

## Efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre la hidrólisis enzimática del *Panicum maximum*

### Effect of dilute sulfuric acid pretreatment on the enzymatic hydrolysis of *Panicum maximum*

### Efeito do pré-tratamento do solução de ácido sulfúrico sobre a hidrólise enzimática de *Panicum maximum*

CARLOS RAFAEL CASTILLO-SALDARRIAGA<sup>1</sup>, MARIO ENRIQUE VELÁSQUEZ-LOZANO<sup>2</sup>

#### RESUMEN

*Panicum maximum* es un pasto perenne con gran potencial para emplearse como materia prima en la producción de etanol debido a su resistencia a sequías y radiación solar, junto con una gran productividad de biomasa. De las operaciones unitarias empleadas en la producción de etanol, el pretratamiento es una de las etapas más demandantes energéticamente, superado únicamente por la destilación. Por lo tanto, se debe ajustar los parámetros de proceso para lograr la intensificación de esa operación. En este estudio, se evaluó el efecto de dos parámetros fundamentales del

Recibido para evaluación: 26 de Febrero de 2017.

Aprobado para publicación: 9 de Marzo de 2018.

- 1 Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos. Ingeniero Químico, M.Sc. en Ingeniería Química. Bogotá, Colombia.
- 2 Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos. Ingeniero Químico, Ph.D. en Ingeniería Química. Bogotá, Colombia.

Correspondencia: [crcastillos@unal.edu.co](mailto:crcastillos@unal.edu.co); [crcastillo@corpoica.org.co](mailto:crcastillo@corpoica.org.co)

pretratamiento con ácido sulfúrico diluido empleando *P. maximum*: concentración de ácido y sólidos. La biomasa fue pretratada a 130°C durante 60 minutos con diferentes concentraciones de ácido (0,5; 1; 1,5% p/v) y sólidos (5; 8,5; 12% p/p), caracterizando la fracción sólida del pretratamiento. Posteriormente, se evaluó la digestibilidad de la biomasa pretratada mediante una hidrólisis enzimática. La condición seleccionada para el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido fue 1,5% p/v con una concentración de sólidos de 12% p/p recuperando el 58,26 ± 0,62% de los sólidos y obteniéndose una concentración de azúcares reductores de 16,76 g/L luego de una hidrólisis enzimática de 48 horas.

## ABSTRACT

*Panicum maximum* is a perennial grass with a high potential to be used in ethanol production due to drought and solar radiation resistant combined with a high biomass productivity. Within the unit operations used for the ethanol production, the pretreatment is the most energy demand operation, surpassed only by distillation. Therefore, operation parameters should be determined to achieve the intensification of it. In this study, the effects of two dilute sulfuric acid pretreatment parameters were evaluated using *P. maximum*: acid and solid concentration. Biomass was pretreated at 130°C and 60 min with different sulfuric acid concentrations (0,5; 1 and 1,5% w/v) and solid loading (5; 8,5 and 12% w/w). Later, pretreated biomass digestibility was evaluated through enzymatic hydrolysis. The selected pretreatment condition was 1,5% w/v acid concentration and 12% w/w solid concentration recovering 58,26 ± 0,62%. After 48-h enzymatic hydrolysis a reducing sugars concentration of 16,76 g/L was obtained.

## RESUMO

*Panicum maximum* é uma gramínea perene com alto potencial para ser utilizada na produção de etanol devido à seca e resistência à radiação solar combinada com alta produtividade de biomassa. Das operações unitárias utilizadas na produção de etanol, o pré-tratamento de biomassa é uma das operações de maior demanda de energia na produção de etanol, superada apenas pela destilação. Portanto, os parâmetros de operação devem ser determinados para atingir a intensificação do mesmo. Neste estudo, os efeitos de dois parâmetros de pré-tratamento do ácido sulfúrico diluído foram avaliados com o uso de *Panicum maximum*: concentração de ácidos e sólidos. A biomassa foi pré-tratada a 130°C e 60 min com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (0,5; 1 e 1,5% p/v) e carga sólida (5; 8,5 e 12% p/p). Posteriormente, a digestibilidade da biomassa pré-tratada foi avaliada por hidrólise enzimática. A condição de pré-tratamento selecionada foi uma concentração de ácido de 1,5% p/v e uma concentração de 12% p/p de sólido que recuperou 58,26 ± 0,62%. Após 48 h de hidrólise enzimática foi obtida uma concentração de açúcares reductores de 16,76 g/L.

## PALABRAS CLAVES:

Alta concentración de sólidos,  
Azúcares reductores,  
Biomasa lignocelulósica,  
Digestibilidad,  
Recuperación de sólidos.

## KEYWORDS:

High solids loading,  
Reducing sugars,  
Lignocellulosic biomass,  
Digestibility,  
Solids recovery.

## PALAVRAS-CHAVE:

Alto teor de sólidos,  
Açúcares reductores,  
Biomassa lignocelulósica,  
Digestibilidade,  
recuperação dos sólidos.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, el uso excesivo de combustibles fósiles en diferentes sectores económicos ha creado un impacto negativo en el planeta. Un ejemplo claro es la acumulación de gases como dióxido de carbono y óxidos nitrosos incrementando el efecto invernadero. El sector del transporte es uno de los grandes contribuyentes a este problema y se ha propuesto un cambio de combustible como una solución: de fósiles a verdes. Estos combustibles verdes se pueden obtener a partir de procesos de transformación biológica como se hace con el etanol [1] o el biogás [2] y transformación química como el biodiesel [3].

Tradicionalmente, el etanol se ha producido empleando jugo de caña de azúcar [4] y maíz [5]. Lastimosamente, la demanda de este combustible viene en aumento debido a la gran volatilidad del precio del petróleo, incrementando el consumo de las materias primas antes mencionadas, generando un riesgo sobre la seguridad alimentaria mundial. Por lo anterior, se han propuesto diferentes residuos agroindustriales como reemplazo de las materias primas convencionales. Entre los residuos explorados se pueden encontrar: bagazo de caña [6], rastrojo de maíz [7], paja de colza [8], granos de destilación [9], paja del arroz [10], residuo de *Chrysanthemum* [11], paja de cebada [12], entre otros. La desventaja de emplear residuos agroindustriales radica en el hecho que estos ya son utilizados como materias primas para nuevas cadenas de producción, en sistemas de cogeneración y compostaje para producción de biogás o fertilización orgánica. Una segunda alternativa para obtener los azúcares reductores necesarios para la producción de etanol se basa en el empleo de cultivos energéticos como los pastos perennes. Diferentes pastos han sido explorados dependiendo de la ubicación geográfica, la condición agronómica, económica y meteorológica de cada país o región. En Estados Unidos, la mayoría de investigaciones se han centrado en estudiar el *Panicum virgatum* (switchgrass) [13], y en Europa, un híbrido de *Miscanthus* conocido como *Miscanthus x giganteus* [14]. En Suramérica, Brasil seleccionó luego de un proyecto de 10 años, a la especie *Pennisetum purpureum* (pasto elefante) como un pasto perenne potencial para la producción de etanol de segunda generación, sin descartar otras especies de pastos como *Andropogon*, *Brachiaria* and

