

Evaluación de la etapa de hidrólisis y fermentación del bagazo pretratado con Organosolv

Evaluation of the hydrolysis stage and fermentation of the bagasse pre tried with Organosolv

Layanis Mesa Garriga, Erenio González Suárez; Cristóbal Cara Corpas, Nancy López Bello; Eulogio Castro Galiano.

Resumen

En el trabajo se realiza un estudio de los diferentes factores que afectan la etapa e la hidrólisis enzimática, considerando para ello la importancia que las variables inherentes a su conducción, así como la calidad del pretratamiento tienen e en los resultados de los parámetros que la caracterizan, con hincapié en la concentración de glucosa y xilosa, así como en los rendimientos de ambas por cada 100 gramos de materia prima.

Se incluye el estudio considerando como variables independientes el uso de la Xilanasas, el por ciento de tensoactivo, el por ciento de sólido, el tipo de pretratamiento y la carga enzimática. El estudio se realiza mediante un diseño factorial fraccionario de Box-Hunter 2^{5-2} con replicas en el centro para cada uno de los tipos de pretratamiento. Los resultados alcanzados permiten mediante los modelos de cada uno de los 6 parámetros de respuesta estimar el mejor valor posible dentro de la región experimental cuyo pronóstico es validado experimentalmente para cada uno de los tipos de pretratamiento.

Además para cada uno de los pretratamiento y en las condiciones básicas (centrales) del ensayo se realiza un estudio de la hidrólisis enzimática en el tiempo dentro del período de las primeras 24 horas, que permite determinar la respuesta en el tiempo de la concentración de glucosa y el rendimiento de glucosa cada 100 gramos de materia prima, concluyéndose que no son necesarias las 24 horas para obtener una eficiente hidrólisis enzimática. Finalmente, se realiza un estudio comparativo de los resultados obtenidos en concentración de etanol y Kg de bagazo requeridos para la producción de un litro de etanol empleando indistintamente la sacarificación y fermentación separada, la presacarificación o la sacarificación y fermentación simultánea.

Palabras Claves: bagazo, pretratamiento organolv, hidrólisis enzimática.

Summary:

In the work it is carried out a study of the different factors that they affect the stage and the enzymatic hydrolysis, considering for it the importance that the inherent variables to their conduction, as well as the quality of the pretreatment has and in the results of the parameters that characterize it, with stress in the concentration of glucose and xilosa, as well as in the yields of both for each 100 grams of matter prevails.

The study is included considering as independent variables the use of the Xilanasa, the tenseactive percent, the solid percent, the pretratamiento type and the enzymatic load. The study is carried out by means of a fractional factorial design of Box-Hunter 25-2 with you reply in the center for each one of the pretratamiento types. The reached results allow by means of the models of each one of the 6 answer parameters to estimate the best possible value inside the experimental region whose presage is validated experimentally for each one of the pretratamiento types.

Also for each one of the pretratamiento and under the basic conditions (central) of the rehearsal he/she is carried out a study of the enzymatic hydrolysis in the time in the period of the first 24 hours that allows to determine the answer in the time of the concentration of glucose and the yield of glucose each 100 grams of matter it prevails, being concluded that you/they are not necessary the 24 hours to obtain an efficient enzymatic hydrolysis.

Finally, he/she is carried out a comparative study of the results obtained in concentration of ethanol and Kg of trash required for the production of a liter of ethanol using the scarification and separate fermentation, the presacarification or the scarification and simultaneous fermentation indistinctly.

Key words: bagasse, pretreatment organolv, enzymatic hydrolysis.

I. Introducción

Las reservas de combustibles fósiles se están agotando, el calentamiento global es una realidad el reciclado y manejo de los desechos comienzan a ser muy costosos y problemáticos y el crecimiento de la población requiere más y más energía y productos para el consumo. Hay ahora, la alternativa de pasar de la economía del petróleo a la de las fuentes renovables utilizando todas las posibilidades de las plantas de biomasa. (Octave S.; D. Thomas, 2009).

