamiento presenta un pH de 11-12, por lo que se adicionó ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH 5. Se determinó azúcares totales, azúcares reductores y lignina soluble en ácido (% LSA) del material pretratado de acuerdo a las técnicas ya descritas.

2.5 Hidrólisis enzimática.

Su objetivo fue romper la celulosa y hemicelulosa en azúcares más simples como glucosa, xilosa, fructosa y sacarosa, entre otros. La reacción está catalizada por un coctel enzimático comercial de Novozymes aquí denotado como E9, detectando las siguientes actividades: celulasa 284 FPU/mL, endocelulasa 34.10 IU/mL, exocelulasa 162.6 μmol glucose/min, and β -glucosidasa 6424.4 μmol p-NP/mL min. La actividad de celulosa fue determinada de acuerdo a Adney y Baker (2008).

El resto de las actividades se determinaron con buffer de citrato 50 mM, pH 4.8, a 50°C y 180 rpm por 1 h usando como sustratos pNPG 2 mM (β -glucosidasa), carboximetilcelulosa 0.5%

(endocelulasa), y celulosa microcristalina 1.25% (exocelulasa). La reacción se efectuó en una celda de ultrafiltración de 1 galón (3.78 litros), en la que se adicionaron los 50 g de pasto maralfalfa pretratado (pH 5), después se vertieron 0.68 L de buffer de citratos pH 4.8 y 0.045 L de enzima E9. La hidrólisis enzimática se mantuvo a 50 °C y 150 rpm durante 24 horas. Después de 24 horas de reacción, se tomó una alícuota de 1 mL para determinar el contenido de azúcares totales y azúcares reductores por el método DNS y fenol-sulfúrico, respectivamente. Con la hidrólisis se espera convertir la mayor cantidad de azúcares poliméricos en azúcares fermentables para su posterior fermentación a etanol.

2.6 Fermentación.

La fase líquida obtenida de la hidrólisis enzimática se fermentó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para convertir los azúcares extraídos del pasto en etanol. Primero, se preparó un medio de producción y un medio semilla (también conocido como preinóculo). Se prepararon 80 mL de preinóculo con la composición como se describe a continuación (g/L): glucosa 15, extracto de levadura 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 5. El medio de cultivo se dividió en dos matraces, 40 mL en cada uno. Después, se ajustaron ambos matraces a pH 5 y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez fríos se inocularon con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se incubaron en un baño de agua a 30 °C y 150 rpm durante 17 horas.

La solución rica en azúcares proveniente de la hidrólisis enzimática se dividió en dos matraces, vertiendo la misma cantidad de líquido en cada uno. A cada matraz se adicionó extracto de levadura en concentración de 2 g/L y la cantidad de glucosa necesaria para llegar a una concentración de 300 g/L. Ambos medios de producción se ajustaron a pH 5 y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 15 min. Luego de 17 horas de incubación de los medios de cultivo, se centrifugó el contenido de cada matraz, el sobrenadante se desechó y el precipitado fue utilizado para inocular el medio de producción. Ambos matraces se mantuvieron en un baño de agua a 30 °C y 150 revoluciones por minuto durante 70 horas. Se tomó 1 mL de cada muestra a intervalos regulares y se determinó el índice de refracción, la densidad óptica a 620 nm, los azúcares reductores y el contenido de etanol por cromatografía de gases en cada uno de los medios de producción. Se usó un cromatógrafo de gases HP modelo 6890, equipado con

una columna AT-WAX para cuantificar etanol en la muestra. Los azúcares reductores se determinaron de manera similar a lo antes descrito y la densidad óptica a 620 nm se midió en un espectrofotómetro UV-Vis Helios modelo Alpha.

2.7 Destilación.

Luego de la fermentación, se destiló el etanol producido en esta etapa. El líquido proveniente de la fermentación contiene principalmente etanol, agua y glucosa, siendo el primer compuesto el más volátil (punto de ebullición 78 °C) y el último el menos volátil. Se separó el alcohol disuelto en el producto fermentado para obtenerlo con la mayor pureza posible. Los azúcares no transformados durante la fermentación no son volátiles por lo que permanecieron disueltos en la fase líquida durante la destilación. La destilación se hizo a presión atmosférica (585 mm Hg) con un equipo de laboratorio marca Aldrich. Se vertieron 200 mL del líquido fermentado en un matraz bola de 250 mL, se adicionaron algunas perlas de ebullición y se montó el equipo de destilación. Para calentar el matraz bola se ocupó una parrilla eléctrica, la cual se puso en funcionamiento antes de destilar para mantener la temperatura del matraz bola constante durante la destilación.

El condensador del equipo de destilación se enfrió con agua destilada a 10 °C, bombeada al sistema mediante un recirculador marca Haake modelo DC 10. Cuando el equipo de destilación alcanza condiciones estables de enfriamiento en el condensador y calentamiento en el matraz bola, se comienza con la destilación de un lote de 200 mL de líquido fermentado y se recolecta el destilado durante 3.5 horas. Inmediatamente después se retiró el matraz bola de la parrilla de calentamiento y se dejó enfriar el equipo de destilación a temperatura ambiente. Luego, se midió el volumen de destilado y residuo. Por último, se determinó la concentración de etanol en ambas muestras mediante cromatografía de gases. El líquido proveniente de la fermentación se destiló en 4 lotes de manera similar a lo antes descrito.

2.8 Análisis estadístico.

Los datos se agruparon de manera anual, para su análisis estadístico. Se utilizó un modelo de análisis de varianza de bloques al azar donde los factores de estudio fueron: la frecuencia de corte (120, 150 y 180 ddch), con tres repeticiones. La comparación múltiple de las medias de

tratamientos se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), mediante el procedimiento estadístico PROC GLM del software SAS para Windows versión 9.3 (SAS, 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento de biomasa.

La mayor producción de biomasa durante el año se obtuvo en la frecuencia de corte de 180 días con 28.5 Mg MS ha⁻¹, fue estadísticamente diferente ($p<0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1) y produjo 52% y 41% más biomasa que a los 150 y 120 días de corte, respectivamente. En trabajos previos, Calzada *et al.* (2014) reportaron 37.2 Mg MS ha⁻¹ a 151 días después de la siembra en pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), el cual superó en 30% a la frecuencia de corte de 180 días, la cual registró la mayor producción. Por otro lado, Rengsirikul *et al.* (2013) reportaron 27.1 Mg MS ha⁻¹ en el cultivar enano (*Pennisetum purpureum*) el cual fue superior en 45% y 34% a lo encontrado en la frecuencia de corte a cada 150 y 120 días respectivamente, no obstante, fue inferior en 5% a lo obtenido en la frecuencia de corte de 180 días.

3.2 Caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto maralfalfa

3.2.1 Azúcares totales y reductores.

La concentración de azúcares totales fue similar en las frecuencias de corte de 120 y 180 días con 71.8 y 72.2% pero estadísticamente superior ($p<0.05$) a la frecuencia de 150 días (67.7%; Cuadro 1). El contenido de carbohidratos totales varió de 67% a 73%, el cual coincide con lo reportado por Mosier *et al.* (2005) quienes reportaron de 55 a 75% de azúcares totales para materiales lignocelulosicos. La frecuencia de corte no modificó el contenido de azúcares reductores ($p>0.05$), con un promedio de 42%. No todos los azúcares contenidos en el pasto pueden usarse para producir etanol, de ellos, solo la glucosa, manosa, fructosa, sacarosa y galactosa pueden convertirse a etanol mediante la fermentación.

Al respecto, Badger (2002) menciona que aunque microorganismos como la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sean utilizados de manera comercial y con buenos rendimientos en

la fermentación, aún no se logra obtener el 100% de eficiencia, ya que en este proceso los microorganismos usan parte de la glucosa para su crecimiento, siendo así el rendimiento teórico menor al 100%; por ejemplo 100 g de glucosa producen 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono.

La conversión de azúcares a etanol utilizando *S. cerevisiae* es una de los procesos industriales mejor estudiados y perfeccionados, sin embargo, aunque existen microorganismos capaces de metabolizar azúcares de cinco carbonos, como por ejemplo, cepas de levaduras del género *Pichia stipitis* y hongos anaeróbicos, las rutas aún no están bien definidas, y trabajos en ingeniería genética son desarrollados con la finalidad de obtener mayor eficiencia en esta bioconversión de levadura-sustrato (Elshahed, 2010).

3.2.2 Lignina total, LSA, LIA y RIA.

El mayor contenido de lignina total, lignina soluble, lignina insoluble y residuo insoluble en ácido se encontró en la frecuencia de corte de cada 120 días (Cuadro 1), la cual fue estadísticamente diferente a las demás frecuencias de corte ($p < 0.05$). En trabajos previos, Mateus *et al.* (2012) reportaron en el cultivar maralfalfa (*Pennisetum* sp.), 16.1%; 16.0% y 0.13% para lignina total, LIA y LSA, respectivamente. Por otro lado, Lima *et al.* (2014) obtuvieron 22.8% de lignina total en *Pennisetum purpureum* y 25.3% en *Panicum máximum*. Así mismo, Cardona *et al.* (2013) en pasto elefante y king grass (*Pennisetum purpureum*) encontraron 19.4% y 15.4% de lignina total.

3.2.3 Humedad.

No se encontraron diferencias estadísticas entre frecuencias de corte en el contenido de humedad (Cuadro 1) y en promedio fue de 7.2%. Este valor es mayor a lo observado por McKendry (2002), quien reportó 6% en paja de trigo, aunque inferior al 11.5%, reportado por este autor en *Miscanthus* sp.

3.2.4 Cenizas.

El contenido de cenizas disminuyó a medida que se incrementó el intervalo de corte (Cuadro 1), siendo la frecuencia de corte de 120 días estadísticamente superior ($p < 0.05$) a las demás

frecuencias. En trabajos previos, Cárdenas *et al.* (2012) reportaron 6.0% en pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), el cual es similar a la frecuencia de corte del día 120; sin embargo, en otros trabajos (Rengsirikul *et al.*, 2013) obtuvieron 7.7% en el pasto taiwán (*Pennisetum purpureum*) el cual es superior en 24% a lo encontrado en la frecuencia de corte cada 120 días. No obstante, el contenido de cenizas disminuye a medida que la planta avanza en su etapa fenológica debido a la absorción de los macro y micronutrientes por el sistema radicular (Clavero y Urdaneta, 1997).

3.2.5 Perfil de carbohidratos.

La biomasa hidrolizada con ácido sulfúrico, permitió la ruptura de las cadenas poliméricas de la celulosa y hemicelulosas. A partir de la celulosa se obtiene glucosa, mientras que a partir de la hemicelulosas se obtienen diferentes monosacáridos, tales como xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa y manosa, entre otros. En la evaluación del perfil de carbohidratos, el mayor contenido de glucosa se encontró al cortar a cada 120 días con 34%, y fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) de las demás frecuencias de corte; sin embargo, el contenido de xilosa se incrementó a medida que avanzó la etapa fenológica de la planta, siendo la frecuencia de corte de 180 días (10.9%) diferente ($p < 0.05$) de las demás frecuencias de corte (Cuadro 1).

Mateus *et al.* (2012) reportaron 33.7% de glucosa, similar al contenido encontrado en la frecuencia de corte de 120 días; sin embargo, estos autores obtuvieron 22.3% de xilosa, el cual es superior en 11.4 unidades porcentuales a lo encontrado en la frecuencia de corte de 180 días. Por otro lado, Carroll y Somerville (2009) reportan 1.1%; 2.7%; 20.4%; 0.29% y 0.92% para ácido urónico, arabinano, xilano, manano y galactano, respectivamente en pasto switchgrass (*Panicum virgatum*). Como se ha reportado anteriormente por Ebringerová *et al.* (2005) y Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) las hemicelulosas son un grupo de polímeros de hidratos de carbono bastante complejos y constituyen del 25 al 50% de la biomasa en gramíneas. Las hemicelulosas comprenden un grupo de polisacáridos almacenados dentro de la pared celular de plantas anuales y perennes, que representan una buena fuente de azúcares renovables (Ebringerová *et al.*, 2005). Se presentan en una gran variedad de tipos estructurales, dividido en cuatro grupos generales, que son: xilanos, (1-3), (1-4)- β -D-glucanos, xiloglucanos y mananos, en general su estructura es amorfa y variable, formada de pentosas (β -D-xylosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-glucosa, α -D-galactosa y β -D-manosa), así también, pueden contener ácidos

Cuadro 1. Rendimiento, caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto maralfalfa a tres frecuencias de corte.

Composición química	Frecuencia de corte			
	120	150	180	Media
Rendimiento de biomasa (Mg ha ⁻¹ año ⁻¹)	20.2(±5.99) ^b	18.7(±4.18) ^b	28.5(±4.16) ^a	22.51
Azúcares Totales (% p/p)	71.80 (±1.74) ^a	67.71 (±1.14) ^b	72.29 (±0.31) ^{ab}	70.60
Azúcares Reductores (% p/p)	37.56 (±3.50) ^a	44.09 (±2.31) ^a	44.57 (±1.81) ^a	42.07
Lignina Total (% p/p)	21.82 (±0.19) ^a	17.37 (±0.24) ^c	18.01 (±0.12) ^b	19.07
LSA (% p/p)	1.72 (±0.07) ^a	1.41 (±0.01) ^b	1.38 (±0.03) ^b	1.50
LIA (% p/p)	20.09 (±0.12) ^a	15.95 (±0.23) ^c	16.63 (±0.14) ^b	17.56
RIA (% p/p)	26.32 (±0.12) ^a	22.17 (±0.23) ^c	22.85 (±0.14) ^b	23.78
Humedad (% p/p)	7.40 (±0.053) ^a	7.27 (±0.31) ^a	7.22 (±0.04) ^a	7.29
Ceniza (% p/p)	6.22 (±0.04) ^a	5.22 (±0.05) ^b	4.76 (±0.60) ^c	5.40
Glucosa (% p/p)	34.05 (±0.002) ^a	33.94 (±0.001) ^b	33.89 (±0.0001) ^c	33.95
Xilosa (% p/p)	4.86 (±0.002) ^c	9.41 (±0.004) ^b	10.91 (±0.002) ^a	8.39

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma hilera, indican diferencias significativas entre frecuencias de cortes ($p < 0.05$).

urónicos (α -D-glucorónico, α -D-4-O-metilgalacturónico y α -D-galacturónico) (Girio *et al.*, 2010). De tal manera que el contenido de polisacáridos en las hemicelulosas de la pared celular primaria de monocotiledóneas (gramíneas; % b.s) es de: 2-5% para xiloglucanos, 20-40% para Glucorono-arabinosilanos, 2% de glucomanos y 2-15% de β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- glucanos y en la pared secundaria encontramos de 40-50% de Glucorono-arabinosilanos y 5% de (Gluc)omananos.