*Paspalum atratum* [15]. Por otro lado, en Colombia, solo se han realizado estudios empleando dos especies de *Pennisetum*: *P. purpureum* y pasto maralfalfa [16], siendo necesario evaluar otras especies para seleccionar la más promisoría. En este estudio, *Panicum maximum* (pasto guinea) fue el pasto perenne seleccionado debido a su resistencia a períodos de sequía y alta radiación solar, un sistema radicular de enorme cobertura, adaptabilidad a diferentes alturas, desde 0 hasta 1800 m.s.n.m., y alta producción de biomasa seca, entre 60-100 ton/ha/año [17].

La producción de etanol de segunda generación se basa en tres operaciones fundamentales: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. A pesar de que muchos trabajos se han dedicado al estudio de este proceso de producción, aún existen dificultades y restricciones económicas para su implementación a gran escala, como los altos costos asociados al procesamiento de la biomasa lignocelulósica en el pretratamiento y la hidrólisis enzimática [18]. Por esto, se han concentrado esfuerzos para hacer un uso eficiente de la materia prima y lograr la intensificación de las diferentes etapas del proceso. Esta intensificación consiste en reducir la demanda energética de cada operación aprovechando la biomasa empleada, los efluentes y residuos [19]. Uno de los recursos para reducir los costos operacionales y favorecer la intensificación consiste en emplear una alta concentración de sólidos durante el pretratamiento. El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido es uno de los que posee más ventajas al aumentar las velocidades de reacción, bajo costo y consumo de ácido, y no requerir sistemas de recuperación de ácido en grandes escalas de producción [20]. Adicionalmente al emplear este pretratamiento con alta concentración de sólidos es posible remover la xilosa constitutiva de la hemicelulosa presente en una mayor cantidad de biomasa lignocelulósica por lote incrementando la digestibilidad de la misma, facilitando así la degradación de celulosa a glucosa por parte de las enzimas presentes durante la hidrólisis enzimática.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la concentración de ácido y concentración de sólidos sobre la biomasa lignocelulósica de *Panicum maximum*, en términos de recuperación de sólidos y digestibilidad empleando un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido.

## MÉTODO

### Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica empleada fue pasto Guinea identificado por el nombre científico de *Panicum maximum*. En el cuadro 1, se encuentra la información referente al ecotipo y cosecha del material. La biomasa lignocelulósica se procesó en una picadora, logrando reducir el tamaño de los tallos a  $5 \pm 0,76$  cm. El material se colocó en una estufa de secado a  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas para disminuir la humedad y evitar su deterioro. Posteriormente, se empleó un molino de cuchillas para alcanzar el tamaño final promedio del material (2 mm). El material seco y molido se almacenó a temperatura ambiente en recipientes tapa rosca herméticos completamente llenos.

Luego de la adecuación del material, se determinó el tamaño de partícula promedio de la biomasa empleando un análisis por tamizado [21]. Se utilizaron tamices estándar Tyler de malla No. 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 170 y 230. La prueba de tamizado se realizó por triplicado. El tamaño de partícula promedio (diámetro medio) se calculó mediante la ecuación 1, donde  $\overline{Dw}$  es el diámetro medio de masa,  $x_i$  es la fracción másica y  $\overline{D}_{pi}$  es el diámetro de partícula en el incremento determinado con base al diámetro promedio de las dos mallas consecutivas, por ejemplo, 30/40, 40/50, 50/60, etc. El diámetro de cada tamiz se obtuvo al observar la información consignada en cada uno de ellos.

$$\overline{Dw} = \sum_{i=1}^n x_i \overline{D}_{pi} \quad (\text{Ec. 1})$$

### Caracterización fisicoquímica del *Panicum maximum*

La caracterización fisicoquímica de la biomasa se realizó empleando las técnicas del *National Renewable Energy Laboratory* – NREL, analizando humedad, contenido de glucosa, xilosa, lignina ácida soluble e insoluble y ceniza [22].

### Pretratamiento con ácido diluido

Luego de la adecuación física de la biomasa lignocelulósica, se determinó el desempeño del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido evaluando la con-

**Cuadro 1.** Información del ecotipo y cosecha de *Panicum maximum*.

<i>Panicum maximum</i> (Biomasa lignocelulósica)	
Latitud de origen	4oN
Ecotipo	CIAT 36000
Morfología	Tallos delgados
Localización del cultivo	Km 17, vía Villavicencio – Puerto López, Meta, Colombia
Elevación	340 m.s.n.m.
Fecha de Siembra	Octubre, 2011
Fecha de Cosecha	Marzo, 2012

**Cuadro 2.** Diseño experimental para el pretratamiento con ácido diluido de *P. maximum*.

Experimento	Bloque	CA <sup>a</sup> (%p/v)	CS <sup>b</sup> (%p/p)
1	1	-1 (0,5)	-1 (5)
2	1	+1 (1,5)	+1 (12)
3	1	0 (1,0)	-1 (5)
4	1	0 (1,0)	+1 (12)
5	1	0 (1,0)	0 (8,5)
6	1	0 (1,0)	0 (8,5)
7	1	-1 (0,5)	0 (8,5)
8	1	-1 (0,5)	+1 (12)
9	1	+1 (1,5)	-1 (5)
10	1	+1 (1,5)	0 (8,5)
11	2	-1 (0,5)	-1 (5)
12	2	+1 (1,5)	+1 (12)
13	2	0 (1,0)	-1 (5)
14	2	0 (1,0)	+1 (12)
15	2	0 (1,0)	0 (8,5)
16	2	0 (1,0)	0 (8,5)
17	2	-1 (0,5)	0 (8,5)
18	2	-1 (0,5)	+1 (12)
19	2	+1 (1,5)	-1 (5)
20	2	+1 (1,5)	0 (8,5)

<sup>a</sup>CA, concentración de ácido; <sup>b</sup>CS, concentración de sólidos.

centración de ácido y la concentración de sólidos con una posterior prueba de digestibilidad de la biomasa pretratada mediante una hidrólisis enzimática.