La abundancia y relativo bajo costo de los materiales lignocelulósicos los han hecho atractivos como materias primas para la producción de etanol en suficientes cantidades de Fuentes renovables y razonable bajo costo. Desechos no aprovechados de la industria forestal y residuos agroindustriales pueden ser utilizados como material primas; en particular el bagazo de caña e azúcar es un desecho de las producciones de la industria de la caña de azúcar de gran potencial para la fabricación de etanol de residuos lignocelulósicos.

Sin embargo, la resistencia de la matriz lignocelulósica al ataque de las enzimas hace necesario un pretratamiento para lograr la accesibilidad de las enzimas a los sustratos (Per Sassner, Mats Galbe, Guido Zacchi; 2008).

De esta manera, la mejor forma de evaluar la calidad de un sistema de pretratamiento de un material lignocelulósico será sin duda la eficacia de una hidrólisis enzimática en condiciones normalizadas.

Para el caso específico del bagazo de caña de azúcar se han utilizado varios sistemas de pretratamiento, y en particular se ha empleado con resultados esperanzadores el pretratamiento organosolv en dos etapas (una ácida y otra básica). (Mesa, L.; E. González; 2008), en adición, los resultados investigativos demuestran la utilidad de utilizar el organosolv en una y otra etapa (Mesa, L.; E. González; 2008), sin embargo, un análisis detallado de los costos de producción para diferentes alternativas de tratamiento con las dos etapas, (Erenio González Suárez, Marlen Morales Zamora, Layanis Mesa Garriga, Delvis Acosta Martínez y Eulogio Castro Galiano; 2009), concluye que es más prometedor desde el punto de vista técnico económico suprimir la adición de etanol en la etapa ácida y solo utilizar el etanol en la etapa básica, por lo que los estudios de evaluación técnico económica a los diferentes parámetros de

conducción del procesos de producción de etanol de bagazo de caña de azúcar se han realizado considerando que la etapa ácida no utiliza etanol (Mesa, L, González, E, Albernas Y, González M. Cara, C., Castro E.; 2009), encontrándose en los estudios de sensibilidad realizados al respecto que los costos de producción de un hectolitro de etanol son más sensibles a los precios y índices de consumo de las enzimas de la etapa de hidrólisis enzimática que a cualquier otro de los componentes de los costos. (Mesa, L, González, E, Albernas Y, González M. Díaz M, Castro E.; 2009), por otro lado como se refiere en la literatura científica (Yang, Bin, Wymann, C.E.; 2007); dado su significativo impacto sobre la economía del proceso se debe considerar entre otros el requerimientos de que la concentración de azúcar desde las acopladas etapas de pretratamiento y hidrólisis enzimáticas deben ser superiores al 10 % para asegurar que las concentraciones de etanol sean adecuadas y los costos del procesos agua abajo sean manejables, por lo que el estudio y optimización de la etapa de hidrólisis enzimática es de especial interés para lograr una rentabilidad del procesos.

Con ese propósito se desarrollo la presente investigación encaminada a determinar mejores alternativas de conducción del proceso de hidrólisis enzimática, utilizando el material celulignítico obtenido de una combinación de dos etapas, una ácida sin etanol y otra básica con etanol.

II. Planificación experimental de la investigación.

2.1. Efecto de las variables independientes en la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

En investigaciones realizadas para el bagazo de caña de azúcar para una optimización multiobjetivo de la hidrólisis enzimática, (Peñuela Vásquez, Mariana Juliana Nascimento C. Da Silva, Mauricio Bezerra de Souza Jr., and Nei Pereira Jr.; 2007), se ha recomendado como factores a considerar en los estudios de hidrólisis enzimática la temperatura entre 30 y 50; Carga enzimática (FPU/g de celulignina de 5 a 30; el pH entre 5 y 6, y el % de sólidos entre 2 y 10, resultando los mejores valores de la respuesta multiobjetivo: Temperatura entre 40 y 50 C, Carga enzimática entre 18 y 30 UPF/g % de sólidos entre 8 y 10, empleando en el estudio un diseño 3^4 con 6 replicas en el centro=87 y se encontró que el pH no era significativo en sus cambios por lo que se adoptó