3.3 Pretratamiento básico-oxidante

3.3.1 Azúcares totales y reductores.

El pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) rompe los enlaces lignina-carbohidrato, retira parte de la lignina y de las hemicelulosas, abre las estructuras del material, incrementa el área interfacial y reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, favoreciendo su sacarificación enzimática (Tuor *et al.* 1995). En el Cuadro 2 se presenta el contenido de azúcares totales (AT), azúcares reductores (AR) y lignina soluble en ácido (LSA). La frecuencia de corte no modificó el contenido de azúcares totales ($p > 0.05$), sin embargo, el contenido de azúcares reductores fue mayor en la frecuencia de corte a cada 150 días ($p < 0.05$). Los azúcares disueltos en la fase líquida indican el rompimiento de los enlaces entre lignina y celulosa, el bajo contenido de azúcares reductores en la muestra analizada permite inferir que prácticamente toda la celulosa se encuentra aún en el pasto, sin embargo ahora es más factible hidrolizarla.

3.3.2 Lignina soluble en ácido.

El mayor contenido de lignina soluble en ácido se encontró en la frecuencia de corte de cada 120 días, y fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 2). La finalidad del pretratamiento es disminuir el contenido de lignina de la biomasa, en este caso se buscó hacer más accesible los polisacáridos al coctel enzimático (E9). En la caracterización se encontró en promedio 1.5% de LSA, el cual después de pretratarse disminuyó a 0.5% de lignina soluble en ácido; esto podría deberse a que el hidróxido de sodio y el peróxido de hidrógeno reaccionan liberando como producto principal oxígeno, el cual ejerce presión sobre el polímero de la lignina rompiendo los enlaces que mantienen unido a la celulosa y lignina, se consiguió desglosar (romper) parte de la estructura lignocelulósica del pasto maralfalfa, con esto se espera

que la celulosa este más accesible a la enzima y se obtenga un mayor contenido de azúcares fermentables que el obtenido sin pretratar.

3.4 Hidrólisis enzimática

3.4.1 Azúcares totales y reductores.

En el Cuadro 3, se presenta el contenido de azúcares totales y reductores obtenido luego de realizar la hidrólisis con el coctel enzimático (E-9). Las frecuencias de corte a cada 120 (50.8%) y 150 (51.3%) días fueron similares ($p>0.05$), pero estadísticamente diferentes ($p<0.05$) con respecto a la frecuencia de corte del día 180 (47.3%), que mostró el menor contenido de azúcares totales. El mayor contenido de azúcares reductores, se encontró en la frecuencia de corte de 150 (46.2%) y 180 (45.7%) días, las cuales fueron similares ($p>0.05$) entre sí, pero diferentes de la frecuencia de corte de 120 días (39.7%). Cardona *et al.* (2013) reportaron 56% de azúcares reductores en el pasto elefante pretratado con NaOH y utilizando la enzima Acecellerasa. La eficiencia en promedio para la hidrólisis enzimática fue del 71% y 100% para azúcares totales y reductores, respectivamente.

3.5 Fermentación

3.5.1 Azúcares reductores e índice de refracción.

El consumo de azúcares durante la fermentación se determinó mediante dos técnicas: DNS e índice de refracción (ver materiales y métodos). Mediante el método DNS, los azúcares reductores disminuyeron de 300 g/L a 168 g/L, después de 70 horas de reacción. Mediante índice de refracción, se obtuvo una disminución en azúcares de 300 g/L a 102 g/L. El método de índice de refracción es una medición menos precisa de la cantidad de azúcares durante la fermentación, sin embargo, permite evaluar de manera muy rápida la concentración de azúcares en el fermentado. En la Figura 1, se muestra el consumo de azúcares en la fermentación, determinado por DNS; se observa que en las primeras 12 horas de reacción los azúcares reductores disminuyen rápidamente, después continúan disminuyendo de manera más lenta hasta las 70 horas. Este consumo de azúcares indica que una parte de la glucosa se transformó en etanol.

Cuadro 2. Pretratamiento básico-oxidante en la composición de azúcares totales, reductores y lignina soluble en ácido del pasto maralfalfa a tres frecuencias de corte.

Composición química	Frecuencia de corte			
	120	150	180	Media
Azúcares Totales (% p/p)	6.31 (± 0.11) ^a	5.92 (± 0.20) ^a	6.41 (± 0.22) ^a	6.21
Azúcares Reductores (% p/p)	0.78 (± 0.02) ^c	1.12 (± 0.01) ^a	0.99 (± 0.01) ^b	0.96
Lignina Soluble en Acido (% p/p)	0.62 (± 0.004) ^a	0.58 (± 0.001) ^b	0.50 (± 0.001) ^c	0.57

^{a,b} Diferente literal minúscula en la misma hilera indica diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Efecto de la hidrólisis enzimática en el contenido de azúcares totales y reductores del pasto maralfalfa a tres frecuencias de corte.

Composición química	Frecuencia de corte			
	120	150	180	Media
Azúcares Totales (% p/p)	50.81 (± 0.85) ^a	51.36 (± 0.70) ^a	47.30 (± 1.08) ^b	49.82
Eficiencia (%)	71	76	65	70.6
Azúcares Reductores (% p/p)	39.78 (± 0.87) ^b	46.21 (± 0.59) ^a	45.74 (± 0.38) ^a	43.91
Eficiencia (%)	100	100	100	100

^{a,b} Diferente literal minúscula en la misma hilera indica diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

3.5.2 Contenido de biomasa.

Se determinó el contenido de biomasa en la fermentación como medida del crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la Figura 1, se observan las fases que experimenta la levadura durante la fermentación, al principio una corta fase de adaptación (fase lag), después un crecimiento exponencial de la levadura, entre las 24 y 48 horas, lo cual también indica que se está produciendo etanol, luego la levadura entra en una fase estacionaria donde comienzan a agotarse los nutrientes en el medio y el etanol comienza a inhibir su crecimiento; por último, la levadura comienza a morir alrededor de las 66 horas de reacción y en consecuencia deja de producir etanol.

3.5.3 Etanol.

La concentración de etanol se determinó mediante cromatografía de gases en la frecuencia de corte de 120 días. En la Figura 1, se observa la producción de etanol a lo largo de las 70 horas de reacción. Se obtuvo una concentración máxima de 34 g/L. Cardona *et al.* (2013) reportaron un máximo de 27.7 g/L de etanol obtenido en la fermentación del pasto elefante pretratado con hidróxido de sodio (NaOH). Se ha reportado en literatura que la cantidad de etanol obtenida en la fermentación se debe en gran medida a un pretratamiento efectivo y una alta eficiencia de hidrólisis de celulosa a azúcares fermentables.

En porcentaje, en volumen se obtuvo un 4.3% v/v de etanol en la fermentación, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se inhibe a porcentajes mayores de etanol (alrededor de 9% v/v) en el medio, por lo que es posible obtener más etanol en esta etapa. Teóricamente solo puede obtenerse 0.51 g etanol/g de azúcar consumido, con la fermentación se consiguió un rendimiento de 0.25 g etanol/g azúcar consumido, lo cual corresponde a una eficiencia del 50% en esta etapa. A pesar del bajo rendimiento de la fermentación, el resultado alcanzado es mayor a lo reportado por Hashem y Darwish (1 2010) y Bothast y Schlicher (2005).

3.6 Destilación y rendimiento de bioetanol

3.6.1 Concentración de etanol.

El jarabe obtenido de la fermentación se destiló para purificar el etanol disuelto en el medio. Luego de destilar todo el jarabe, se obtuvo una concentración de 613 g/L de etanol. Con la destilación no solo se logró concentrar el alcohol, también se separó de los azúcares y el medio obtenido luego de la fermentación.

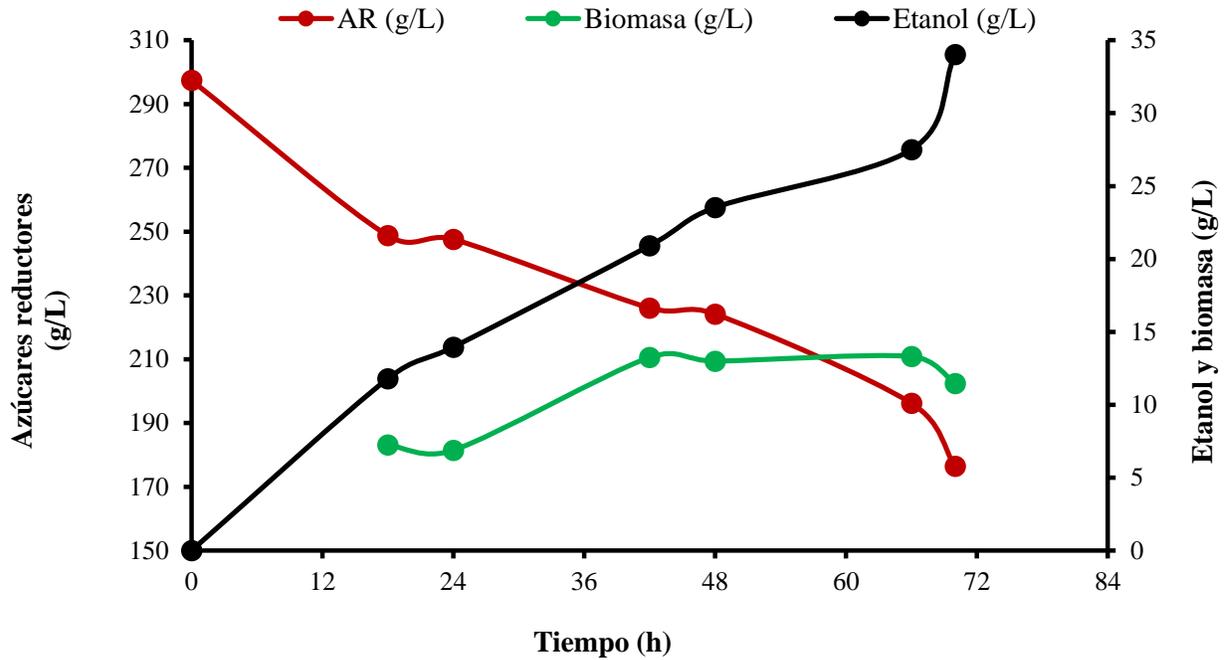


Figura 1. Comportamiento de los azúcares reductores del pasto maralfalfa fermentados con levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol de segunda generación.

3.6.2 Pureza.

Se logró purificar por destilación el etanol proveniente de la fermentación hasta un 78% v/v. El etanol forma una mezcla azeotrópica con agua a presión atmosférica por lo que solo es posible purificar etanol hasta un 96% v/v mediante una destilación atmosférica, tomando en cuenta esto, se logró una eficiencia de destilación del 81%. Considerando el rendimiento de 0.0301 L de bioetanol por 0.050 kg de biomasa en la fase de destilado y considerando la glucosa en el dopaje hasta llegar a 300 g/L, asumiendo que esta glucosa fuese reemplazada por azúcares de la hidrólisis enzimática se requiere de 0.573 kg de biomasa para obtener los 0.0301 L de bioetanol. Entonces considerando el rendimiento de biomasa de 20.2 (± 5.9) Mg ha⁻¹ año⁻¹ de pasto maralfalfa tiene la capacidad de producir 1061.8 L ha⁻¹ año⁻¹ de bioetanol.

4. CONCLUSIONES

La biomasa que proporciona el mayor contenido de azúcares totales y glucosa para la producción de bioetanol, se obtuvo al cosechar el pasto a cada 120 días. El pretratamiento básico oxidante mejoró en 0.6% el contenido de LSA en la frecuencia de corte de 120 días. La fuente de carbono disminuyó a medida que el tiempo de reacción se incrementó dejándolo de producir bioetanol a 72 horas. El rendimiento de biomasa y características químicas del pasto maralfalfa lo convierten en una alternativa potencial para la obtención de bioetanol en áreas tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial CONACyT - SENER Sustentabilidad Energética a través del Proyecto No. 151370 por el apoyo en los análisis químicos y al laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP en Puebla, Méx. Al Instituto Mexicano del Petróleo por las facilidades otorgadas para la realización de los análisis químicos y producción de bioetanol en el laboratorio de transformación de bioamasa.

5. LITERATURA CITADA

- Adney, B y J. Baker. 2008. Measurement of cellulase activities. Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42628
- Badger, C. P. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. Trends in new crops and new uses. J. Janick y A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA.
- Bothast, R. J. y A. M. Schlicher. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. Applied microbiology and biotechnology. 67(1): 19-25.
- Brunken, N. J. 1977. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (Gramineae). Amer. J. Bot. 64(2):161-176.
- Calzada, M. J. M., Enríquez, Q. J. F., Hernández, G. A., Ortega, J. E. y S. I. M. Pedroza. 2014. Análisis de crecimiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) en clima cálido subhúmedo. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 5(2): 247-260.
- Cardona, M. E., Ríos, A. J., Peña, D. J. y L. A. Ríos. 2013. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum* sp) y king grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de bioetanol. Información Tecnológica. Vol. 24(5), 69-80.
- Carroll A. y C. Somerville. 2009. Cellulosic biofuels. Annual Review of Plant Biology. 60: 165-182.
- Chemisquy, A. M., Giussani M. L., Scataglini, A.M., Kellogg, A. E. y O. Morrone. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. Annals of Botany 106: 107–130.
- Clavero, T. y R. Urdaneta. 1997. Root growth of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* cv Mott). Rev. Fac.Agron. LUZ. 14: 657-663.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A., F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Biochem. 28: 350-356.
- Ebringerová, A., Hromadkova, Z., y T. Heinze. 2005. Hemicellulose. Adv. Polym. Sci. 186: 1-67.
- Elshahed, M. 2010. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. J. of Advanced Research. 1:103–111

- Enríquez, Q. J. F. y J. M. Romero. 1999. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria* sp., en Isla, Veracruz. *Agrociencia*. 33(2):141-148.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM; México. 217p.
- Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. y R. Bogel-Lukasik. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol*. 101(13):4775-800.
- Hashem, M. y M. S. Darwish. 2010. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and bioenergy*, 34(7): 953-959.
- Kumar, P., Barrett, M. D., Delwiche, J. M. y P. Stroeve. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (8): 3713-3729.
- Lima, M. A., Gomez, D. L., Steele-King, G. C., Simister, R., Bernardinelli, D., Carvalho, M. A., Rezende, A. C., Labate, C. A., R deAzevedo, E., McQueen-Mason, S. J. y I. Polikarpov. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnol. Biofuels*. 7:1-19
- Mateus, L., Hernández, O., Velázquez, M. y J. De J. Díaz. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of goliath grass (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) for ethanol cellulosic. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV: 146-156.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol*. 83: 37- 46.
- Mosier, N. S., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. y R. M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96: 673–686.
- Mohammed, Y. I., Abakr, A. Y., Kazi, K. F., Yusup, S., Alshareef, I. y A. S. Chin. 2015. Comprehensive characterization of napier grass as a feedstock for thermochemical conversion. *Energies*. 8: 3403-3417.
- Nielsen, S. 2007. Análisis de los alimentos: manual de laboratorio (2da ed.). España. Ed. Zaragoza: Acribia.

- Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Prapa, S., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., Nakamane, G. y T. Sayan. 2013. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand. *J. of Sustainable Bioenergy Systems*. 3:107-112.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Release 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Statistical Review of World Energy. 2015. Renewable energy. 64th. Printed London. UK. Pp. 48.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. y D. Crocker. 2011. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). TechnicalReport NREL/TP-510-42618.
- Singh, P. B., Singh, P. H. y Obeng, E. 2013. Biofuel Crops. Pp. 271-291.
- Tuor, U., Winterhalter, K. y A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 411: 1-17.
- UNCTAD. 2014. The State of the biofuels market: Regulatory, trade and development perspectives. pp. 104.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. y W. Chulalaksananukul. 2012. The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. *J. Biomed Biotechnol* 2012: 1-10.

CAPÍTULO III

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ANÁLISIS PROXIMAL DE LA BIOMASA DEL PASTO TAIWÁN *Cenchrus purpureus* (Schumach.) MORRONE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

Joel Ventura Ríos, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de biomasa, composición química, análisis proximal, poder calorífico y rendimiento de bioetanol del pasto taiwán (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone a seis frecuencias de corte. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en un diseño experimental de bloques al azar con arreglo de parcelas divididas con tres repeticiones. La mayor producción de biomasa, celulosa, poder calorífico y rendimiento de bioetanol se encontró en la frecuencia de corte de 180 días con 33.0 Mg MS ha⁻¹; 41.3%; 17.5 MJ kg⁻¹ MS; 7936.2 L ha⁻¹ de etanol ($p < 0.05$), respectivamente. El mayor contenido de humedad, cenizas y proteína cruda se presentó en la frecuencia de corte del día 30 con 9.2%; 12.1% y 10.5% ($p < 0.05$), respectivamente. La mayor concentración de extractos ($p < 0.05$) lo registro la frecuencia de corte de 60 y 120 días (13.9% y 13.7%, respectivamente) para la lignina fue la frecuencia de 150 y 180 días (21.1% y 20.9%, respectivamente; $p < 0.05$). El contenido de carbono fijo fue mayor en la frecuencia de corte al día 90 (18.5%), mientras que la menor concentración de materia volátil se observó en la frecuencia de 30 días ($p < 0.05$). No se presentaron diferencias entre frecuencias en el contenido de holocelulosa ($p > 0.05$). De acuerdo al rendimiento de biomasa, composición química, análisis proximal y poder calorífico del pasto taiwán (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone indican que la biomasa de esta especie puede ser utilizada como fuente bioenergética.

Palabras clave: *Cenchrus*, bioetanol, composición química, análisis proximal, poder calorífico.

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOMASS PROXIMATE ANALYSIS OF TAIWÁN GRASS *Cenchrus purpureus* (Schumach.) MORRONE FOR THE PRODUCTION OF SECOND GENERATION BIOETHANOL

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biomass production, chemical composition, proximate analysis, calorific value, and bioethanol yield of taiwán grass (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone at six cutting frequencies. The treatments were distributed in a randomized block design in split plots with three replicates. The highest biomass production, cellulose, calorific value, and bioethanol yield were recorded in the cutting frequency of 180 days with 33 Mg DM ha⁻¹; 41.3%; 17.5 MJ kg⁻¹ DM; 7936.2 L ha⁻¹ ethanol ($p < 0.05$), respectively. The highest content of moisture, ash, and crude protein was in the cutting frequency of 30 days with 9.2%, 12.1%, and 10.5% ($p < 0.05$), respectively. The highest extract content ($p < 0.05$) was in the cutting frequencies of 60 and 120 days (13.9% and 13.7%, respectively), and in the case of lignin was in the cutting frequencies of 150 and 180 days (21.1% and 20.9%, respectively; $p < 0.05$). The highest concentration of fixed carbon was in cutting frequency of 90 days (18.5%; $p < 0.05$) while the lowest concentration of volatile matter was in the cutting frequency of 30 days ($p < 0.05$). There were no differences between frequencies with regards to holocellulose content ($p > 0.05$). Considering the obtained biomass production, chemical composition, proximate analysis, and calorific value of taiwán grass (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone, the biomass of this species can be used as a bioenergy source.

Keywords: *Cenchrus*, bioethanol, chemical composition, proximate analysis, calorific value.

1. INTRODUCCIÓN

La disminución en las reservas de petróleo junto con el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, han despertado el interés para buscar otras alternativas de combustibles líquidos a partir de biomasa lignocelulosa, la cual puede ser un valioso sustituto o complemento de hidrocarburos, debido que es bastante favorable para el ambiente, por la reducción de CO₂ y otras emisiones (SO₂ y NO₂) que dañan la atmósfera (del Río *et al.*, 2012). Los polisacáridos de las gramíneas contenidos dentro de la pared celular pueden ser usados como materia prima para la producción de bioetanol y otros biocombustibles una vez que hayan sido pretratados y descompuestos en azúcares simples para una fermentación eficiente, sin embargo, la bioquímica de la lignina adherida a la celulosa impide el proceso eficiente de hidrólisis y fermentación (Ladisich *et al.*, 2010); por ejemplo, la celulosa adherida a la lignina requiere grandes cantidades de enzimas para hidrolizarla y sin embargo, en esta reacción se generan enzimas no productivas, la cual hace más difícil e ineficiente el proceso impidiendo la degradación de celulosa (Chen *et al.*, 2006).

La biomasa lignocelulosa a partir de pastos C₄ está disponible en las zonas tropicales de México, donde en la última década se han introducido variedades del género *Cenchrus purpureus* (Schum.) Morrone, [previamente *Pennisetum purpureum*, (Chemisquy *et al.*, 2010)] para uso común en la producción animal, y estudios previos indican que tienen un mayor potencial de crecimiento y producción de biomasa por hectárea con rendimientos que fluctúan entre 37 y 46 Mg MS ha⁻¹ (Calzada *et al.* 2014; Rengsirikul *et al.*, 2013); sin embargo, hay pocos estudios que muestran la edad óptima en que se alcanza la mayor producción y composición química de la biomasa para un mejor aprovechamiento. Así mismo, se ha reportado que la edad del pasto es el factor que más influye en la composición química de las paredes y contenido celular en la planta (Santana *et al.* 2010). La gran mayoría de evaluaciones con gramíneas del género *Cenchrus* sp., se han enfocado a producción de forraje, nutrición y desempeño del animal (Ramos *et al.*, 2013); sin embargo, en México, los estudios son aún limitados evaluando la biomasa lignocelulosa y su potencial para la producción de bioetanol de segunda generación. La biomasa lignocelulosa para poder emplearse en pruebas bioenergéticas requiere de evaluaciones fisicoquímicas y de un análisis proximal para su mejor aprovechamiento. Otros

trabajos (Lima *et al.*, 2014) que han evaluado la composición química del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) reportan concentraciones de 49, 28 y 24% para celulosa, hemicelulosa y lignina. Por su parte, Cardona *et al.* (2013) registraron 45.5% de holocelulosa y 15.4% de lignina en el pasto king grass (*Pennisetum purpureum*).

Por otro lado, Mohammed *et al.* (2015) reportaron en gramíneas concentraciones de 8.4, 85 y 6.3% para carbono fijo, materia volátil y cenizas, respectivamente. Por su parte, Mateus *et al.* (2012) obtuvieron 10.7% de extractivos en el pasto maralfalfa (*Pennisetum sp.*) y Parick *et al.* (2005) registraron 17.3 MJ kg⁻¹ para poder calorífico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición química, poder calorífico, análisis proximal y rendimiento teórico de bioetanol del pasto taiwán (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone cosechado a diferentes intervalos de corte.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Datos del experimento.

El experimento se realizó en el Sitio Experimental “Papaloapan” de INIFAP, a 18° 06' LN y 95° 31' LO y 65 msnm, en Cd. Isla, Veracruz, con clima A_{wo} y temperatura media anual de 25.7 °C (García, 1988). La siembra se efectuó el 22 de julio de 2011, en surcos con separación de 0.50 m, en parcelas experimentales de 5 metros de ancho por 16 metros de largo. Las praderas se fertilizaron con la siguiente formula: 120-80-00 kg/ha de N y P₂O₅, y el N se dividió en dos aplicaciones a los 43 y 112 días después de la siembra. El suelo es acrisol órtico, franco-arenoso, con pH de 4 a 4.7, pobre en materia orgánica, nitrógeno, calcio, potasio y contenidos medios a altos de fósforo y magnesio (Enríquez y Romero, 1999). Los tratamientos consistieron en seis frecuencia de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 días) distribuidos en un diseño de bloques al azar en parcelas divididas, donde la parcela mayor fue el pasto y la menor la frecuencia de corte, con tres repeticiones. Las determinaciones físico-químicas de materia seca (MS) del pasto, se realizaron en el laboratorio de materiales lignocelulósicos del INIFAP, en San Martinito, Puebla, con excepción del contenido de N, el cual se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos y química ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se determinó: rendimiento de biomasa, composición química: extractivos, holocelulosa, celulosa, lignina y N; análisis proximal: humedad, carbono fijo, materia volátil, cenizas y poder calorífico.

2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha⁻¹).

Se determinó para cada frecuencia de corte [30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después del corte de homogeneización (**ddch**)], mediante muestreos destructivos, durante un año. Para ello, en cada parcela se cosecho un área central de 2 m x 3 m, dejando un metro de borde en cada lado y 50 cm entre frecuencias de corte (6 m²) y se cortó el forraje total (planta entera), dejando el remanente a 20 cm de altura, para la recuperación de la planta. La biomasa cosechada se pesó en una balanza de precisión (Ohaus, Mod. GT-4000; 6.200 kg ± 0.1 g). Posteriormente, se tomó una submuestra, se registró el peso fresco y se introdujo en una estufa de aire forzado (Felisa, Mod. FE-243A), a 55°C hasta peso constante y se calculó la cantidad de materia seca (MS). Las muestras secas fueron después pulverizadas en un molino Wiley® (Arthur H. Tomas, Philadelphia, PA, USA) y tamizadas en mallas del No. 40 (0.42 - 1.00 mm) y No. 60 (0.25 - 0.42 mm), para posteriormente realizar las determinaciones químicas y de poder calorífico.

2.3 Composición química.

Para liberación de extractivos, se utilizó la norma TAPPI T-264. El contenido de holocelulosa se determinó por el método de cloración ácida (Rowell *et al.*, 2005) y la norma ASTM D1104, para celulosa. La hemicelulosa se obtuvo substrayendo la cantidad de celulosa de la holocelulosa. La lignina se determinó conforme a la norma TAPPI T-222 os-74 y el N por el método semi-micro Kjeldahl (AOAC-984.13; 1990). Se tomaron dos sub-repeticiones por parcela, realizando seis determinaciones por frecuencia de corte.

2.4 Análisis proximal.

Para la determinar humedad, material volátil y cenizas se utilizaron las Normas ASTM E871, ASTM E872 y ASTM D 1102-84, respectivamente, y para carbono fijo se empleó la fórmula: $(CF) = 100 - (\text{Humedad} + \text{Cenizas} + \text{Material Volátil})$. Se efectuaron 3 muestras por repetición, realizando nueve determinaciones por frecuencia de corte.

2.5 Poder calorífico.

Se determinó en un calorímetro de bomba adiabática (Isoperibol, Parr 1266) acorde a la norma ASTM (E711) y una temperatura de 30 ± 0.5 °C, con pastillas comprimidas de peso igual o menor a 1 g. Al mismo tiempo, se determinó contenido de humedad de las muestras en balanza térmica Ohaus MB45[®]. Se realizaron cinco determinaciones por repetición, es decir 15 muestras por frecuencia de corte.

2.6 Estimación del rendimiento teórico de bioetanol.

Se utilizó la fórmula propuesta por Badger (2002) en base a la composición química de la materia seca.

Para Celulosa: $B = C * ER * E * EFG$

Dónde:

$B =$ kg de bioetanol/tonelada biomasa

$C =$ kg de celulosa/tonelada de biomasa

$ER =$ Eficiencia de recuperación (0.76)

$E =$ Estequiometría del etanol (0.51)

$EFG =$ Eficiencia de la fermentación de la glucosa (0.75)

Para Hemicelulosa: $B = H * ER * E * EFX$

Dónde:

$B =$ kg de bioetanol/tonelada biomasa

$H =$ kg de hemicelulosa/tonelada de biomasa

$ER =$ Eficiencia de recuperación (0.90)

$E =$ Estequiometría del etanol (0.51)

$EFX =$ Eficiencia de la fermentación de la xilosa (0.50)

2.7 Análisis estadístico.

Los datos se agruparon de manera anual, para su análisis estadístico. Se utilizó un modelo de análisis de varianza de bloques al azar donde los factores de estudio fueron: la frecuencia de corte (30, 60, 90, 120, 150 y 180 ddch) con tres repeticiones. La comparación múltiple de las medias de tratamientos se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), mediante el procedimiento estadístico PROC GLM del software SAS para Windows versión 9.3 (SAS, 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento de biomasa.

A medida que se incrementó la frecuencia de corte se modificó el rendimiento de biomasa anual, la frecuencia de corte a cada 180 días superó considerablemente a las frecuencias de 30, 90 y 150 días ($p < 0.05$) siendo superior en 227%, 137% y 81%, respectivamente (Cuadro 1). Lima *et al.* (2014) reportaron rendimientos de 35 Mg MS ha⁻¹ para el género *Pennisetum purpureum*, este resultado supera en 2 Mg MS ha⁻¹ a la frecuencia de corte de 180 días, que mostró el mayor rendimiento de biomasa. No obstante, Rengsirikul *et al.* (2013) registraron 27.1 Mg MS ha⁻¹ en cultivar enano (*Pennisetum purpureum*) el cual es menor en 6 Mg MS ha⁻¹. El rendimiento de biomasa fue variable en cada frecuencia de corte debido a que depende de las condiciones de crecimiento, así como de los factores asociados con la fisiología de la planta (Kozloski *et al.*, 2005), siendo la temperatura y la humedad los dos factores principales que más determinan la producción a través del año (Calzada *et al.* 2014).

3.2 Análisis proximal.

En trabajos previos se ha demostrado que el análisis proximal debe ser considerado en evaluaciones bioenergéticas ya que la humedad, material inorgánico, materia volátil, así como

extractivos, influyen directamente en el desempeño del poder calorífico y afectan el proceso de combustión (Brosse *et al.*, 2012).

3.3 Humedad.

El contenido de humedad fue disminuyendo a medida que la planta avanzó en su desarrollo fisiológico, el mayor contenido de humedad se presentó en la frecuencia de corte de 30 (9.2%) días, el cual fue diferente ($p<0.05$) y superior a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1). En trabajos previos con materiales lignocelulosicos, se reportan concentraciones de humedad del 15% en switchgrass (*Panicum virgatum*) y 16% para paja de trigo (McKendry, 2002), estos resultados son mayores a los valores obtenidos en el presente experimento, superando en 63% y 74% a la frecuencia de corte de 30 días, que mostró el mayor contenido. El contenido de humedad en las diferentes frecuencias de corte fue variable, sin embargo, en los materiales lignocelulósicos se busca que el contenido de humedad sea menor del 30% para no afectar el desempeño calorífico y poder de combustión.