El ácido empleado en el pretratamiento fue ácido sulfúrico 95%. Para la evaluación del pretratamiento se emplearon tres concentraciones de ácido sulfúrico diluido (0,5; 1; 1,5% p/v) [23, 24, 25] y tres concentraciones de sólidos (5; 8,5; 12% p/p) [26]. La biomasa lignocelulósica y el ácido diluido se colocaron por gravimetría en función a una base de cálculo de 100 g (ácido sulfúrico diluido + biomasa seca) en

recipientes de 250 mL tipo tapa rosca Boeco®. El pretratamiento se llevó a cabo en una autoclave automática, la temperatura fue de 130°C con un tiempo de residencia de 60 minutos [24]. El tiempo se contabilizó al alcanzarse la temperatura de pretratamiento. El diseño experimental fue central compuesto de cara centrada con puntos estrella, formado por 2 bloques y 2 réplicas para los puntos centrales por bloque soportado en el método de superficie de respuesta. En total se obtuvieron 20 experimentos incluyendo 4 repeticiones del punto central (cuadro 2). Cada bloque representó la repetición en el tiempo de cada experimento. El software Design-Expert® versión 7, fue utilizado para la generación y análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental. A su vez, se generó un modelo cuadrático para la variable de respuesta (ecuación 2), recuperación de sólidos (%).

$$E\{Y\} = \beta_0 + \beta_1 \times X_1 + \beta_2 \times X_2 + \beta_{12} \times X_1 \times X_2 + \beta_{11} \times X_1^2 + \beta_{22} \times X_2^2$$

(Ec. 2)

Donde,  $E\{Y\}$  es el valor esperado de la variable de respuesta,  $\beta_0$  es el intercepto del modelo,  $X_1$  es la concentración de ácido,  $X_2$  es la concentración de sólidos,  $\beta_1$  es el coeficiente para la concentración de ácido,  $\beta_2$  es el coeficiente para la concentración de sólidos,  $\beta_{12}$  es el coeficiente para la interacción entre la concentración de ácido y sólidos,  $\beta_{11}$  es el coeficiente para los efectos de segundo orden de la concentración de ácido y  $\beta_{22}$  es el coeficiente para los efectos de segundo orden de la concentración de sólidos.

Luego del pretratamiento, se realizó una filtración al vacío empleando filtros de membrana previamente secados y pesados. Mediante este proceso se obtuvieron: una fracción líquida y una sólida. La fracción sólida fue llamada biomasa pretratada, se lavó en su totalidad con agua destilada y se secó en una estufa a 45°C hasta peso constante, determinando la recuperación de sólidos pretratados mediante la ecuación 3. Donde  $m_1$  es la masa inicial de biomasa seca sin pretratar (g) y  $m_2$  es la masa final de biomasa seca pretratada (g). La fracción líquida se recolectó y congeló a una temperatura de  $-8 \pm 0,5^\circ\text{C}$  para un posterior análisis de glucosa y xilosa por HPLC con el fin de realizar el balance de materia del pretratamiento.

$$\text{Recuperación de sólidos (\%)} = \frac{m_2 \times 100}{m_1}$$

(Ec. 3)

Adicionalmente, para el análisis del pretratamiento se calcularon parámetros de proceso como: en la fracción sólida,  $X_G$ , fracción másica de la glucosa en la biomasa pretratada,  $X_X$ , fracción másica de la xilosa en la biomasa pretratada, y en la fracción líquida, CG, concentración de glucosa en el sobrenadante,  $P_{GP}$ , porcentaje de glucosa liberada, CX, concentración de xilosa,  $P_{XP}$ , porcentaje de xilosa liberada. Las ecuaciones empleadas son las reportadas por Castillo-Saldarriaga (2015).

### Digestibilidad de la biomasa pretratada

Con el objetivo de evaluar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa presente en la biomasa pretratada se realizó una prueba de digestibilidad. Para el desarrollo de la prueba, se empleó biomasa pretratada resultante de cada una de las condiciones evaluadas anteriormente. Cada biomasa pretratada fue sometida a una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos de 5% p/p empleando una solución tampón de citrato de sodio 50 mM y pH 4,8. Las enzimas utilizadas en la prueba fueron: un complejo de celulasas (NS22086; Lot # VCPI0006) y  $\beta$ -glucosidasas (NS22118; Lot # DCN00218) donadas por la empresa Novozymes A/S. Las enzimas presentaron una actividad de 1000 unidades de hidrólisis de biomasa (BHU)/g de mezcla y 250 unidades de celobioasa (CBU)/g de mezcla, respectivamente. Estas actividades enzimáticas se verificaron empleando el protocolo descrito por Sharma *et al.* (2016), presentando una variación menor al 5% respecto a lo reportado en las fichas técnicas.

Para la prueba de digestibilidad, se dosificó una actividad de 25 BHU/g de biomasa pretratada de celulasas y 0,27 CBU/g de biomasa pretratada de  $\beta$ -glucosidasas, límites superiores de dosificación de cada enzima según el fabricante. Como medio de soporte y temperatura para la hidrólisis enzimática se utilizó una solución tampón de citrato de sodio a 50 mM, pH 4,8 y 50°C, condiciones que garantizan la mejor actividad enzimática según la ficha técnica. La hidrólisis se llevó a cabo en recipientes de 50 mL tapa rosca Boeco®, con agitación magnética durante 48 horas. La concentración inicial de sólidos de la hidrólisis enzimática se ajustó dosificando solución tampón y biomasa pretratada por gravimetría respecto a una base total de 40 g (solución tampón +

biomasa pretratada) y manteniéndose constante durante todo el proceso. Durante la hidrólisis se tomaron muestras de 250 µL de hidrolizado cada 12 horas para realizar controles de contaminación microbiana. Al finalizar la hidrólisis se evaluó la concentración de azúcares reductores (g/L) empleando un análisis estadístico similar al de la sección anterior.

## RESULTADOS

### Caracterización de la biomasa de *Panicum maximum*

La biomasa se secó en una estufa de secado a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  por 5 horas. La humedad promedio de la biomasa fresca (pasto recién cosechado) fue de  $76,73 \pm 2,77\%$ , lo que correspondió a una concentración de sólidos promedio de  $23,27 \pm 2,77\%$ . Posteriormente, se realizó un análisis granulométrico del *P. maximum* seco y molido que se puede observar en la figura 1, donde se relaciona la fracción másica retenida y acumulada, respecto al diámetro de partícula medio.