5 por ser lo recomendado en la literatura. Por otro lado en estudios realizados por otros investigadores para desechos similares al bagazo de caña de azúcar (Maria Vealderes Ponte Rocha, Tigressa Helena Soares Rodrigues, Gorete Ribeiro de Mancedo, Luciana R. B. Gongalves, 2009), las Variables estudiadas para la hidrólisis enzimática fueron las siguientes:

Variables	Nivel (-)	Nivel (+)
X1: Temperatura	30	45
X2: Carga enzimática	15	30
X3. Sólidos %	2	16

Resultando los mejores valores en las condiciones de máximo valor de temperatura, carga enzimática y % de sólidos a un pH fijo de 5.

En estudios realizador (Xuejan Pan; Cludio Arato; Neil Gilkes; David Greg; Warren Mabee; Kendall Pye, Zhizhuang Xiao Zhang; Johan Saddler; 2005) recomendaron suplementar en la hidrólisis enzimática la celulosa con B-glucosidasa, por otro lado, de acuerdo con los fines que se quieran utilizar las pentosas, separadas en la primera etapa de tratamiento ácido (furfural o etanol) las condiciones de conducción de la misma serán diferentes, es decir para furfural: Temperatura 175-185 ° C; Relación sólido - líquido 1/1 (Erenio González Suárez, Marlen Morales Zamora, Layanis Mesa Garriga, Delvis Acosta Martínez y Eulogio Castro Galiano; 2009), y para etanol : Temperaturas de 120-130 ° C y relación sólido líquido 4/ 1 (Mesa, L.; González ,E.;2009) por lo que es oportuno estudiar la optimización de los resultados de la etapa de hidrólisis enzimática para ambos productos del pretratamiento.

La caracterización de los hidrolizados obtenidos de estas condiciones tanto en un reactor piloto (10 litros) con vapor en el interno como las realizadas en un reactor de laboratorio se ofrecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Impacto del de las condiciones de primera etapa de pretratamiento en la xilosa recuperada. Base: 100 gramos de bagazo seco.

Temp	Tiempo Minutos	% de Acido	S/L	Tipo Reactor	Xilosa Final	% Potencial Recuperación	% Real Recuperado.
120-30	40	4	4/1	Laborat	6,755*	72,89	72,89
120-30	40	4	4/1	Piloto	7,626	69,50	42,51
175-85	25	1	1/1	Piloto	12,547	49,81	4,52

*Valor estimado considerando la recuperación de xilosa.

El tipo de pretratamiento incluyó en la segunda etapa (básica) el utilizar 3% de sosa o 5 % de sosa para los casos que se utilizaba 175-185 ° C ó 120-130 ° C en la primera etapa respectivamente a fin de aumentar la severidad del tratamiento a las más bajas temperaturas. De acuerdo con lo anterior en el diseño experimental se planteo estudiar a Temperatura constante a 50 Grados Centígrados y pH también constante de 5 el efecto sobre la eficiencia de la hidrólisis enzimática de las siguientes variables y rangos de variación de las mismas:

Variable

- X1: Xilanasa
- X2: Tensoactivo % del sólido
- X3: Tipo de pretratamiento
- X4: % de sólidos
- X5: Carga enzimática (FPU/g).