3.4 Cenizas.

El contenido de cenizas fue disminuyendo a medida que la planta avanzó en su desarrollo fisiológico, el mayor contenido de cenizas se presentó en la frecuencia de corte de 30 días (12.1%) el cual fue diferente ($p<0.05$) y superior a las demás frecuencias de corte, las frecuencias de corte de 120 (4.7%), 150 (3.9%) y 180 (4.6%) días fueron similares ($p>0.05$) en su contenido (Cuadro 1). Cardona *et al.* (2013) reportaron 11.1% para el pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) el cual es menor en 8% a lo obtenido en la frecuencia de corte del día 30 quien mostró el mayor contenido.

Por otro lado, Rengsirikul *et al.* (2013) obtuvo 7.7% para el cultivar taiwán (*Pennisetum purpureum*), el cual es menor en 4% a lo encontrado en la frecuencia de corte cada 60 días. Por su lado, Cárdenas *et al.* (2012) registraron 6% a los 120 días de corte en el pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), el cual es superior en 25%, 51% y 28% a las frecuencias de corte de 120, 150 y 180 días, que mostraron un contenido similar ($p>0.05$). El contenido de cenizas puede variar ampliamente entre especies de plantas y normalmente el contenido inorgánico es alto en etapas

Cuadro 1. Rendimiento de biomasa, análisis proximal y poder calorífico del pasto taiwán a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte	Rendimiento de biomasa (Mg MS ha ⁻¹ año ⁻¹)	Análisis proximal				Poder calorífico (MJ kg ⁻¹ MS)
		Humedad (%)	Cenizas (%)	Carbono fijo (%)	Materia volátil (%)	
30	10.16(±2.6) ^d	9.23(±0.26) ^a	12.19(±0.87) ^a	16.46(±1.42) ^b	71.33(±2.0) ^c	15.59(±0.43) ^c
60	10.49(±2.03) ^{cd}	8.34(±0.28) ^b	8.05(±0.65) ^b	17.14(±0.74) ^{ab}	74.80(±0.53) ^b	16.22(±0.25) ^{bc}
90	13.95(±1.22) ^c	7.36(±0.26) ^c	6.64(±0.62) ^c	18.57(±0.66) ^a	74.77(±1.03) ^b	17.19(±1.22) ^a
120	18.81(±3.40) ^b	6.62(±0.19) ^d	4.72(±0.30) ^d	16.42(±1.94) ^b	78.84(±1.89) ^a	16.98(±0.32) ^{ab}
150	18.23(±2.42) ^b	6.90(±0.26) ^d	3.97(±0.12) ^d	15.74(±1.98) ^b	80.28(±2.07) ^a	17.18(±0.78) ^a
180	33.06(±6.8) ^a	7.48(±0.57) ^c	4.69(±0.21) ^d	16.43(±0.91) ^b	78.86(±0.95) ^a	17.56(±0.66) ^a
MEDIA	17.4(±8.5)	7.66(±0.95)	6.71(±2.88)	16.79(±1.66)	76.48(±3.49)	16.79(±0.97)

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma columna, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

tempranas ya que está altamente relacionado con el contenido de iones y sales inorgánicas disueltas en el suelo y su capacidad de absorción por el sistema radicular.

3.5 Carbono fijo.

Las frecuencias de corte de 90 (18.5%) y 60 (17.1%) días, fueron similares en su contenido de carbono fijo ($p>0.05$), pero superiores y diferentes a las demás frecuencias de corte (Cuadro 1). En evaluaciones previas, Parikh *et al.* (2005) reportaron 18.6% para el pasto sudán (*Sorghum drummondii*) el cual es similar a la frecuencia de corte de 90 días, que presentó el mayor contenido; así mismo, McKendry (2002) registró concentraciones del 18% en paja de cebada. Las frecuencias de corte de 30 (16.4%), 60 (17.1%), 120 (16.4%), 150 (15.7%) y 180 (16.4%) días fueron similares ($p>0.05$) a lo reportado por Parikh *et al.* (2005) quienes encontraron 16.2% en paja de arroz.

3.6 Materia volátil.

Las frecuencias de corte de 120 (78.8%), 150 (80.2%) y 180 (78.8%) días, fueron similares ($p>0.05$) en su contenido, pero diferentes ($p<0.05$) a las demás frecuencias de corte de 90 (74.7%), 60 (74.8%) y 30 (71.3%) días, que mostraron un contenido menor (Cuadro 1). En estudios previos, Channiwala y Parikh (2002) y Parikh *et al.* (2005) reportaron material volátil de 83% y 80% en bagazo de caña y paja de trigo respectivamente, los cuales son similares en su contenido a las frecuencias de corte de 120, 150 y 180 días, que mostraron el mayor contenido. Por otro lado, Parikh *et al.* (2005) observaron 73% para el pasto sudán (*Sorghum drummondii*), el cual es similar a las frecuencias de corte de 30, 60 y 90 días, los cuales mostraron un contenido similar ($p>0.05$).

3.7 Poder calorífico.

El contenido energético ($\text{MJ kg}^{-1} \text{MS}$) fue similar ($p>0.05$) en las frecuencias de corte de 90, 120, 150 y 180 días, que fueron superior y diferente a la frecuencia de corte de 30 días ($15.5 \text{ MJ kg}^{-1} \text{MS}$), la cual mostró el menor contenido (Cuadro 1). Al respecto, Parikh *et al.* (2005) reportaron $17.3 \text{ MJ kg}^{-1} \text{MS}$ en el pasto sudán (*Sorghum drummondii*) y $17.0 \text{ MJ kg}^{-1} \text{MS}$ en paja de trigo, los cuales concuerdan con los valores registrados en las frecuencias de corte de 90, 120, 150 y 180 días que fueron similares en su contenido ($p>0.05$); así mismo obtuvieron concentraciones

de 15.6 MJ kg⁻¹ MS para paja de arroz, los cuales concuerdan con los cortes efectuados a 30 y 60 días y mostraron un contenido similar ($p>0.05$). Por otro lado, Ram y Salam (2012) reportaron un promedio de 18 MJ kg⁻¹ MS, para el pasto switchgrass (*Panicum virgatum*) el cual es superior al promedio obtenido que fue de 16.7 MJ kg⁻¹ MS.

3.8 Extractivos.

Materiales no estructurales de la biomasa (ceras y lípidos), compuestos extraíbles fácilmente con agua o disolventes pueden interferir de manera significativa con la caracterización de los carbohidratos y lignina, hasta en un 30% en la evaluación de la biomasa (Sluiter *et al.*, 2010). La frecuencia de corte modifico el contenido de extractos, siendo de mayor contenido en las frecuencias de corte de 60 y 120 días y fueron de 13.9% y 13.7% respectivamente. Entre estas frecuencias de corte no hubo diferencia ($p>0.05$); sin embargo, fueron superiores y diferentes ($p<0.05$) a los cortes de 90 (7.1%) y 180 (7.7%) días, los cuales mostraron el menor contenido (Cuadro 2).

En trabajos previos Cardona *et al.* (2013) reportaron concentraciones de 16.9% para el pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) el cual es superior en 21% y 23% a la frecuencia de corte de 60 y 120 días. Por su lado Mateus *et al.* (2012) obtuvieron 10.7% para el cultivar maralfalfa (*Pennisetum sp.*) el cual es similar al promedio obtenido en el presente experimento. Aunque los estudios en pastos aún son limitados, se han reportado valores de 2 a 8% para maderas duras y 1 a 5% para maderas suaves (Demirbas, 2004).

3.9 Holocelulosa.

La frecuencia de corte no modifico ($p>0.05$) el contenido de holocelulosa; sin embargo, se observa que la frecuencia de corte de 120 (74.3%) días fue la de mayor concentración de carbohidratos totales con respecto a las demás frecuencias de corte, aunque la diferencia solo fue numérica (Cuadro 2). En trabajos previos, Lima *et al.* (2014) registraron concentraciones de 69.9% y 71.7% para *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha*, los cuales son similares a los resultados obtenidos en el presente experimento a diferentes frecuencias de corte. Así mismo, Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) reportaron concentraciones de 72% para el pasto elefante

(*Pennisetum purpureum*) y 71.2% para el cultivar enano (*Pennisetum purpureum*), que son valores similares a los resultados obtenidos en el presente experimento.

3.10 Celulosa.

El contenido de celulosa en gramíneas es del 10% en hojas y del 20 a 40% en tallos (Cafall y Mohnen, 2009). El contenido de celulosa en las frecuencias de corte de 30 (38.3%) y 60 (37.6%) días fue similar ($p>0.05$); sin embargo, estas frecuencias mostraron el menor contenido y fueron diferentes ($p<0.05$) a las frecuencias de corte efectuadas al día 90 (42.8%) 120 (42.7%), 150 (43.1%) y 180 (41.3%) las cuales fueron similares ($p>0.05$) en su contenido (Cuadro 2).

En trabajos previos, Rengsirikul *et al.* (2013) y Lima *et al.* (2014) reportaron concentraciones del 42.6% y 43.4% para el cultivar taiwán (*Pennisetum purpureum*) y *Brachiaria brizantha* respectivamente; estos valores coinciden con los resultados obtenidos en las frecuencias de corte de 90, 120, 150 y 180 días, que fueron los de mayor contenido. No obstante, Rengsirikul *et al.* (2013) también registraron concentraciones del 37.4%, para el cultivar muaklek (*Pennisetum purpureum*), el cual es similar en su contenido a las frecuencias de corte de 30 y 60 días, donde respectivamente se encontró 38.3% y 37.6% de celulosa. En promedio el contenido de celulosa fue de 41% el cual es similar a lo reportado por Lima *et al.* (2014) quienes encontraron 41.8% en *Panicum máximum*. Así mismo, coincide con lo registrado por Rengsirikul *et al.* (2013) quienes al evaluar ocho cultivares del genero *Pennisetum sp.*, obtuvieron valores promedio de 42.4%.

3.11 Hemicelulosas.

Las hemicelulosas son polímeros de hidratos de carbono complejos y constituyen del 25 al 50% de la biomasa seca en gramíneas (Ebringerová *et al.*, 2005). Las frecuencias de corte a cada 30 (37.3%) y 60 (36.2%) días fueron similares en su contenido ($p>0.05$); sin embargo, fueron superiores y diferentes ($p<0.05$) a las frecuencias de corte de 90 (30.5%) y 150 (29.3%) días, las cuales presentaron el menor contenido (Cuadro 2). En trabajos previos, Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) reportaron concentraciones de 37.6% para el pasto elefante (*Pennisetum purpureum*), este valor es similar al contenido en las frecuencias de corte de cada 30 y 60 días; no obstante,

Cuadro 2. Composición química del pasto taiwán a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte	Extractivos (%)	Holocelulosa (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Proteína cruda (%)
30	10.16(±2.09) ^{abc}	71.44(±3.51) ^a	38.30(±0.91) ^b	33.14(±4.22) ^{ab}	17.70(±0.94) ^c	10.5(±0.71) ^a
60	13.95(±3.45) ^a	72.23(±1.62) ^a	37.65(±0.78) ^b	34.57(±1.68) ^a	16.83(±0.36) ^c	6.41(±1.09) ^b
90	7.19(±1.41) ^c	71.89(±1.49) ^a	42.83(±0.90) ^a	29.05(±1.54) ^c	19.61(±0.18) ^b	4.56(±0.18) ^c
120	13.77(±1.38) ^a	74.36(±0.62) ^a	42.70(±0.57) ^a	31.65(±0.60) ^{abc}	19.76(±0.41) ^b	3.53(±0.52) ^{cd}
150	11.57(±0.95) ^{ab}	72.19(±0.56) ^a	43.18(±0.37) ^a	29.00(±0.39) ^c	21.13(±0.23) ^a	2.67(±0.45) ^d
180	7.75(±1.82) ^{bc}	71.40(±0.60) ^a	41.36(±1.96) ^a	30.04(±1.54) ^{bc}	20.96(±0.91) ^a	3.49(±0.51) ^c
MEDIA	10.73(±3.37)	72.25(±2.04)	41.01(±2.49)	31.24(±2.98)	19.33(±1.71)	5.20(±2.77)

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma columna, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

los mismos autores obtuvieron 31.0% para king grass (*Pennisetum purpureum*) el cual es similar en su contenido a las frecuencias de corte a cada 90, 120, 150 y 180 días.

En otros trabajos, Lima *et al.* (2014) reportaron en promedio 28% de hemicelulosas para *Pennisetum purpureum*, el cual es inferior en tres unidades porcentuales al promedio obtenido en el presente experimento; así mismo, el rango obtenido para estos compuestos fue de 29% a 34.5%, el cual es similar a los valores observados por van der Weijde *et al.* (2013) quienes reportaron del 25 a 34% para switchgrass (*Panicum virgatum*).

3.12 Lignina.

La lignina es un polímero complejo formado de unidades fenil propano (*p-coumaryl*, *coniferyl* y *sinapil alcohol*) y representa del 10 al 30% del total de la biomasa seca en gramíneas (Limayem y Ricke, 2012). El contenido de lignina se incrementó linealmente a medida que la planta avanzó en su desarrollo fisiológico, el mayor contenido se obtuvo en los cortes de 150 (21.1%) y 180 (20.9%) días, entre estos cortes no hubo diferencia ($p>0.05$) sin embargo, fueron diferentes ($p<0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 2).

Lima *et al.* (2014) reportaron 24% de lignina para (*Pennisetum purpureum*) el cual es superior en tres unidades porcentuales a lo obtenido en las frecuencias de corte de 150 y 180 días. No obstante, Mateus *et al.* (2012) registraron 16.3% en el cultivar maralfalfa (*Pennisetum sp.*), el cual es similar a las frecuencias de corte de 30 y 60 días, los cuales mostraron el menor contenido. En evaluaciones bioenergéticas no son deseables contenidos altos de lignina ya que su arquitectura y la bioquímica de sus enlaces presentes en las gramíneas se adhieren a la celulosa y hemicelulosa limitando la hidrólisis y fermentación de los azúcares; sin embargo, es bien conocido que a medida que avanza la edad en la planta su concentración tiende aumentar de manera natural (McCann y Carpita, 2008).

3.13 Proteína cruda.

La importancia de evaluar el contenido de nitrógeno, es para disminuir el efecto de esta variable en la cuantificación de lignina ya que indirectamente puede alterar la composición química de la biomasa (Sluiter *et al.*, 2008). El contenido de proteína disminuyó a medida que la planta avanzó

en su desarrollo fisiológico, el mayor contenido se obtuvo en la frecuencia de corte a cada 30 días (10.5%), el cual fue diferente ($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 2). En el presente experimento se observó reducciones del 39% al pasar del corte de 30 a 60 días; una disminución de 57% al pasar del corte de 30 a 90 días y una disminución de 75% al pasar de 30 a 150 días. Al respecto, Cárdenas *et al.* (2012) reportaron concentraciones del 8.6%, 5.4% y 4.2% de proteína cruda en tallo a 30, 60 y 90 días respectivamente, lo cual indica una tendencia similar a lo obtenido en el presente estudio, donde el contenido de proteína disminuye a medida que se incrementa la edad en la planta.