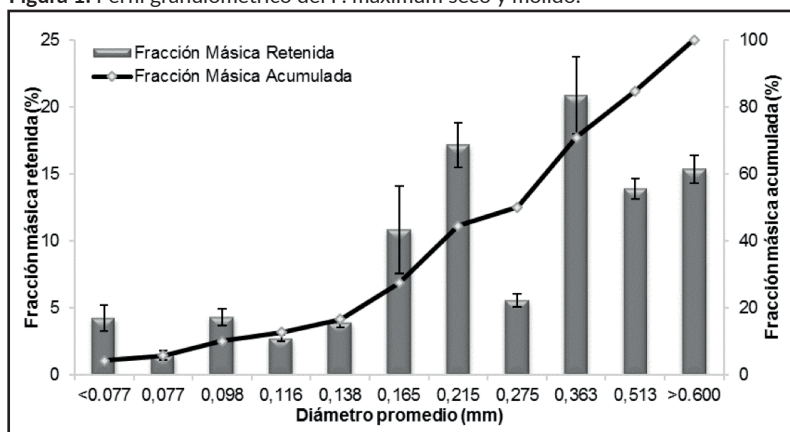
Se observó que la biomasa empleada en los experimentos (72%), tenía

un diámetro medio entre 0,1375 (100/120) y 0,5125 mm (30/40), con un diámetro de partícula promedio del pasto tamizado fue de 0,27 mm. Adicionalmente, la apariencia del *P. maximum* luego del proceso de molienda presentaba una gran heterogeneidad. Ray *et al.* (2013), evaluaron el efecto de dos tamaños de partícula promedio (6,35 y 2 mm) de biomasa de rastrojo de maíz sobre el rendimiento de celulosa y hemicelulosa de un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido empleando dos concentraciones de sólidos, 3,3% p/p y 25% p/p. Adicionalmente, se identificó el posible efecto que podrían tener estos tamaños de partícula en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con 20% p/p, encontrando que no existían diferencias significativas en ninguna de las variables de respuesta evaluadas al emplear diferentes tamaños de partícula [29]. Sin embargo, los tamaños de partícula promedio evaluados en el estudio anterior son relativamente grandes en comparación a otros reportes. Rabelo (2010), empleó biomasa de bagazo de caña con un tamaño de partícula promedio de 1,689 mm para estudiar el pretratamiento de hidróxido de calcio, peróxido de

hidrógeno e hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos. Rojas (2011), estudió la posibilidad de producir azúcares fermentables empleando fibra prensada de palma con un tamaño de partícula promedio de 1 mm. Quevedo (2011), evaluó la degradación de residuos de crisantemo con un tamaño de partícula promedio de 0,38 mm para la producción de azúcares. De lo anterior se puede concluir que aún no existe un tamaño de partícula específico para evaluar las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática sobre biomasa lignocelulósica. Adicionalmente, teniendo en cuenta que, al implementar el proceso de adecuación de biomasa a gran escala, no emplear una clasificación por tamaño de la biomasa podría disminuir costos de producción. Por lo anterior, se decidió emplear la biomasa heterogénea proveniente del proceso de molienda sin realizar una exclusión por tamaño.

Para determinar el contenido de celulosa y hemicelulosa a partir de glucosa y xilosa, respectivamente, se emplearon las ecuaciones determinadas por Mateus (2011). La composición de la biomasa de *P. maximum* fue (% p/p en base seca):  $31,6 \pm 3,2$  para glucosa;  $21,9 \pm 0,1$  para xilosa;  $24,9 \pm 1,3$  para lignina ácida insoluble;  $0,5 \pm 0,1$  para lignina ácida soluble;  $8 \pm 0,4$  para ceniza;  $13,1 \pm 0,6$  para otros componentes. La relación de glucosa respecto a xilosa fue de  $31,6/21,9$  (1,44). El contenido de celulosa fue de  $28,4 \pm 2,9\%$  p/p para la biomasa de *P. maximum*. Para las condiciones del método analítico empleado, se presentó un superposición de picos cromatográficos y poca resolución de arabinosa, galactosa y manosa por lo cual solo se cuantificó el con-

Figura 1. Perfil granulométrico del *P. maximum* seco y molido.

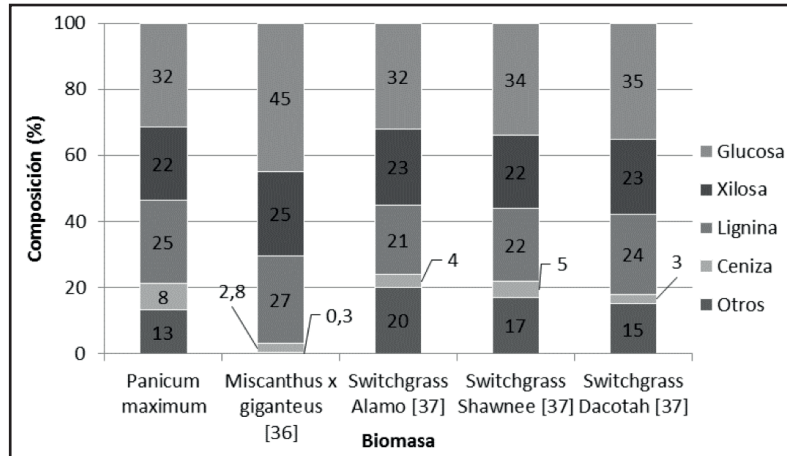


tenido de xilosa, siendo la única variable empleada para determinar la concentración de hemicelulosa cuyo valor fue de  $19,3 \pm$

0,09% p/p. La relación de celulosa respecto a hemicelulosa fue de 28,4/19,3 (1,47). La composición de *P. maximum* se comparó con dos

variedades de gramíneas: *switchgrass* (*Panicum virgatum*) tipo Alamo, tipo Shawnee y tipo Dacotah, y *Miscanthus x giganteus* (figura 2).

Figura 2. Composición de diferentes tipos de pastos reportados en la literatura.



Cuadro 3. Resultados de los ensayos de pretratamiento de *Panicum maximum*.