Valor Mínimo	Valor Máximo
0	400
2.5	4.0
Tipo 1	Tipo II
10	16
10	30

Como parámetros de respuesta se consideraron los que caracterizan de forma integral la eficacia de la etapa de la hidrólisis enzimática, es decir:

- Y1(Concentración glucosa[g/l];
- Y2(Concentración xilosa[g/l];
- Y3 (RtoGlucosa HE)[%];
- Y4(Rto de xilosa en HE) [%];
- Y5 (Rto de glucosa /MP) [g/100gMP];
- Y6 (Rto de azucares /MP) [g/100gMP];

Aquí representa la necesidad de un Plan Experimental con 5 variables independientes (factores) lo que para un experimento a dos niveles 2^5 representa 32 ensayos que con sus replicas significaría 64 ensayos, sin considerar las posibilidades de los efectos cuadráticos de las variables sobre cualquiera de los 6 parámetros de respuesta, sin embargo, en la literatura especializada se reporta el incremento de los diseños factoriales parciales en las investigaciones (Tania Prvan, Deborah J. Street; 2002) de manera que tan solo entre el 1997 y el 2002 se reportaron en publicaciones internacionales 140 usos de Planes factoriales Parciales y de ellos 40 vinculados a aplicaciones de la microbiología [10], la bioquímica [1], la Biotecnología [18] y la Genética [1], por lo que se consideró apropiado disminuir el trabajo experimental mediante un diseño factorial parcial fraccionado (Box, G:P:A., J.S. Hunter, 1961) 2^{5-2} con repeticiones en el centro, el diseño se realizó con ayuda del Software Desig Expert v. 5 y se considero como contraste definido para X3: X2X4X5 y para X1: X2X4 y como relaciones generadas: $1 = X2X3X4X5$ y $1 = X1X2X4$

Los resultados de la hidrólisis enzimática se midieron a las 24 horas.

En la Tabla 2 se presenta el Plan y los resultados experimentales de acuerdo con el diseño 2^{5-2} empleando replicas en los puntos centrales para cada tipo de variable cualitativa (Tipo de Pretratamiento).

Los modelos obtenidos fueron:

Y1(Concentración glucosa[g/l]): $52,47 + 1,65X1 + 0,86X2 + 2,49X3 + 9,68X4 + 6,19X5 - 0,88X1X5 - 0,27 X2X3 - 0,98X2X5$

Y2(RtoGlucosa HE)[%]: $59,31 + 1,96X1 - 1,15,57X2 + 5,40X3 + 1,12X4 + 4,13X5 - 1,321X1X5 - 5,17 X2X3 + 1,64X2X5$

Y3(Concentración xilosa[g/l]): $5,88 + 0,45X1 - 0,079X2 + 1,32X3 + 1,34X4 + 0,55X5 - 0,041X1X5 - 0,30 X2X3 + 0,37X2X5$

Y4(Rto de xilosa en HE) [%]: $58,16 + 3,62X1 + 0,47X2 + 3,56X3 - 0,33X4 + 5,95X5 - 0,38X1X5 - 4,61X2X3 + 0,80X2X5$

Y5 Rto de glucosa /MP) [g/100gMP]: $27,13 + 0,79X1 + 0,26X2 + 0,29X3 - 1,28X4 + 3,36X5 - 0,041X1X5 - 0,79X2X3 - 0,59X2X5$

Y6 (Rto de azucares /MP) [g/100gMP]: $30,21 + 0,97X1 + 0,13X2 + 0,94X3 - 1,33X4 + 4,15X5 - 0,15X1X5 - 1,01X2X3 - 0,94X2X5$

De acuerdo con estos modelos se estimaron a manera de verificación los mejores resultados posibles en la concentración de glucano y xilano que se alcanza en los valores extremos de: X1: 400; X2:2,5%; X4: 16% ; X5: 30UPF.