Así mismo, Ventura *et al.* (2015) reportaron valores de 9.3%, 6.1% y 5.4% de proteína cruda en pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) a 30, 60 y 90 días después del corte, respectivamente; estos valores, indican una reducción del 34% y 42% a medida que se incrementa la frecuencia de corte. La variación en el contenido de proteína cruda puede deberse a un descenso de la actividad metabólica que experimentan los pastos a medida que avanza su estado fenológico y con esta, la síntesis de compuestos nitrogenados disminuye en comparación con los estadios más jóvenes (Cárdenas *et al.*, 2012), así mismo, Ramírez *et al.* (2013) argumentan que el descenso de proteína cruda conforme avanza su estado de madurez, se debe a que los compuestos nitrogenados son absorbidos rápidamente por el sistema radical en etapas vegetativas tempranas, cuando el pasto acelera su crecimiento, la cantidad de nitrógeno se diluye dado que el incremento de materia seca no-nitrogenada supera a la absorción de este nutriente.

3.14 Rendimiento de bioetanol.

Los polisacáridos de la pared celular pueden ser usados como materia prima para la producción de bioetanol y otros biocombustibles una vez que hayan sido pretratados y descompuestos en azúcares simples para una fermentación eficiente (del Río *et al.*, 2012). En el presente experimento se calculó el rendimiento de bioetanol por hectárea para cada frecuencia de corte en base a la fórmula propuesta por Badger (2002) utilizando el sustrato proveniente de la celulosa (glucosa) y hemicelulosas (xilosa). Se obtuvo el mayor rendimiento de bioetanol por hectárea en la frecuencia de corte de 180 días, que fue de 4010.4 (± 1025.1) y 2259.2 (± 366.2) kg ha⁻¹ año⁻¹ para la glucosa y la hemicelulosas, respectivamente, los cuales fueron diferentes ($p < 0.05$) a las

demás frecuencias de corte, estas concentraciones de bioetanol produjeron un total de 6269.6 (± 1385.3) kg ha⁻¹ año⁻¹ o su equivalente 7936.2 (± 1753.5) L ha⁻¹ año⁻¹ (Cuadro 3). Las frecuencias de corte efectuadas cada 30 (2399.9 L ha⁻¹ año⁻¹), 60 (2499.4 L ha⁻¹ año⁻¹) y 90 (3373.3 L ha⁻¹ año⁻¹) días fueron similares ($p > 0.05$) y presentaron el menor contenido.

En trabajos previos, Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) reportaron rendimientos de 6331.3 L ha⁻¹ año⁻¹ para el pasto enano (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) y 6717 L ha⁻¹ año⁻¹ en el pasto guineo (*Panicum máximum*), los cuales fueron inferiores en un 20% y 15% a lo obtenido en la frecuencia de corte de 180 días; no obstante, también reportaron rendimientos de 2621 y 2562 L ha⁻¹ año⁻¹ para el pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) y king grass (*Pennisetum purpureum*) respectivamente, los cuales son similares a las frecuencias de corte a cada 30, 60 y 90 días, quienes mostraron un contenido similar ($p > 0.05$). Las frecuencias de corte efectuadas a cada 120 y 150 días produjeron cantidades similares (4691.5 y 4435.9 L ha⁻¹ año⁻¹) y fueron superiores en 10% y 4% respectivamente, a lo reportado para el cultivar ruzi (*Brachiaria ruziziensis*), que produjo 4272.6 L ha⁻¹ año⁻¹ (Wongwatanapaiboon *et al.* 2012).

En otros trabajos, evaluando biomasa de gramíneas, Lima *et al.* (2014) obtuvieron 8478.6 L ha⁻¹ para bagazo de caña el cual es superior en 7% a lo obtenido en la frecuencia de corte de 180 días, que produjo 7936.2 L ha⁻¹ año⁻¹. El pasto taiwán (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone, tiene la capacidad de producir 29 000 kg de holocelulosa cortada cada 180 días, el cual puede ser considerada como una buena fuente de biomasa para la producción de bioetanol de segunda generación, con capacidad de producir 9700 L ha⁻¹ año⁻¹; este rendimiento se compara favorablemente con otros resultados reportados con fuentes primarias de primera generación como el jugo de caña de azúcar y maíz que pueden producir 6900 L ha⁻¹ y 3800 L ha⁻¹, respectivamente (Somerville *et al.*, 2010). Otra razón principal para hacer uso de la biomasa de pastos C₄ para bioenergía, se debe a que son eficientes en el uso del agua, es decir requieren poca agua para su establecimiento comparado con cultivos C₃ (van der Weijde *et al.*, 2013).

Por otro lado, existe una limitante para la conversión bioquímica de los azúcares en bioetanol lignocelulósico ya que el proceso es complejo y es necesario evaluar componentes estructurales y no estructurales de la pared celular, particularmente la pared celular secundaria, ya

Cuadro 3. Rendimiento teórico de bioetanol del pasto taiwán a seis frecuencias de corte.

Frecuencia de corte	Rendimiento de bioetanol (kg ha ⁻¹ año ⁻¹)			Litros ha ⁻¹ año ⁻¹
	Glucosa	Xilosa	Total	
30	1138.1 (±317.6) ^c	757.83 (±161.5) ^c	1895.9 (±469.9) ^d	2399.9 (±594.8) ^d
60	1145.9(±212.4) ^c	828.6 (±146.8) ^c	1974.5(±353.4) ^d	2499.4 (±447.4) ^d
90	1738.5(±168.8) ^{bc}	926.3(±41.0) ^c	2664.9 (±203.6) ^{cd}	3373.3 (±257.7) ^{cd}
120	2341.4 (±450.2) ^b	1364.8(±237.9) ^b	3706.3 (±687.5) ^b	4691.5 (±870.3) ^b
150	2290.8(±314.7) ^b	1213.5 (±159.9) ^b	3504.4 (±473.9) ^{bc}	4435.9 (±599.9) ^{bc}
180	4010.4(±1025.1) ^a	2259.2 (±366.2) ^a	6269.6 (±1385.3) ^a	7936.2 (±1753.5) ^a
MEDIA	2111±1114	1225±558	3336±1664	4223±2106

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma columna, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

que algunos compuestos como los extractivos pueden alterar la composición química de la biomasa, así como el contenido de lignina, que actúa como una barrera protegiendo los polisacáridos, limitando una sacarificación eficiente y haciendo este proceso más costoso y tardado (van der Weijde *et al.*, 2013). En la industria de biocombustibles líquidos, existen en el mercado microorganismos como la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) capaces de sacarificar y fermentar azúcares provenientes de la celulosa y hemicelulosas; sin embargo, no se logra obtener el 100% de efectividad, siendo el rendimiento teórico en base a 100 g de glucosa que producirán 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono (Badger, 2002).

En la actualidad investigaciones están siendo realizadas por el Departamento de Energía en los Estados Unidos (USDOE) con el objetivo de acelerar el proceso de conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol líquido y se espera que para el 2030 al menos un 30% de hidrocarburos sea reemplazado por biocombustible líquido con el firme propósito de disminuir emisiones de gases de efecto invernadero ya que los productos bioenergéticos son favorables con el ambiente y reducen el CO₂ y otras emisiones (SO₂ y NO₂) que dañan la atmósfera.

4. CONCLUSIONES

La frecuencia de corte cada 180 días produjo mayor biomasa, mejoró el contenido de celulosa y poder calorífico, permitiendo una mayor producción de bioetanol por hectárea y presentó el menor contenido de extractivos, cenizas y humedad.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial CONACyT-SENER Sustentabilidad Energética a través del Proyecto No. 151370 por el apoyo en los análisis químicos y al laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP en Puebla, Méx.

5. LITERATURA CITADA

- AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA. 1298 p.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1977. Method of test for Holocellulose in wood ASTM D1104-56. Annual book of ASTM standards. Part 22: Wood; Adhesives. Pennsylvania: ASTM. pp.346-348.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 2009. Standard test method for ash in wood. ASTM D1102, Annual Book of ASTM Standards, Volume 04.10 Wood pp. 174-175.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 2012. Annual book of ASTM standards, volume 11.16 Biological effects and enviromental fate; biotechnology. ASTM E870 pp. 96-97, ASTM E871, pp.98-99, ASTM E-872, pp.100-102.
- American Society for Testing and Materials (ASTM).1996. Standard test method for gross calorific value of refuse-derived fuel by the bomb calorimeter. ASTM E711, Annual Book of ASTM Standards. Waste management, pp. 265-271.
- Badger, C. P. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. Trends in new crops and new uses. J. Janick y A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA.
- Brosse, N., Dufour, A., Meng, X., Sung, Q. y A. Ragauskas. 2012. *Miscanthus*: a fast - growing crop for biofuels and chemicals production. Biofuels, Bioprod. Bioref. 6:580-598.
- Calzada, M. J. M., Enríquez, Q. J. F., Hernández, G. A., Ortega, J. E. y S. I. M. Pedroza. 2014. Análisis de crecimiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) en clima cálido subhúmedo. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 5(2): 247-260.
- Cárdenas, R. L. R., Pinto, R. R., Medina, F. J., Guevara, F., Gómez, H., Hernández, A. y J. Carmona. 2012. Producción y calidad del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp) durante la época seca. Quehacer Científico en Chiapas. 1(13): 38-46.
- Cardona, M. E., Ríos, A. J., Peña, D. J. y A. L. Ríos. 2013. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum* sp) y king grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de bioetanol. Información Tecnológica. Vol. 24(5), 69-80.

- Cafall, K. H. y D. Mohnen. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 344:1879-1900.
- Channiwala, A. S. y P. P. Parikh 2002. A unified correlation for estimating HHV of solid, liquid and gaseous fuels. *Fuel* 81: 1051-1063.
- Chemisquy, A. M., Giussani M. L., Scataglini, A.M., Kellogg, A. E. y O. Morrone. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany* 106: 107–130.
- Chen, F., Srinivasa, R. M. S., Temple, S., Jackson, L., Shadle, G. y A. R. Dixon. 2006. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Plant.* 48:113-124.
- Demirbas, A. 2004. Combustion characteristics of different biomass fuels. *Prog. Energy. Combust. Sci.* 30: 219-230.
- del Río, C. J., Prinsen, P., Rencoret, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Ralph, J., Martínez, T. A. y A. Gutiérrez. 2012. Structural characterization of the lignin in the cortex and pith of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) Stems. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3619-3634.
- Ebringerová, A., Hromadkova, Z., y T. Heinze. 2005. Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.* 186: 1-67.
- Enríquez, Q. J. F. y J. M. Romero. 1999. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria sp.* en Isla, Veracruz. *Agrociencia*. 33(2):141-148.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM; México. 217p.
- Kozloski, G. V., Perottoni, J. y L. M. B. Sánchez. 2005. Influence of regrowth age on the nutritive value of dwarf elephant grass hay (*Pennisetum purpureum* Schum. Cv. Mott) consumed by lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 119:1-11.
- Ladisich, M. R., Mosier, N. S., Kim, Y., Ximenes, E. y D. Hogsett. 2010. Converting cellulose to biofuels. *Chemistry Engineering Progress*. 106 (3):56-63.
- Lima, M. A., Gomez, D. L., Steele-King, G. C., Simister, R., Bernardinelli, D., Carvalho, M. A., Rezende, A. C., Labate, C. A., R de Azevedo, E., McQueen-Mason, S. J. y I. Polikarpov.

2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnol. Biofuels.* 7:1-19
- Limayem, A. y S. C. Ricke. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science.* 38: 449-467.
- Mateus, L., Hernández, O., Velázquez, M. y J. De J. Díaz. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of goliath grass (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) for ethanol cellulosic. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV: 146-156.
- McCan, C. M. y N. C. Carpita. 2008. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Plant biology.* 11:314–320.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour Technol.* 83: 37- 46.
- Mohammed, Y. I., Abakr, A. Y., Kazi, K. F., Yusup, S., Alshareef, I. y A. S. Chin. 2015. Comprehensive characterization of napier grass as a feedstock for thermochemical conversion. *Energies.* 8: 3403-3417.
- Parikh, J., Channiwala, S. A. y G. K. Ghosal. 2005. A correlation for calculating HHV from proximate analysis of solid fuels. *Fuel.* 84: 487-494.
- Ram, N. D. y P. A. Salam. 2012. Estimation of higher heating value of biomass from proximate analysis: A new approach. *Fuel.* 99:55-63.
- Ramírez, O. S., Domínguez, D. D., Salmerón, Z. J. J., Villalobos, V. G. y J. A. G. Ortega. 2013. Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (4): 395-403.
- Ramos, T. O., Canul, S. J. R. y F. D. J. Vera. 2013. Production of three varieties of *Pennisetumpurpureum* fertilized with two different sources of nitrogen in Yucatan, Mexico. *Rev. Bio Ciencias.* 2 (2): 60-68.
- Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Prapa, S., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., Nakamane, G. y T. Sayan. 2013. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand. *J. Sustainable Bioenergy Systems.* 3:107-112.

- Rowell, R. M., R. Pettersen, J. S. Han, J. S. Rowell y M. A. Tshabalala. 2005. Cell Wall Chemistry. *In*: Rowell, R. M. Ed. Handbook of wood chemistry and wood composites. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp: 35-74.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Release 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Santana, P. A. A., Pérez, L. A. y A. M. E. Figueredo. 2010. Efectos del estado de madurez en el valor nutritivo y momento óptimo de corte del forraje napier (*Pennisetum purpureum* Schum.) en época lluviosa. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 1 (3):277-286.
- Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, C. S. y S. P. Long. 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science.* 329: 790-792.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. y D. Templeton. 2008. Determination of extractives in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619.
- Sluiter, B. J., Ruiz, O. R., Scarlata, J. C., Sluiter, D. A. y D. W. Templeton. 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9043–9053.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006-2007. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing. CD Version, Atlanta, GA.,U.S.A. 5 p.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006-2007. Preparation of wood for chemical analysis. T 264 cm-97. TAPPI Test Methods. Fibrous Materials and Pulp Testing. CD Version, Atlanta, G.
- van der Weijde, T., Kamei, A. C. L., Torres, A. F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R. G. F. y L. M. Trindade. 2013. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Plant Sci.* 4(107):1-18.
- Ventura, R. J., Honorato, S. J. A., Hernández, G. A., Reyes, V. I., A. R. R. García. 2015. Producción y calidad del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x pennisetum purpureum*) a diferentes frecuencias de corte. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal y XL Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal, SOCHIPA. A.G. p. 385.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. y W. Chulalaksananukul. 2012. The potential of

cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. *J. Biomed Biotechnol.* 2012: 1-10.