Exp.	Fracción sólida				Fracción líquida			
	RS (%)	AR (g/L)	X <sub>G</sub>	X <sub>X</sub>	CG (g/L)	P <sub>GP</sub> (%)	CX (g/L)	P <sub>XP</sub> (%)
1	59,06	16,07	0,52	0,22	0,37	2,22	4,71	40,89
2	57,82	16,76	0,52	0,14	2,19	5,08	19,13	64,07
3	55,75	16,84	0,53	0,07	1,05	6,31	9,49	82,38
4	62,25	14,17	0,49	0,18	1,16	2,69	14,41	48,26
5	59,71	14,67	0,50	0,12	1,35	4,60	13,90	68,34
6	58,91	14,40	0,51	0,11	1,28	4,36	14,59	71,73
7	73,77	12,75	0,42	0,26	0,45	1,53	2,70	13,27
8	73,62	10,43	0,42	0,28	0,60	1,39	1,64	5,49
9	54,91	17,87	0,52	0,05	1,57	9,44	10,16	88,19
10	55,80	15,09	0,52	0,07	2,20	7,50	16,47	80,97
11	61,40	16,35	0,50	0,22	0,39	2,35	4,47	38,80
12	58,69	18,97	0,51	0,13	2,00	4,64	19,43	65,07
13	56,23	15,55	0,52	0,07	1,10	6,61	9,40	81,60
14	62,69	15,58	0,49	0,18	1,21	2,81	14,48	48,49
15	58,76	14,56	0,51	0,12	1,30	4,43	13,87	68,19
16	58,51	15,26	0,52	0,12	1,32	4,50	13,80	67,85
17	66,13	14,90	0,47	0,29	0,50	1,70	2,74	13,47
18	71,49	12,01	0,44	0,29	0,63	1,46	1,70	5,69
19	55,23	18,57	0,52	0,05	1,61	9,68	10,13	87,93
20	56,96	18,10	0,51	0,07	2,18	7,43	16,39	80,58

Fracción sólida: RS, recuperación de sólidos; AR, azúcares reductores; X<sub>G</sub>, fracción másica de glucosa; X<sub>X</sub>, fracción másica de xilosa. Fracción líquida: CG, concentración de glucosa; P<sub>GP</sub>, porcentaje de glucosa liberada; CX, concentración de xilosa, P<sub>XP</sub>, porcentaje de xilosa liberada.

El contenido de celulosa de *P. maximum* fue similar al *switchgrass* variedad Alamo con 32% p/p y menor al *switchgrass* variedad Dacotah y *Miscanthus* con 35% p/p y 42% p/p, respectivamente. No se encontraron grandes diferencias entre el contenido de hemicelulosa y lignina de los diferentes pastos. Las desviaciones promedio de contenido de hemicelulosa y lignina correspondieron a 1,26% p/p y 2,05% p/p. El contenido de ceniza más alto correspondió al *P. maximum* con un valor de 8% p/p. Para las tres variedades de *switchgrass*, el contenido de ceniza fue menor al 5% p/p [35], mientras que para el *Miscanthus* fue menor al 3% p/p [34]. En la ceniza quedan atrapados la mayor cantidad de cationes básicos presentes en la biomasa lignocelulósica [17]. Por ejemplo, en otros tipos de biomasa lignocelulósica como la madera blanda (*softwood*) las concentraciones de cationes básicos son: 22,4 - 28,5% p/p, Ca<sup>2+</sup>; 12,4 - 9,8% p/p, K<sup>+</sup>; 4,3 - 2,8% p/p, Mg<sup>2+</sup>, mientras que para la madera dura (*hardwood*): 19 - 27,1% p/p, Ca<sup>2+</sup>; 12,2 - 20,4% p/p, K<sup>+</sup>; 2,2 - 3,6% p/p, Mg<sup>2+</sup> [36]. Los cationes tienden a neutralizar una proporción del ácido sulfúrico empleado en algunos pretratamientos de biomasa para producción de etanol [17]. La propiedad de neutralizar una fracción del ácido se conoce como capacidad neutralizante (CN). Para este estudio, el contenido de ceniza del *P. maximum* no se consideró crítico.

## Evaluación del pretratamiento

En el cuadro 3, se encuentran los resultados del análisis realizado a las fracciones sólidas y líquidas de cada uno de los experimentos llevados a cabo para el análisis del pretratamiento.

## Fracción sólida del pretratamiento

Durante el pretratamiento con ácido diluido se determinaron las variables de respuesta: recuperación de sólidos (%), fracción másica de glucosa ( $X_G$ ), fracción másica de xilosa ( $X_X$ ), en términos de celulosa y hemicelulosa equivalente, y digestibilidad de la biomasa pretratada luego de una hidrólisis enzimática de 48 horas por medio de la concentración de azúcares reductores (g/L). En términos de fracción másica de la biomasa pretratada obtenida en las diferentes condiciones evaluadas, la fracción másica de glucosa ( $X_G$ ) presentó valores de 0,43 y 0,53 g glucosa/g biomasa pretratada, más altos respecto a la biomasa sin tratar, 0,316 g glucosa/g biomasa. Estos resultados, estuvieron acorde a lo esperado debido a la pequeña cantidad de celulosa solubilizada en forma de glucosa durante el pretratamiento con ácido diluido. Se observó un efecto menos intenso cuando la concentración de sólidos se incrementó al mantener la concentración de ácido constante. Es decir, la fracción másica de glucosa equivalente a celulosa se redujo mientras que la fracción másica de xilosa equivalente a hemicelulosa aumentó. Este efecto pudo presentarse gracias a la capacidad neutralizante (CN) de la biomasa y su humectación. La incidencia de esta capacidad neutralizante se incrementó al aumentar la concentración de sólidos y disminuyó la degradación de hemicelulosa. Para determinar la capacidad neutralizante del *Panicum maximum*, se colocó una muestra de pasto en una solución de 0,5 %p/v de ácido sulfúrico. El pH de la solución de ácido se midió antes y después de agregar el pasto. La diferencia de pH se empleó para calcular la capacidad neutralizante según Esteghlalian *et al.* (1997). Para el *Panicum maximum*, la capacidad neutralizante fue de  $24,28 \pm 2,4$  mg  $H_2SO_4$ /g de biomasa seca. De acuerdo con lo reportado por Castro *et al.* (2011), la CN del *P. maximum* fue similar a la de *Panicum virgatum* (16,7 mg  $H_2SO_4$ /g de biomasa seca), álamo (25,8 mg  $H_2SO_4$ /g de biomasa seca) y a la paja de canola (19,7 mg  $H_2SO_4$ /g de biomasa seca), y menor al rastrojo de maíz (43,7 mg  $H_2SO_4$ /g de biomasa seca) [37]. La diferencia de capacidad neutralizante de las dos plantas perennes, *P. maximum* y *P. virgatum*,

se podría explicar con el contenido de ceniza como se mencionó anteriormente.

## Recuperación de sólidos

Para la recuperación de sólidos (RS) se desarrolló el siguiente modelo cuadrático a partir de los datos obtenidos:

$$RS(\%) = 58,10 - 24,79 \times CA + 3,5 \times CS \\ - 1,31 \times CA \times CS \\ + 12,44 \times CA^2 - 0,07 \times CS^2$$

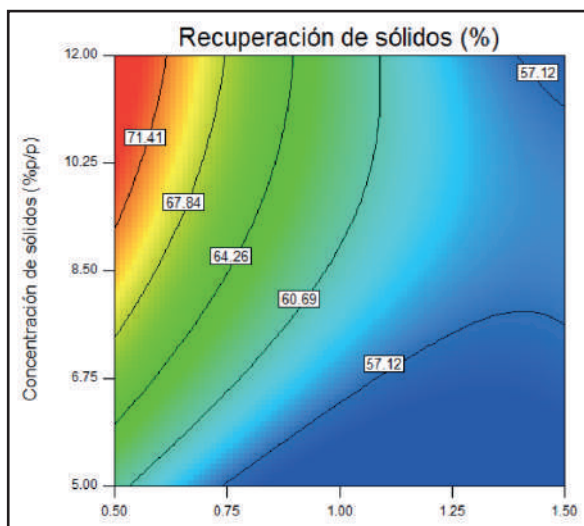
(Ec. 4)

Donde, *CA* es la concentración de ácido sulfúrico (% p/v) y *CS* es la concentración de sólidos (% p/p). El valor F del modelo fue de 10,47, lo que implica que es significativo y solo existe 2,05% de probabilidad de alteración por ruido. La falta de ajuste del modelo fue no significativa, con valor F de 31,48 y valor P de 0,1301, por lo tanto, el modelo puede usarse para predecir el comportamiento de la recuperación de sólidos en los ensayos de pretratamiento bajo las condiciones evaluadas. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0,9249 a 95% de confianza, garantizando el ajuste del modelo.

De acuerdo con el cuadro 3, la recuperación de sólidos presentó valores entre 55 y 74%, dependiendo de la condición del pretratamiento. Li *et al.* (2010), realizaron un pretratamiento sobre *switchgrass* (*Panicum virgatum*) con una concentración de sólidos de 1,2% p/p empleando ácido sulfúrico diluido, 3% p/p a una temperatura de 160°C por 20 minutos, logrando recuperar 59,3% de sólidos. Por otro lado, Cheng *et al.* (2010), estudiaron dos pretratamientos alcalinos sobre paja de arroz: (1) pretratamiento con hidróxido de calcio a una temperatura de 95°C con una concentración de paja de arroz de 10% p/p y una dosis de base de 0, 5 y 10% p/p respecto a la biomasa, y (2) pretratamiento con hidróxido de sodio a una temperatura de 55°C con una concentración de 20% p/p y una dosis de base de 0, 2 y 4% p/p respecto a la biomasa. En ambos casos la recuperación de sólidos fue superior al 80%. Mateus (2011), evaluó un pretratamiento ácido de una gramínea conocida como *Penisetum sp.*, a una concentración de ácido de 0,8; 1,2 y 2% p/p, y unas temperaturas de 110°C hasta 190°C, manteniendo una concentración de sólidos de 15% p/p, logrando una recuperación de sólidos de un 47,3 a un 65,5%. Los valores de recuperación de sólidos



**Figura 3.** Contorno de superficie de respuesta para la recuperación de sólidos de acuerdo con el modelo.



reportados por este trabajo coinciden con lo especificado por otros autores que han trabajado con otras gramíneas como se observó anteriormente (figura 3).

La diferencia de recuperación de sólidos en los diferentes pretratamientos y especialmente entre los ácidos y los básicos es su selectividad hacia un componente de la biomasa. Los pretratamientos ácidos son selectivos a la hemicelulosa, mientras que los pretratamientos básicos lo son a la lignina, al encontrarse esta última en menor proporción en la mayoría de las diferentes especies de biomasa lignocelulósica, la recuperación de sólidos cuando se realiza este tipo de pretratamientos puede ser mayor. Ambos factores experimentales, concentración de ácido y concentración de sólidos, tuvieron influencia sobre la recuperación de sólidos, donde la concentración de ácido tuvo un efecto negativo sobre la recuperación de sólidos (valor P: 0,0050), mientras que la concentración de sólidos presentó un efecto positivo (valor P: 0,0256). Por ejemplo, cuando la concentración de ácido se incrementó de 0,5% p/v hasta 1,5% p/v a una concentración de sólidos constante de 8,5% p/p, la recuperación de sólidos disminuyó 70 y 56 %, respectivamente. Esta pérdida de masa se atribuye a la degradación de diferentes componentes de la biomasa como hemicelulosa (en especial xilosa), lignina y otros extractos, dependiendo del pretratamiento seleccionado y las condiciones. Esta tendencia también fue evidenciada en los ensayos de Mateus (2011), al incrementar la concentración de ácido de 0,8% p/p a 2% p/p manteniendo una temperatura y

concentración de sólidos constante de 130°C y 15% p/p, la recuperación se redujo de 61,6% a 56,2%.

De acuerdo con los resultados experimentales, la máxima recuperación de sólidos fue de 73%, alcanzada a una concentración de ácido de 0,5% p/v y 12% p/p de concentración de sólidos. A pesar de ser la mejor condición para la recuperación de sólidos, la fracción másica de glucosa de la biomasa pretratada fue la más baja,  $0,43 \pm 0,01$ , y la fracción de xilosa más alta, con  $0,29 \pm 0,01$ , posiblemente por el poco efecto del nivel inferior de concentración de ácido evaluado sobre la hemicelulosa presente en la biomasa.

### Prueba de digestibilidad

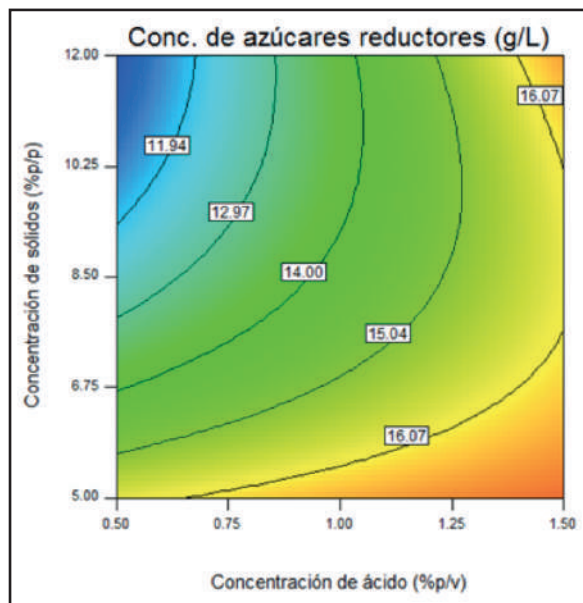
La prueba de digestibilidad de la biomasa pretratada consistió en realizar una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos de 5% p/p, manteniendo constante el tiempo de hidrólisis, pH de la solución tampón y la dosis de enzimas, determinando la concentración de azúcares reductores totales (g/L). Esta prueba se puede evaluar de forma directa la efectividad del pretratamiento sobre la biomasa. El modelo cuadrático desarrollado a partir de los datos obtenidos fue:

$$AR(\%) = 25.21 - 5.06 \times CA - 1.99 \times CS + 0.66 \times CA \times CS + 1.62 \times CA^2 + 0.06 \times CS^2$$