CAPÍTULO IV

EFECTO DE LA FRECUENCIA DE CORTE SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PASTO TAIWÁN *Cenchrus purpureus* (Schumach.) MORRONE PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Joel Ventura Ríos

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rendimiento de biomasa, caracterización química y producción de bioetanol a tres frecuencias de corte del pasto taiwán *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en un diseño experimental de bloques al azar en parcelas divididas con tres repeticiones. La mayor producción de biomasa ($33.0 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), azúcares totales (59.9%) y xilosa (11.3%) ($p < 0.05$) se registró en la frecuencia de corte de 180 días. La frecuencia de corte cada 120 días mostró el mayor contenido de azúcares reductores ($p < 0.05$), lignina total, lignina insoluble en ácido (LIA), residuo insoluble en ácido (RIA) y glucosa que fue de 52.2, 22.8, 21.5, 26.0, 42.3 (%), respectivamente. Mientras que el contenido de lignina soluble en ácido (LSA) fue mayor en la frecuencia de corte de 150 días (1.5%; $p < 0.05$). El contenido de humedad y cenizas no presentaron diferencias ($p > 0.05$). La concentración de azúcares totales obtenidos con pretratamiento básico oxidante no mostro diferencias ($p > 0.05$) en las diferentes frecuencias de corte, mientras que los azúcares reductores (1.4%) y LSA (0.66%) fueron diferentes ($p < 0.05$) en la frecuencia de corte de 120 días. Por otro lado, la hidrólisis enzimática generó 54.6% de azúcares totales ($p < 0.05$) y 48.2% de azúcares reductores ($p < 0.05$) en la frecuencia de corte de 120 días. Durante la fermentación alcohólica luego de 70 horas de reacción, se produjo bioetanol con capacidad de 1475 L ha^{-1} y los azúcares reductores disminuyeron desde 300 hasta 70 g/L. De acuerdo al rendimiento de biomasa y composición química, del pasto taiwán *Cenchrus purpureus* (Schum.) Morrone, la biomasa de esta especie puede ser utilizada como fuente bioenergética.

Palabras clave: *Cenchrus*, composición química, pretratamiento, sacarificación, bioetanol, frecuencia de corte.

**EFFECT OF THE CUTTING FREQUENCY ON THE CONCENTRATION OF
FERMENTABLE SUGARS AND CHEMICAL COMPOSITION OF TAIWÁN GRASS
Cenchrus purpureus (Schumach.) MORRONE FOR BIOETHANOL PRODUCTION**

ABSTRACT

Biomass production ($33.0 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$), total sugars (59.9%) and xylose (11.3%) were greater at the cutting frequency of 180 days ($p < 0.05$). The cutting frequency of 120 days ($p < 0.05$) showed the highest content (%) of reducing sugars, total lignin, acid insoluble lignin (AIL), acid insoluble residue (AIR) and glucose, which was 52.2, 22.8, 21.5, 26.0, 42.3, respectively; while the content of acid soluble lignin (ASL) was higher at the cutting frequency of 150 days (1.5%; $p < 0.05$). The moisture and ash content did not show significant differences ($p > 0.05$). Significant differences ($p > 0.05$) were not found for the concentration of total sugars obtained with the oxidizing basic pretreatment at different cutting frequencies, while reducing sugars (1.4%) and LSA (0.66%) were significantly different ($p < 0.05$) at the cutting frequency of 120 days. On the other hand, enzymatic hydrolysis produced 54.6% of total sugars ($p < 0.05$) and 48.2% reducing sugars ($p < 0.05$) in the cutting frequency of 120 days. After 70 hours of reaction, alcoholic fermentation produced bioethanol with a capacity of 1475 L ha^{-1} and reducing sugars decreased from 300 to 70 g/L. According to biomass yield and chemical composition of taiwán grass *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, the biomass of this species can be used as bio-energy source.

Keywords: *Cenchrus*, chemical composition, pretreatment, saccharification, bioethanol cutoff frequency.

1. INTRODUCCIÓN

La celulosa como fuente alterna de bioenergía ha sido de gran interés durante la última década; sin embargo, instituciones gubernamentales y las industrias en biorefinería han dado prioridad a materiales lignocelulosicos con el fin de contribuir a la producción de hidrocarburos, disminuir la contaminación ambiental y reducir la acumulación de CO₂ en la atmósfera (del Río *et al.*, 2012); a la par, las fuentes de primera generación han generado escases y como consecuencia un incremento en los precios de fuentes de alimentos de uso común para la humanidad (Mohammed *et al.*, 2015).

Debido a su excelente rendimiento de biomasa (51 t MS ha⁻¹; Rengsirikul *et al.*, 2013) y composición química (Lima *et al.*, 2014), los pastos pueden ser considerados como una fuente de materia prima importante en la industria del bioetanol ya que son de rápido crecimiento, resistentes a plagas y enfermedades y para su establecimiento se requiere una inversión mínima comparado con otros cultivos agrícolas (Keshwani y Cheng, 2009).

En base a la composición química de los pastos, se han reportado los siguientes rendimientos de etanol (L ha⁻¹): napier grass 2621, king grass 2562 y pasto guinea 6700 (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012) y utilizando almidón de maíz, Gulati *et al.* (1996) reportaron 4000 L ha⁻¹ y 2000 L ha⁻¹ con rastrojo de maíz (Perlack y Turhollow, 2003). Aunque la composición química de las fuentes lignocelulosicas es alta en glucosa y xilosa, estos azúcares no están disponibles de una manera sencilla, dado que la bioquímica de la lignina adherida a la celulosa impide el proceso eficiente de hidrólisis y fermentación (Ladisich *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011) ya que la celulosa adherida a la lignina requiere grandes cantidades de enzimas para hidrolizarla y sin embargo, en esta reacción se generan enzimas no productivas, la cual hace más difícil e ineficiente el proceso impidiendo la degradación de celulosa (Chen *et al.*, 2006), de tal manera que es necesario depender de pretratamientos fisicoquímicos para liberar los hidratos de carbono de los compuestos aromáticos para una conversión eficiente en bioetanol (Sun y Cheng, 2002). Por otro lado, Elshahed (2010) argumenta que, aunque existan microorganismos capaces de metabolizar azúcares de cinco carbonos, *Pichia stapis* y hongos anaeróbicos, las rutas aún no

están bien definidas, y trabajos en ingeniería genética son desarrollados con la finalidad de obtener mayor eficiencia en la bioconversión de levadura-sustrato.

En México, los estudios científicos utilizando biomasa de pastos como fuentes alternas de energía, son limitados, sin embargo, se han documentado trabajos evaluando el género *Cenchrus purpureus* (Schum.) Morrone, [previamente *Pennisetum purpureum*, (Chemisquy *et al.*, 2010)] con enfoque para nutrición animal (Cárdenas *et al.*, 2003), densidades de siembra (Nava *et al.*, 2013), análisis de crecimiento (Calzada *et al.*, 2014) y rendimiento de biomasa (Ramos *et al.*, 2015), ya que este género, en la última década ha sido de gran importancia en la región tropical de México, para uso común en la alimentación del ganado, por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento de biomasa, caracterización química y producción de bioetanol del pasto taiwán *Cenchrus purpureus* (Schum.) Morrone cosechado a diferentes frecuencias de corte.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Datos del experimento.

El estudio se realizó en el Sitio Experimental “Papaloapan” de INIFAP, a 18° 06' LN y 95° 31' LO y 65 msnm, en Cd. Isla, Veracruz, con clima A_{wo} y temperatura media anual de 25.7 °C (García, 1988). La siembra se efectuó el 22 de julio de 2011, en surcos con separación de 0.50 m, en parcelas experimentales de 5 metros de ancho por 16 metros de largo. Las praderas se fertilizaron con la siguiente formula: 120-80-00 kg/ha de N y P₂O₅, y el N se dividió en dos aplicaciones a 43 y 112 días después de la siembra. El suelo es acrisol órtico, franco-arenoso, con pH de 4 a 4.7, pobre en materia orgánica, nitrógeno, calcio, potasio y contenidos medios a altos de fósforo y magnesio (Enríquez y Romero, 1999). Los tratamientos consistieron en tres frecuencia de corte (120, 150 y 180 días) distribuidos en bloques al azar en parcelas divididas, donde la parcela mayor fue el pasto y la menor la frecuencia de corte, con tres repeticiones. Las determinaciones físico-químicas de materia seca (MS) del pasto se realizaron en el laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP, San Martinito, Puebla, y en el Instituto Mexicano del Petroléo, Méx., D.F.

2.2 Rendimiento de biomasa (kg MS ha⁻¹).

Se determinó para cada frecuencia de corte [120, 150 y 180 días después del corte de homogeneización (**ddch**)], mediante muestreos destructivos, durante un año. Para ello, en cada parcela se cosecho un área central de 2 m x 3 m, dejando un metro de borde en cada lado y 50 cm entre frecuencias de corte (6 m²) y se cortó el forraje total a 20 cm de altura, para la recuperación de la planta. La biomasa cosechada se pesó en balanza de precisión (Ohaus, Mod. GT-4000; 6.200 kg ± 0.1 g). Posteriormente, se tomó una submuestra, se registró el peso fresco y se introdujo en una estufa de aire forzado (Felisa, Mod. FE-243A), a 55 °C hasta peso constante y se calculó la cantidad de materia seca (MS). Las muestras secas fueron después pulverizadas en un molino Wiley® (Arthur H. Tomas, Philadelphia, PA, USA) y tamizadas entre las mallas del No. 40 (0.42 - 1.00 mm) y No. 60 (0.25 - 0.42 mm), para posteriormente realizar las determinaciones químicas.

2.3 Caracterización de la biomasa lignocelulósica.

La humedad se determinó agregando 0.5 g de biomasa en una termobalanza (Ohaus, Mod. GT-4000). El porcentaje de cenizas se determinó pesando 3 g de biomasa en un crisol de porcelana a peso constante, posteriormente se incinero con un mechero bunsen durante 30 minutos y se llevó a una mufla a 550 °C durante 24 horas. El contenido de cenizas se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Biomasa (g)} - \text{biomasa salida de la mufla (g)}}{\text{Biomasa (g)}} \times 100$$

Para evaluar el contenido de azúcares totales, azúcares reductores, perfil de carbohidratos, lignina soluble en ácido, lignina insoluble en ácido y residuo insoluble en ácido (RIA), la biomasa fue hidrolizada con ácido sulfúrico; (la hidrólisis realizó por triplicado). Se pesaron 300 mg de pasto y se vertieron en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico al 75% v/v a cada muestra, los matraces se agitaron a 150 rpm durante una hora a 30 °C. Después se agregaron 51 mL de agua destilada para diluir la solución al 4% v/v de H₂SO₄ y se colocaron en una autoclave a 121 °C durante una hora. Una vez que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se filtraron al vacío utilizando filtros de vidrio. El sólido obtenido se secó en una estufa a 105 °C durante 24 horas, y se midió el volumen de filtrado obtenido en cada muestra. El residuo insoluble en ácido, se obtiene pesando el sólido después de 24 h de secado en la estufa y se calculó de la siguiente manera:

$$\% RIA = \frac{\text{sólido seco (g)}}{3 \text{ g pasto}} * 100$$

Las tres muestras líquidas se neutralizaron con carbonato de calcio y a partir de ellas se determinó azúcares totales (AT; Dubois *et al.*, 1956), azúcares reductores (AR; Nielsen, 2007), lignina soluble en ácido, lignina insoluble en ácido, residuo insoluble en ácido (Sluiter *et al.*, 2011) y perfil de carbohidratos por HPLC. Para determinar el porcentaje de lignina soluble en ácido (% LSA), se tomó una alícuota de 0.25 mL de muestra, se adicionó 0.75 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a longitud de onda de 320 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic Helios, USA. La determinación de % LSA debe hacerse en un tiempo menor a 4 horas después de obtener las muestras de la hidrólisis ácida. El porcentaje de

lignina insoluble en ácido (% LIA) es la diferencia entre el % RIA y el % de cenizas, la suma del % LSA y el % LIA constituye la lignina total del pasto (Sluiter *et al.*, 2011).

Determinación de azúcares reductores (AR). Se tomó una alícuota de 0.25 mL de filtrado y se adicionó 0.75 mL de agua destilada, después se agregó 1 mL de reactivo de DNS y se calentó la muestra durante 5 minutos en un baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic Helios, USA. La concentración de azúcares reductores se determinó mediante una curva patrón de absorbancia (540 nm) contra concentración de glucosa.

Determinación de azúcares totales. Se tomó una alícuota de 0.02 mL de filtrado y se adicionó 0.98 mL de agua destilada, después se agregó 1 mL de solución de fenol al 5% v/v y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (grado reactivo). Se dejó enfriar la muestra durante 30 minutos y se determinó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic Helios, USA. La concentración de azúcares totales se determinó mediante una curva patrón de absorbancia (490 nm) contra concentración de glucosa.

El perfil de carbohidratos se obtuvo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se tomó una alícuota de 0.4 mL de filtrado, se adicionó 0.1 mL de alanina (3 mg/L, como estándar interno) y 0.5 mL de agua grado HPLC. La muestra se analizó en un cromatógrafo de líquidos marca HP, equipado con una columna BioradAminex HPX-87P y una precolumna adecuada. Como fase móvil se utilizó una mezcla acetonitrilo-agua y un detector de dispersión de luz ELSD. Para determinar el contenido de azúcares en la muestra (perfil de carbohidratos), se hicieron curvas de patrón de glucosa, xilosa, fructosa, manosa, sacarosa y celobiosa.

2.4 Pretratamiento.

La biomasa del pasto taiwán se pre trató con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno; la reacción entre estos dos compuestos y el efecto que causa en el pasto constituye el pretratamiento básico-oxidante. El pretratamiento se llevó a cabo en un reactor Parr horizontal de

1 L, en él se agregaron 50 g de pasto taiwán seco (tamiz 60), 196 mL de hidróxido de sodio 1.1 M y 83.3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Después se programó la agitación a 150 rpm y la temperatura interna de 50 °C. La presión (180 psi) generada por oxígeno que es uno de los productos de la reacción, obliga a despresurizar el reactor antes de abrirlo. La pasta obtenida luego de pretratar presenta un pH de 11-12, por lo que se adicionó ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 5. Se determinaron azúcares totales, azúcares reductores y lignina soluble en ácido (% LSA) del material pretratado de acuerdo a las técnicas ya descritas.

2.5 Hidrólisis enzimática.

El objetivo es romper la celulosa y hemicelulosa en azúcares más simples como glucosa, xilosa y fructosa, entre otros. La reacción está catalizada por un coctel enzimático comercial de Novozymes aquí denotado como E9, detectando las siguientes actividades: celulasa 284 FPU/mL, endocelulasa 34.10 IU/mL, exocelulasa 162.6 μmol glucose/min, y β -glucosidasa 6424.4 μmol p-NP/mL min. La actividad de celulosa fue determinada de acuerdo a Adney y Baker (2008). El resto de las actividades se determinaron con buffer de citrate 50 mM, pH 4.8, a 50 °C y 180 rpm por una hora usando como sustratos pNPG 2 mM (β -glucosidasa), carboxymethylcelulosa 0.5% (endocelulasa), y celulosa microcristalina 1.25% (exocelulasa).

La reacción se efectuó en una celda de ultrafiltración de 1 galón (3.78 litros), en la que se adicionaron 50 g de pasto taiwán pretratado (pH 5), después se vertieron 0.68 L de buffer de citratos pH 4.8 y 0.045 L de enzima E9. La hidrólisis enzimática se mantuvo a 50 °C y 150 rpm durante 24 horas. Después de 24 horas de reacción, se tomó una alícuota de 1 mL para determinar el contenido de azúcares totales y azúcares reductores por el método DNS y fenol-sulfúrico, respectivamente. Con la hidrólisis se esperaba convertir la mayor cantidad de azúcares poliméricos en azúcares fermentables para su posterior fermentación a etanol.

2.6 Fermentación.

La fase líquida obtenida de la hidrólisis enzimática se fermentó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para convertir los azúcares extraídos del pasto en etanol. Primero, se preparó un medio de producción y un medio semilla (también conocido como preinóculo). Se prepararon 80 mL de

preinóculo con la composición como se describe a continuación (g/L): glucosa 15, extracto de levadura 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 5. El medio de cultivo se dividió en dos matraces, 40 mL en cada uno. Después, se ajustó el pH del medio de cultivo a 5 y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez fríos se inocularon con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se incubaron en un baño de agua a 30 °C y 150 rpm durante 17 horas.

La solución rica en azúcares proveniente de la hidrólisis enzimática se dividió en dos matraces, vertiendo la misma cantidad de líquido en cada uno. A cada matraz se adicionó extracto de levadura en concentración de 2 g/L y la cantidad de glucosa necesaria para llegar a una concentración de 300 g/L. Ambos medios de producción se ajustaron a pH 5 y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Luego de 17 horas de incubación de los medios del pre inóculo, se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm y 4 °C, el sobrenadante se desechó y el precipitado fue utilizado para inocular el medio de producción. Ambos matraces se mantuvieron en un baño de agua a 30 °C y 150 revoluciones por minuto durante 70 horas. Se tomó 1 mL de cada muestra a intervalos regulares y se determinó índice de refracción, concentración de biomasa por densidad óptica a 620 nm, azúcares reductores y contenido de etanol por cromatografía de gases en cada uno de los medios de producción. Para la cromatografía de gases, se usó un cromatógrafo de gases HP modelo 6890, equipado con una columna AT-WAX para cuantificar etanol en la muestra. Los azúcares reductores se determinaron de manera similar a lo antes descrito y la densidad óptica a 620 nm se midió en un espectrofotómetro UV-Vis Helios modelo Alpha.

2.7 Destilación.

Luego de la fermentación, se destiló el etanol producido en esta etapa. El líquido proveniente de la fermentación contiene principalmente etanol, agua y glucosa, siendo el primer compuesto el más volátil (punto de ebullición 78 °C) y el último el menos volátil. Se separó el alcohol disuelto en el producto fermentado para obtenerlo con la mayor pureza posible. Los azúcares no transformados durante la fermentación no son volátiles por lo que permanecieron disueltos en la

fase líquida durante la destilación. La destilación se hizo a presión atmosférica (585 mm Hg) con un equipo de laboratorio marca Aldrich. Se vertieron 200 mL del líquido fermentado en un matraz bola de 250 mL, se adicionaron algunas perlas de ebullición y se montó el equipo de destilación. Para calentar el matraz de bola se ocupó una parrilla eléctrica, la cual se puso en funcionamiento antes de destilar para mantener la temperatura del matraz de bola constante durante la destilación.

El condensador del equipo de destilación se enfrió con agua destilada a 10 °C, bombeada al sistema mediante un recirculador marca Haake modelo DC 10. Cuando el equipo de destilación alcanza condiciones estables de enfriamiento en el condensador y calentamiento en el matraz de bola, se comienza con la destilación de 200 mL de líquido fermentado y se recolecta el destilado durante 3.5 horas. Inmediatamente después se retiró el matraz de bola de la parrilla de calentamiento y se dejó enfriar el equipo de destilación a temperatura ambiente. Luego, se midió el volumen de destilado y residuo. Por último, se determinó la concentración de etanol en ambas muestras mediante cromatografía de gases. El líquido proveniente de la fermentación se destiló en 4 lotes de manera similar a lo antes descrito.

2.8 Análisis estadístico.

Los datos se agruparon de manera anual, para su análisis estadístico. Se utilizó un modelo de análisis de varianza de bloques al azar donde los factores de estudio fueron: la frecuencia de corte (120, 150 y 180 ddch), con tres repeticiones. La comparación múltiple de las medias de tratamientos se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), mediante el procedimiento estadístico PROC GLM del software SAS para Windows versión 9.3 (SAS, 2011).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento de biomasa.

La producción anual de biomasa se incrementó linealmente a medida que la planta avanzó en su desarrollo fisiológico, la mayor producción se obtuvo en la frecuencia de corte de 180 días con 33.0 Mg MS ha⁻¹ y fue estadísticamente diferente ($p<0.05$) a las demás frecuencias de corte

(Cuadro 1). La frecuencia de corte a cada 180 días superó en 83% a las frecuencias de corte de 150 y 120 días. En trabajos previos, Lima *et al.* (2014) reportaron rendimientos de 35 Mg ha⁻¹ para el género *Pennisetum purpureum*; este resultado superó en 2 Mg a la frecuencia de corte de 180 días; no obstante, González *et al.* (2011) obtuvieron 22.8 Mg ha⁻¹ en pasto elefante cultivar verde (*Pennisetum purpureum*).

3.2 Caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto taiwán

3.2.1 Azúcares totales y reductores.

El mayor contenido de azúcares reductores se encontró en la frecuencia de corte de 120 días (52.2%; $p < 0.05$); sin embargo, el contenido de azúcares totales se incrementó a medida que aumentó la frecuencia de corte ($p < 0.05$; Cuadro 1). Mosier *et al.* (2005) reportan de 55 a 75% de azúcares totales en biomasa de materiales lignocelulosicos, 51% en pasto switchgrass (*Panicum virgatum*) y de 60% en paja de trigo, siendo los componentes principales celulosa y hemicelulosas. Por otro lado, Mateus *et al.* (2012) registraron 56.3% de azúcares totales en pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x pennisetum purpureum*) y Rengsirikul *et al.* (2013) reportaron en *Pennisetum purpureum*, 65.4% y 58%, para el cultivar taiwán y enano, respectivamente.

3.2.2 Lignina total, LSA, LIA y RIA.

El mayor contenido de lignina total (22.8%), lignina insoluble (21.5%) y residuo insoluble en ácido (26.0%), se encontró en la frecuencia de corte cada 120 días, los cuales fueron diferentes de las demás frecuencias de corte ($p < 0.05$); no obstante, en esta frecuencia se obtuvo el menor contenido de lignina soluble en ácido (1.28%; Cuadro 1). En trabajos previos, Mateus *et al.* (2012) reportaron en el cultivar maralfalfa (*Pennisetum* sp.) 16.1% y 16.0% de lignina total y LIA, respectivamente, los cuales son inferiores en 29% y 25% a lo encontrado en la frecuencia de corte a cada 120 días.

Scholl *et al.* (2015) obtuvieron 20.7% de lignina total en *Pennisetum purpureum*, similar a lo registrado en la frecuencia de corte de 180 días (20.1%). Estos autores también reportaron 19.6% de LIA, el cual es inferior en 9% a lo encontrado en la frecuencia de corte de 120 días,

que presento el máximo contenido. Así mismo, el mayor porcentaje de LSA se presentó al cosechar cada 150 días (1.5%) y fue estadísticamente diferente a las demás frecuencias de corte ($p < 0.05$). Scholl *et al.* (2015) observaron 1.12% de LSA, inferior en 25% a lo encontrado al día 150. El contenido de lignina en la planta aumentó a medida que se incrementó la frecuencia de corte, sin embargo, es variable entre especies de planta. Al respecto, Lima *et al.* (2014) reportaron 22.8% y 25.3% para lignina total, en pasto *Pennisetum* sp. y *Panicum máximum*.

3.2.3 Humedad.

El contenido de humedad no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) entre frecuencias de corte, con un promedio de 6.7% (Cuadro 1). Similares resultados fueron reportados por McKendry (2002) en paja de trigo (6%), sin embargo, el mismo autor reporta 11.5% para *Miscanthus* sp. Por otro lado, Demirbas (2004) registró 7.4% de humedad para paja de trigo.

3.2.4 Cenizas.

El contenido de cenizas fue similar ($p > 0.05$) entre frecuencias de corte (Cuadro 1). En trabajos previos, Cárdenas *et al.* (2012) reportaron 6.0% en pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.), mayor en 1.5% a lo encontrado en el presente experimento. Por otro lado, McKendry (2002) obtuvo 4.3% en paja de cereales, similar a lo obtenido en el presente trabajo. Aunque el contenido de cenizas fue similar ($p > 0.05$) entre frecuencias de corte, estas no son deseables en pruebas de bioenergía, ya que altos valores de cenizas pueden causar problemas en esquemas de combustión y pirólisis. En gramíneas las concentraciones de cenizas se relacionan con el estado fenológico, siendo mayor su concentración en edades tempranas; así mismo, las estaciones del año y la ubicación geográfica, pueden influir en el contenido de compuestos inorgánicos en la planta (Araya y Boschini, 2005).

3.2.5 Perfil de carbohidratos.

La celulosa es un homopolímero compuesto de glucosa, por lo que al hidrolizarla con ácido se obtiene este azúcar, mientras que a partir de las hemicelulosas se obtienen diferentes monosacáridos, como xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa y manosa, entre otros. El mayor contenido de glucosa se encontró en la frecuencia de corte de 120 días con 42.3% ($p < 0.05$). El

Cuadro 1. Rendimiento, caracterización lignocelulósica y perfil de carbohidratos del pasto taiwán a tres frecuencias de corte.

Composición química	Frecuencia de corte			
	120	150	180	Media
Rendimiento de biomasa (Mg ha ⁻¹ año ⁻¹)	18.81(±3.40) ^b	18.23(±2.42) ^b	33.06(±6.8) ^a	23.3
Azúcares Totales (% p/p)	57.79(±1.2) ^b	52.35(±2.40) ^c	59.98(±2.04) ^a	56.71
Azúcares Reductores (% p/p)	52.23(±1.09) ^a	47.42(±1.51) ^c	49.35(±1.40) ^b	49.67
Lignina Total (% p/p)	22.85(±0.001) ^a	17.86(±0.008) ^c	20.14(±0.003) ^b	20.28
LSA (% p/p)	1.28(±0.004) ^c	1.50(±0.30) ^a	1.37(±0.004) ^b	1.38
LIA (% p/p)	21.57(±0.002) ^a	16.36(±0.009) ^c	18.77(±0.027) ^b	18.90
RIA (% p/p)	26.06(±0.060) ^a	20.96(±0.007) ^c	23.41(±0.100) ^b	23.47
Humedad (% p/p)	6.39(±0.112) ^b	7.05(±0.104) ^b	6.66(±0.25) ^{ab}	6.70
Ceniza (% p/p)	4.48(±0.07) ^a	4.59(±0.05) ^a	4.64(±0.01) ^a	4.57
Glucosa (% p/p)	42.38(±0.011) ^a	36.26(±0.306) ^b	33.21(±0.005) ^c	37.28
Xilosa (% p/p)	3.92(±0.001) ^c	8.20(±0.100) ^b	11.34(±0.008) ^a	7.82

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma hilera, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

contenido de xilosa se incrementó a medida que avanzó la etapa fenológica de la planta, siendo la frecuencia de corte de 180 días (11.3%) diferente ($p < 0.05$) de las demás frecuencias de corte (Cuadro 1).

Scholl *et al.* (2015) en *Pennisetum purpureum* Schumach., y Mateus *et al.* (2012) en cultivar maralfalfa reportaron 36% y 33.7% de glucosa proveniente de la celulosa, respectivamente. Por otro lado, Ebringerová *et al.* (2005) y Wongwatanapaiboon *et al.* (2012) señalaron que la concentración de hemicelulosas en gramíneas se encuentra en un rango amplio (entre 25 y 50%). Al respecto, Mateus *et al.* (2012) reportaron 22.5% de hemicelulosas y en su perfil registraron 22.3%, 0.7% y 2.4% de xilosa, galactosa y arabinosa, respectivamente; sin embargo, la manosa no fue detectada.

3.3 Pretratamiento básico-oxidante

3.3.1 Azúcares totales y reductores.

El pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) rompe los enlaces lignina-carbohidrato, retira parte de la lignina y de las hemicelulosas, rompe las estructuras del material, incrementa el área interfacial y reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, favoreciendo su sacarificación enzimática (Tuor *et al.* 1995). En el Cuadro 2 se muestran los resultados, después de pretratar la biomasa del pasto taiwán con hidróxido de sodio (NaOH) y peróxido de hidrógeno. Se determinó el contenido de azúcares totales (AT), azúcares reductores (AR) y lignina soluble en ácido (LSA). La frecuencia de corte no mostró diferencias en el contenido de azúcares totales ($p > 0.05$), sin embargo, el contenido de azúcares reductores fue estadísticamente mayor en la frecuencia de corte de 120 días ($p < 0.05$). Los azúcares disueltos en la fase líquida indican el rompimiento de los enlaces entre lignina y celulosa, el bajo contenido de azúcares reductores en la muestra analizada permite inferir que prácticamente toda la celulosa se encuentra aún en el pasto; sin embargo es más factible hidrolizarla para obtener glucosa.

3.3.2 Lignina soluble en ácido.

El mayor contenido de lignina soluble en ácido se encontró en la frecuencia de corte cada 120 días (0.66%) y fue diferente ($p < 0.05$) a las demás frecuencias de corte (Cuadro 2). La finalidad

del pretratamiento es disminuir el contenido de lignina de la biomasa y hacer más accesibles los polisacáridos al coctel enzimático (E9). En la fase de caracterización lignocelulósica se encontró en promedio 1.38% de LSA, la cual después de pretratarse disminuyó en 0.57% de LSA, siendo de 0.66%; 0.45% y 0.59% para las frecuencias de corte de 120, 150 y 180 días, respectivamente. En esta fase del pretratamiento, el hidróxido de sodio y el peróxido de hidrógeno reaccionan, liberando como producto principal oxígeno, el cual ejerce presión sobre el polímero de la lignina rompiendo los enlaces que mantienen unido a la celulosa y lignina. En las tres frecuencias de corte se modificó la estructura lignocelulósica de la biomasa, con esto se espera que la celulosa sea más accesible a la enzima y se obtenga una mayor concentración de azúcares fermentables que la biomasa sin pretratar.

3.4 Hidrólisis enzimática

3.4.1 Azúcares totales y reductores.

La concentración de azúcares totales disminuyó a medida que se incrementó la frecuencia de corte (Cuadro 3). Sin embargo, el mayor contenido de azúcares reductores se presentó al cosechar cada 120 días con 48.2%, siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al corte de 150 días, pero similar al de 180 días (Cuadro 3). Cardona *et al.* (2013) reportó 56% de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis enzimática del pasto elefante pretratado con NaOH y utilizando la enzima Acecellerasa.