(Ec. 5)

El modelo presentó un valor F de 9,81. Por otro lado, la falta de ajuste del modelo fue no significativa, con valor F de 26,83 y un valor P de 0,1408. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0,8864 a 95% de confianza, garantizando el ajuste del modelo. Al emplear una concentración de ácido de 0,5% p/v, se observó una gran variación en la respuesta de azúcares reductores, efecto contrario al que se evidenció con la mayor concentración de ácido 1,5% p/v, donde no existieron diferencias significativas en la respuesta. Schell *et al.* (2003), evaluaron la conversión de celulosa a glucosa durante una hidrólisis enzimática de biomasa de paja de maíz pretratada con ácido sulfúrico diluido a diferentes concentraciones de ácido, observando un incremento en la conversión de 60 a 87% cuando se incrementaba la concentración de ácido en el pretratamiento de 0,5 a 1,4% p/p. Concentraciones más severas en el pretratamiento au-

Figura 4. Contorno de superficie de respuesta para la concentración de azúcares reductores de acuerdo con el modelo.



mentan la accesibilidad de las enzimas a la celulosa presente incrementando la porosidad de la biomasa y disminuyendo la cristalinidad [23].

La mayor concentración de azúcares reductores fue de 19 g/L a una concentración de ácido de 1,5% p/v y concentración de sólidos de 12% p/p. Para la hidrólisis enzimática, los factores experimentales presentaron un efecto opuesto respecto a lo que se evidenció con la recuperación de sólidos. La concentración de ácido (valor P: 0,0077) tuvo un efecto positivo sobre la concentración de azúcares reductores, y la concentración de sólidos (valor P: 0,0183) una influencia negativa. Por ejemplo, cuando la concentración de sólidos se incrementó de 5% p/p a 12% p/p a una concentración de ácido constante, 0,5% p/v, la concentración de azúcares reductores de la hidrólisis enzimática disminuyó de 16 g/L a 11 g/L. No se presentaron diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores cuando se evaluaron las concentraciones de sólidos de 8,5 %p/p y 12% p/p a una concentración de ácido de 1% p/v (figura 4).

El mismo comportamiento se observó al emplear una concentración de ácido de 1,5% p/v bajo las concentraciones de sólidos antes mencionadas. Esta respuesta pudo haberse presentado a causa de un fenómeno de inhibición por sustrato (celobiosa) de las  $\beta$ -glucosidasas presentes durante la hidrólisis enzimática.

## CONCLUSIONES

La biomasa lignocelulósica de pasto guinea (*Panicum maximum*) ecotipo CIAT 36000 con un tiempo de corte de 6 meses sembrado en Villavicencio (Colombia) presentó una composición (% p/p) de 28,4% de celulosa, 19,3% de hemicelulosa, 25,4% de lignina y 8% de ceniza. Con una composición de 47,7% de carbohidratos estructurales, el pasto *P. maximum* presenta un gran potencial para la producción de etanol, sin embargo, se debe tener en cuenta el alto contenido de ceniza para la correcta selección del pretratamiento y sus condiciones de operación.

Cada una de las variables experimentales del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, presentaron un efecto sobre las variables de respuesta. La concentración de sólidos tuvo un efecto positivo para la recuperación de sólidos pretratados, mientras que la concentración de ácido tuvo un efecto positivo sobre la conversión de celulosa a glucosa, evaluada en términos de digestibilidad de la biomasa pretratada.

Con un pretratamiento de ácido sulfúrico diluido a 1,5% p/v y 12% p/p de concentración de sólidos a 130°C durante 60 minutos, se logró recuperar el 58% de sólidos y obtener una concentración de azúcares reductores de 16 g/L luego de una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos pretratados de 5% p/p.

## AGRADECIMIENTOS

C.R. Castillo-Saldarriaga agradece el apoyo al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) por el financiamiento a través del Programa de Jóvenes Investigadores y a la beca de posgrado de la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres.

## REFERENCIAS

- [1] NAIR, R.B., LENNARTSSON, P.R. and TAHERZADEH, M.J. Book Chapter: Bioethanol production from agricultural and municipal wastes. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management. 1 ed. Lucknow (India): Elsevier, 2016, p.157-190.
- [2] HUANG, C., GUO, H.J., WANG, C., XIONG, L., LUO, M., CHEN, X., ZHANG, H., LI, H. and CHEN X. Efficient continuous biogas production using

- lignocellulosic hydrolysates as substrate: A semi-pilot scale long-term study. *Energy Conversion and Management*, 151, 2017, p. 53-62.
- [3] MAHMUD, M.I. and CHO, H.M. A review on characteristics, advantages and limitations of palm oil biofuel. *International Journal of Global Warming*, 14(1), 2018, p. 81-96.
- [4] JAISWAL, D., DE SOUZA, A., LARSEN, S., LEBAUER, D., MIGUEZ, F., SPAROVEK, G., BOLLERO, G., BUCKERIDGE, M. and LONG S. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable Green alternative to crude oil use. *Nature Climate Change*, 7(11), 2017, p. 788-792.
- [5] ECKERT, C., FRIGO, E., ALBRECHT, L., ALBRECHT, A., CHRIST, D., SANTOS, W., BERKEMBROCK, E. and EGEWARTH, V. Maize ethanol production in Brazil: characteristics and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 2018, p. 3907-3912.
- [6] JOGLEKAR, S.N., TANDULJE, A.P., MANDAVGANE, S.A. and KULKARNI, B.D. Environmental impact study of bagasse valorization routes. *Waste and Biomass Valorization*, 2018, p. 1-12.
- [7] MARTINEZ, E. and NG, K.S. Design of biorefinery systems for conversion of corn stover into biofuels using a biorefinery engineering framework. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2017, p. 1-14.
- [8] TALEBNIA, F., MIGHANI, M., RAHIMNEJAD, M. and ANGELIDAKI, I. Ethanol production from steam exploded rapeseed straw and the process simulation using artificial neural networks. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(1), 2015, p. 139-147.
- [9] WONGSEGONSUP, R. and JANE, J. Effects of different mill types on ethanol production using uncooked dry-grind fermentation and characteristics of residual starch in distiller's dried grains (DDG). *Cereal Chemistry*, 94(4), 2017, p. 645-653.
- [10] KRISTIANO, Y. and ZHU, L. Techno-economic optimization of ethanol synthesis from rice-straw supply chains. *Energy*, 141, 2017, p. 2164-2176.
- [11] QUEVEDO, B., NARVAEZ, P., PEDROZA, A. and VELASQUEZ, M. Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 2015, p. 117-127.
- [12] YANG, M., ZHANG, J., KUITTINEN, S., VEPSALAINEN, J., SOININEN, P., KEINANEN, M. and PAPPINEN, A. Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 189, 2015, p. 131-137.
- [13] SHARMA, B., BIRRELL, S. and MIGUEZ, F. Spatial modeling framework for bioethanol plant siting and biofuel production potential in the U.S. *Applied Energy*, 191, 2017, p. 75-86.
- [14] LEWANDOWSKI, I., CLIFTON, J., TRINDADE, L., VAN DER LINDEN, G., SCHAWARZ, K., MULLER, K., ANISIMOV, A., CHEN, C. and DOLSTRA O. Progress on optimizing miscanthus biomass production for the european bioeconomy: results of the EU FP7 project OPTIMISC. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1620, 2016.
- [15] JONKER, J., VAN DER HILST, F., JUNGINGER, H., CAVALETT, O., CHAGAS, M. and FAAIJ, A. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. *Applied Energy*, 147, 2015, p. 593-610.
- [16] CARDONA, E., RIOS, J., PEÑA, J., PEÑUELA, M. and RIOS, L. King Grass: a very promising material for the production of second generation ethanol in tropical countries. *Biomass and Bioenergy*, 95, 2016, p. 206-213.
- [17] BERNAL, J. Capítulo 16: Gramíneas de clima cálido. Parte III: Principales especies forrajeras utilizadas en Colombia. *Pastos y Forrajes Tropicales - Producción y Manejo*. 3 ed. Bogotá (Colombia): Editorial Banco Bilbao Vizcaya Argentaria, 1994, 544 p.
- [18] BAIG, M., DHARMADHIKARI, S. and ISMAIL, S. Technological processes for conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(4), 2017, p. 1863-1881.
- [19] CHEN, H. and LIU, H. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. *Engineering in Life Sciences*, 17(5), 2017, p. 489-499.
- [20] QING, Q., GUO, Q., ZHOU, L., GAO, X., LU, X. and ZHANG, Y. Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, 109, 2017, p. 319-397.
- [21] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM INTERNATIONAL. D1511 - 12 - Standard Test Method for Carbon Black-Pellet Size Distribution. *Rubber, Natural and Synthetic - General Test Methods*, 09.01, 2017, p. 4.

- [22] KRASZNAI, D., CHAMPAGNE, R., ROY, H., CHAMPAGNE, P. and CUNNINGHAM, M. Compositional analysis of lignocellulosic biomass: conventional methodologies and future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 2018, p. 199-217.
- [23] LIU, E., DAS, L., ZHAO, B., CROCKER, M. and SHI, J. Impact of dilute sulfuric acid, ammonium hydroxide, and ionic liquid pretreatments on the fractionation and characterization of engineered switchgrass. *Bioenergy Research*, 10(4), 2017, p. 1079-1093.
- [24] SHI, S., GUAN, W., KANG, L. and LEE, Y. Reaction kinetic model of dilute acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis of corn stover under high-solid conditions. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 56(39), 2017, p. 10990-10997.
- [25] ZHANG, Z., VANCOV, T., MACKINTOSH, S., BASU, B., LALI, A., QIAN, G., HOBSON, P. and DOHERTY, W. Assessing dilute acid pretreatment of different lignocellulosic biomasses for enhanced sugar production. *Cellulose* 23(6), 2016, p. 3771-3783.
- [26] KAPOOR, M., SOAM, S., AGRAWAL, R., GUPTA, R., TULI, D. and KUMAR, R. Pilot scale dilute acid pretreatment of rice straw and fermentable sugar recovery at high solid loadings. *Bioresource Technology*, 224, 2017, p. 688-693.
- [27] CASTILLO-SALDARRIAGA, C.R. Obtención de un hidrolizado detoxificado a partir de biomasa lignocelulósica de *Panicum maximum* para su uso como sustrato en la fermentación alcohólica [Tesis Maestría Ingeniería Química. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Facultad de Ingeniería, 2014, 142 p.
- [28] SHARMA, A., TEWARI, R., RANA, S., SONI, R. and SONI, S. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8), 2016, p. 1346-1380.
- [29] RAY, A., HOOVER, A., NAGLE, N., CHEN, X. and GRESHAM, G. Effect of pelleting on the recalcitrance and bioconversion of dilute-acid pretreated corn stover under low- and high solids conditions. *Biofuels*, 4, 2013, p. 217-284.
- [30] RABELO, S. Evaluation and optimization of pretreatments and enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse for second-generation ethanol production [Tesis doctoral en Ingeniería Química]. Campinas (Brasil): Universidad Estatal de Campinas, Facultad de Ingeniería Química, 2010, 414 p.
- [31] ROJAS, L.C. Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables [Tesis maestría en Ingeniería Química]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ingeniería, 2011, 120 p.
- [32] QUEVEDO, B. Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos [Tesis doctor en Ingeniería, Ingeniería Química]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ingeniería, 2011, 178 p.
- [33] MATEUS, L. Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "*Pennisetum Sp*" [Tesis maestría Ingeniería Química]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, facultad de ingeniería, 2011, 81 p.
- [34] HAGE, R., CHRUSCIEL, L., DESHARNAIS, L. and BROSE, N. Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignina structure and organosolv delignification. *Bioresource Technology*, 101, 2010, p. 9321-9329.
- [35] WYMAN, C., BALAN, V., DALE, B., ELANDER, R., FALLS, M., HAMES, B., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M., LEE, Y., MOSIER, N., PALLAPOLU, V., SHI, J., THOMAS, S. and WARNER, R. Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. *Bioresource Technology*, 102, 2011, p. 11052-11062.
- [36] MARESCA, A., HYKS, J. and ASTRUP, T. Recirculation of biomass ashes onto forest soils: ash composition, mineralogy and leaching properties. *Waste Management*, 70, 2017, p. 127-138.
- [37] CASTRO, E., DÍAZ, M., CARA, C., RUIZ, E., ROMERO, I. and MOYA, M. Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation. *Bioresource Technology*, 102, 2011, p. 1270-1276.
- [38] LI, C., KNIERIM, B., MANISSERI, C., ARORA, R., SCHELLER, H., AUER, M., VOGEL, K., SIMMONS, B. and SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 101, 2010, p. 4900-4906.
- [39] CHENG, Y., ZHENG, Y., WEI, C., DOOLEY, T., JENKINS, B. and VANDERGHEYNST, J. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 2010, p. 1768-1784.