3.5 Fermentación

3.5.1 Azúcares reductores e índices de refracción.

El consumo de azúcares durante la fermentación se siguió mediante dos técnicas: índice de refracción y fenol-sulfúrico (ver materiales y métodos). Con el método fenol-sulfúrico, los azúcares totales disminuyeron de 300 a 70 g/L, luego de 70 horas de reacción. Usando índice de refracción, se detectó una disminución de azúcares de 300 a 49 g/L. Sin embargo, este método representa solo una estimación de la concentración de azúcares durante la fermentación, aunque es muy conveniente por su rapidez. En la Figura 1, se muestra el consumo de azúcares en la fermentación, determinado por el método fenol-sulfúrico. Se observa que en las primeras 20

horas de reacción y en las últimas 10 horas, los azúcares totales disminuyen rápidamente, y que de las 20 a las 60 horas de fermentación, los azúcares disminuyen de manera más lenta. Este consumo de azúcares indica que una gran cantidad de glucosa se transformó en etanol.

3.5.2 Contenido de biomasa.

Se determinó el contenido de biomasa en la fermentación como medida del crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la Figura 1, se observan las fases que experimenta la levadura durante la fermentación. La fase de adaptación (fase lag) ocurrió en el matraz donde incubó la levadura durante 17 horas (ver materiales y métodos), por ello se observa en la Figura 1, un crecimiento exponencial de la levadura entre las 0 y 20 horas, lo cual también indica que se está produciendo etanol, luego la levadura entra en una fase estacionaria de las 20 a las 60 horas, donde comienzan a agotarse los nutrientes en el medio y el etanol comienza a inhibir su crecimiento; por último, la levadura deja de crecer y reproducirse, iniciando la fase de decaimiento alrededor de las 65 horas de reacción y en consecuencia deja de producir etanol.

3.5.3 Etanol.

La concentración de etanol en la fermentación se determinó mediante cromatografía de gases. En la Figura 1, se muestra la producción de etanol a lo largo de las 70 horas de reacción. Se obtuvo una concentración máxima de 39 g/L. Un rendimiento inferior al de este estudio fue reportado por Cardona *et al.* (2013) con un máximo de 27.7 g/L de etanol en pasto elefante pretratado con hidróxido de sodio (NaOH). Se ha reportado en literatura que la cantidad de etanol obtenida en la fermentación se debe en gran medida a un pretratamiento efectivo y una alta eficiencia de hidrólisis de celulosa a azúcares fermentables. En porcentaje de volumen se obtuvo un 4.9% v/v de etanol en la fermentación, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se inhibe a porcentajes mayores de etanol (alrededor de 9% v/v) en el medio, por lo que es posible obtener más etanol en esta etapa. Teóricamente solo puede obtenerse 0.51 g etanol/g de azúcar consumido, con la fermentación se consiguió un rendimiento de 0.26 g etanol/g azúcar consumido, lo cual corresponde a una eficiencia del 51% en esta etapa. A pesar del bajo rendimiento de la fermentación, este valor es mayor a lo obtenido por otros autores (Hashem y Darwish, 2010; Bothast y Schlicher, 2005).

Cuadro 2. Pretratamiento básico - oxidante en la composición de azúcares totales, reductores y lignina soluble en ácido del pasto taiwán a tres frecuencias de corte.

Composición química	Frecuencia de corte			
	120	150	180	Media
Azúcares Totales (% p/p)	6.35(±0.17) ^a	6.37(±0.03) ^a	6.04(±0.14) ^a	6.25
Azúcares Reductores (% p/p)	1.42(±0.07) ^a	0.80(±0.01) ^b	0.75(±0.01) ^b	0.99
Lignina Soluble en Acido (% p/p)	0.66(±0.002) ^a	0.45(±0.001) ^b	0.59(±0.01) ^c	0.57

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma hilera, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Efecto de la hidrólisis enzimática en el contenido de azúcares totales y reductores del pasto taiwán a tres frecuencias de corte.

Composición química	Frecuencia de corte			
	120	150	180	Media
Azúcares Totales (% p/p)	54.67(±0.70) ^a	52.63(±0.60) ^b	47.88(±0.24) ^c	51.75
Eficiencia (%)	95	100	80	92
Azúcares Reductores (% p/p)	48.20(±0.19) ^a	46.16(±0.58) ^b	46.92(±0.78) ^{ab}	47.09
Eficiencia (%)	92	97	95	95

^{a,b} Diferente literal minúscula, en la misma hilera, indican diferencias significativas entre frecuencias de corte ($p < 0.05$).

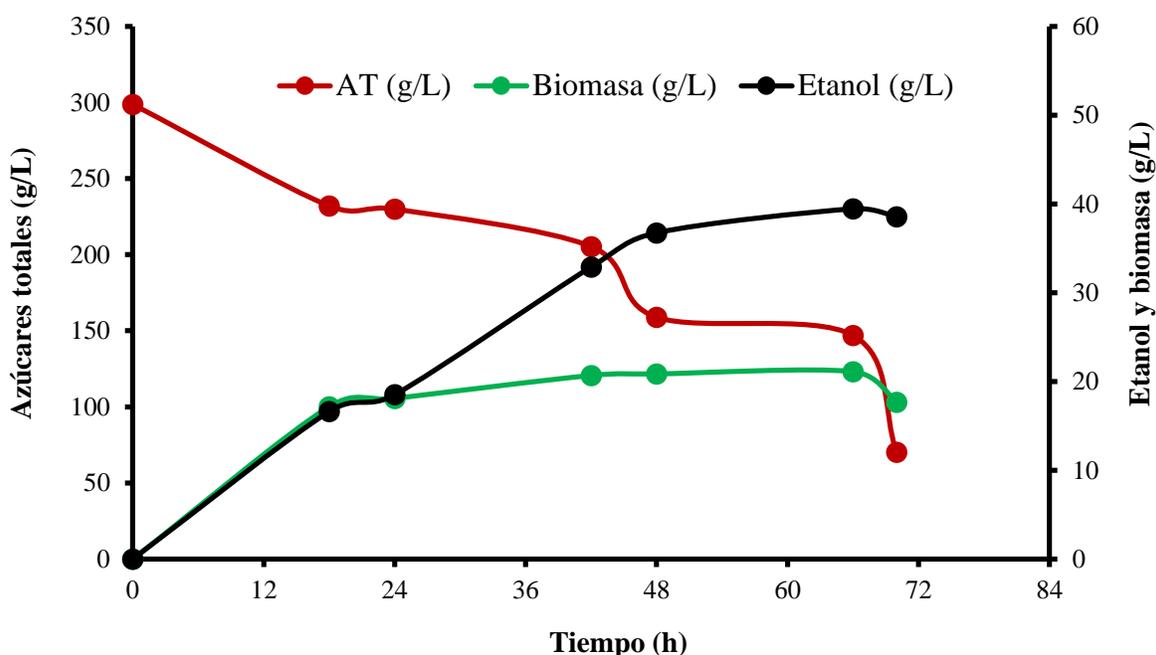


Figura 1. Comportamiento de los azúcares reductores del pasto taiwán fermentados con levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol de segunda generación.

3.6 Destilación y rendimiento de bioetanol

3.6.1 Concentración de etanol.

El jarabe obtenido de la fermentación se destiló para purificar el etanol disuelto en el medio. Luego de destilar todo el jarabe, se obtuvo una concentración de 581.3 g/L de etanol. Con la destilación no solo se logró concentrar el alcohol, sino que también se separó de los azúcares y el medio obtenido luego de la fermentación.

3.6.2 Pureza.

Se purificó por destilación el etanol proveniente de la fermentación hasta un 74% v/v. El etanol forma una mezcla azeotrópica con agua a presión atmosférica, por lo que solo es posible purificarlo hasta un 96% v/v mediante destilación atmosférica. Tomando en cuenta lo anterior, se logró una eficiencia de destilación del 77%. El rendimiento de la frecuencia de corte cada 120 días fue de 18.81 (± 3.4) Mg ha⁻¹ año⁻¹; de la etapa de destilación se obtuvieron 0.0449 L de etanol a partir de 0.050 kg de pasto taiwán. En la fermentación se adicionó glucosa al medio para llegar a una concentración de 300 g/L, asumiendo que si se reemplaza esta cantidad de glucosa

con azúcares de la hidrólisis enzimática se requiere de 0.573 kg de pasto taiwán para obtener los 0.0449 L de etanol. Entonces, 18.81 (± 3.4) Mg ha⁻¹ año⁻¹ de pasto producen 1475 L ha⁻¹ año⁻¹ de bioetanol.

4. CONCLUSIONES

La biomasa que proporciona el mayor contenido de azúcares reductores y glucosa para la producción de bioetanol, se obtuvo al cosechar el pasto taiwán a cada 120 días. El pretratamiento básico - oxidante mejoró en 0.6% el contenido de LSA en la frecuencia de corte de 120 días. La fuente de carbono disminuyó a medida que el tiempo se incrementó, dejando de producir bioetanol a las 72 horas. El rendimiento de biomasa y composición química del pasto taiwán lo convierten en una alternativa potencial para la obtención de bioetanol en áreas tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial CONACyT - SENER Sustentabilidad Energética a través del Proyecto No. 151370 por el apoyo en los análisis químicos y al laboratorio para materiales lignocelulósicos del INIFAP en Puebla, Méx. Al Instituto Mexicano del Petróleo por las facilidades otorgadas para la realización de los análisis químicos y producción de bioetanol en el laboratorio de transformación de bioamasa.

5. LITERATURA CITADA

- Araya, M. M. y C. F. Boschini. 2005. Producción de forraje y calidad nutricional de variedades de *Pennisetum purpureum* en la meseta central de Costa Rica. *Agronomía mesoamericana* 16(1): 37-43.
- Bothast, R. J. y A. M. Schlicher. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*. 67(1): 19-25.
- Cárdenas, M. J. V., Sandoval, C. C. y J. F. S. Solorio. 2003. Composición química de ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas de Yucatán, México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 41(3): 283-294.
- Chemisquy, A. M., Giussani M. L., Scataglini, A.M., Kellogg, A. E. y O. Morrone. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany* 106: 107–130.
- Calzada, M. J. M., Enríquez, Q. J. F., Hernández, G. A., Ortega, J. E., Mendoza, P. S. I. 2014. Análisis de crecimiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) en clima cálido subhúmedo. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 5(2): 247-260.
- Cárdenas, R. L. R., Pinto, R. R., Medina, F. J., Guevara, F., Gómez, H., Hernández, A. y J. Carmona. 2012. Producción y calidad del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) durante la época seca. *Quehacer Científico en Chiapas*. 1(13): 38-46.
- Cardona, M. E., Ríos, A. J., Peña, D. J. y A. Ríos. 2013. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum* sp) y king grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de bioetanol. *Información Tecnológica*. Vol. 24(5), 69-80.
- Chen, F., Srinivasa, R. M. S., Temple, S., Jackson, L., Shadle, G., A. R. Dixon. 2006. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Plant.* 48:113-124.
- del Río, C. J., Prinsen, P., Rencoret, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Ralph, J., Martínez, T. A. y A. Gutiérrez. 2012. Structural characterization of the lignin in the cortex and pith of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) Stems. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3619-3634.

- Demirbas, A. 2004. Combustion characteristics of different biomass fuels. Prog. Energy. Combust. Sci. 30: 219-230.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A., F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Biochem. 28: 350-356.
- Ebringerová, A., Hromadkova, Z., y T. Heinze. 2005. Hemicellulose. Adv. Polym. Sci. 186: 1-67.
- Elshahed, M. 2010. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. J. of Adv. Research. 1:103–111.
- Enríquez, Q. J. F. y J. M. Romero. 1999. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria* sp. en Isla, Veracruz. Agrociencia. 33(2):141-148.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM; México. 217p.
- González, I., Betancourt, M., Fuenmayor, A. y M. Lugo. 2011. Producción y composición química de forrajes de dos especies de pasto elefante (*Pennisetum* sp.) en el Noroccidente de Venezuela. Zootecnia Trop. 29(1): 103-112
- Gulati, M., Kohlmann, K., Ladisch, M. R., Hespell, R. y R. J. Bothast. 1996. Assessment of ethanol production options for corn products. Bioresour. Technol. 58 (3), 253- 264.
- Hashem, M. y M. S. Darwish. 2010. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. Biomass and bioenergy, 34(7): 953-959.
- Keshwani, D. y J. Cheng. 2009. Switchgrass for Bioethanol and Other Value-added Applications: A Review. Bioresource Technology 100: 1515-1523.
- Ladisch, M. R., Mosier, N. S., Kim, Y., Ximenes, E. y D. Hogsett. 2010. Converting cellulose to biofuels. Chemistry Engineering Progress. 106 (3): 56-63.
- Lima, M. A., Gomez, D. L., Steele-King, G. C., Simister, R., Bernardinelli, D., Carvalho, M. A., Rezende, A. C., Labate, C. A., R deAzevedo, E., McQueen-Mason, S. J. y I. Polikarpov. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. Biotechnol. Biofuels. 7:1-19.

- Mateus, L., Hernández, O., Velázquez, M. y J. De J. Díaz. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of goliath grass (*Pennisetumglaucum x pennisetumpurpureum*) for ethanol cellulosic. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV: 146-156.
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresour Technol. 83: 37- 46.
- Mohammed, Y. I., Abakr, A. Y., Kazi, K. F., Yusup, S., Alshareef, I. y A. S. Chin. 2015. Comprehensive characterization of napier grass as a feedstock for thermochemical conversion. Energies. 8: 3403-3417.
- Mosier, N. S., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., R. M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 96: 673–686.
- Nava, C. J. J., Gutierrez, O. E., Zavala, G. F., Olivares, S. E., Treviño, J.E., Bernal, B.H. y S. R. G. Herrera. 2013. Establecimiento del pasto ‘CT-115’ (*Pennisetum purpureum*) en una zona semiárida del noreste de México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 (3): 239 – 244.
- Nielsen, S. 2007. Análisis de los alimentos: manual de laboratorio (2da ed.). España. Ed. Zaragoza: Acribia.
- Perlack, R. D. y A. F. Turhollow. 2003. Feedstock cost analysis of corn stover residues for further processing. Energy 28 (14): 1395-1403.
- Ramos, T. O.S., Victoria, G. C.A., J. J. G. Sandoval. 2015. Temporada, fertilización y rendimiento de variedades de *Pennisetum purpureum*. Agrociencia 49: 837-844.
- Rengsirikul, K., Ishii, Y., Kangvansaichol, K., Prapa, S., Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., Nakamane, G. y T. Sayan. 2013. Biomass yield, chemical composition and potential ethanol yields of 8 cultivars of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) harvested 3-monthly in central Thailand. J. of Sustainable Bioenergy Systems. 3:107-112.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User’s Guide. Release 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Scholl, A., Menegol, D., *et al.* 2015. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. Industrial Crops and Products. 70, 280–291.

- Sung, Y. y J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1–11.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., D. Crocker. 2011. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618.
- Tuor, U., Winterhalter, K. y A. Fiechter. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 411, 1-17.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V., Inochanon, R., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T. y W. Chulalaksananukul. 2012. The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. *J. Biomed Biotechnol* 2012: 1-10.
- Xu, J., Chen, Y., Chen, J.J., Sharma-Shivappa, R. R. y J. Burns. 2011. Delignification of switch grass cultivars for bioethanol production. *BioResources*. 6(1): 707-720.