N	X1	X2	x3	x4	x5	Y1 glu, g/L	Y2 xil, g/L	Y3Rto HE(glu) %	Y4Rto HE(xil) %	Y5g gl/100g	Y6 (glu+xil) g/100g
1	400	2,5	175;3%	10	30	52,65	6,69	73,04	74,58	33,93	38,82
2	400	2,5	120;5%	10	10	35,23	3,15	49,56	48,69	23,95	25,51
3	0	4	175;3%	10	10	38,13	4,23	48,21	47,16	24,57	26,61
4	0	2,5	175;3%	16	10	54,35	8,09	66,38	56,37	21,89	25,10
5	400	4	120;5%	16	10	58,10	5,86	56,55	56,61	24,69	27,14
6	400	4	175;3%	16	30	72,33	9,65	65,91	67,24	29,13	32,95
7	0	4	120;5%	10	30	45,87	4,11	61,95	63,52	31,19	34,74
8	0	2,5	120;5%	16	30	64,92	5,29	52,85	51,10	27,59	29,84
9	200	3,25	175;3%	13	20	61,52	8,15	75,89	69,89	30,49	34,53
10	200	3,25	175;3%	13	20	55,68	6,53	59,10	56,00	27,60	30,84
11	200	3,25	120;5%	13	20	54,23	4,91	59,31	58,38	28,67	31,23
12	200	3,25	120;5%	13	20	53,01	4,48	54,10	53,26	27,72	29,96

Tabla 2: Plan experimental y sus resultados para el diseño 2^{5-2} .

Parámetro de Respuesta	Pretratamiento a 175C	Pretratamiento a 120
Y1(Concentración glucosa[g/l]):	69,49	66,20
Y2(RtoGlucosa HE)[%]:	67,68	64,48
Y3(Concentración xilosa[g/l]):	9,35	6,71
Y4(Rto de xilosa en HE) [%]:	73,93	66,80
Y5 (Rto de glucosa /MP) [g/100gMP]:	29,13	28,54
Y6 (Rto de azucares /MP) [g/100gMP]:	32,97	31,31

Considerando estos resultados se realizaron ensayos en estas mejores condiciones estimadas obteniendo los siguientes resultados comparativos:

Parámetro de Respuesta	Pretratamiento 175C		Pretratamiento 120C	
	Estimada	Experimental	Estimada	Experimental
Y1(Concentración glucosa[g/l]):	69,49	71,62	66,20	67,21
Y2(RtoGlucosa HE)[%]:	67,28	69,34	64,48	65,46
Y3(Concentración xilosa[g/l]):	9,35	9,36	6,71	6,17
Y4(Rto de xilosa en HE) [%]:	73,93	74,01	66,80	61,42
Y5 (Rto glucosa /MP) [g/100gMP]:	29,13	30,02	28,54	29,14
Y6 (Rto azucares /MP) [g/100gMP]:	32,97	33,85	31,31	31,68

2.2. Variación de los resultados de la hidrólisis enzimática en el tiempo.

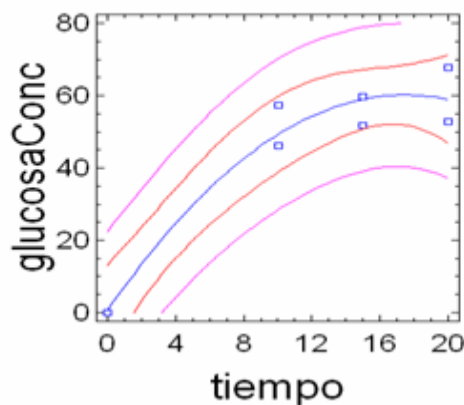
Considerando el efecto, que en los gastos inversionistas, tiene la etapa de hidrólisis enzimática representando para los estudios realizados de sensibilidad aproximadamente el 25 % de los costos inversionistas ((Mesa, L, González, E, Albernas Y, González M. Díaz M, Castro E.; 2009), se decidió estudiar el comportamiento de los principales parámetros de la hidrólisis enzimática con el tiempo, realizada a ls condiciones de niveles medios (ceros) del Plan Experimental realizado antes, siempre para cada tipo de materia prima.

2.2.1 Estudio del comportamiento de la hidrólisis enzimática en el tiempo para el primer tipo de pretratamiento.

Para condiciones medias de X1: 200 % de xilanasas; x2: 3,25 % de Tensoactivo cubano; X4: 13 % de sólidos; X5: Enzimas celulolíticas : 20 UPF y X3: tipo de pretratamiento definido como de pretratamiento con 25 minutos, 175°C y 1 % de ácido en la primera etapa, así como 60 minutos, etanol al 30 % , 3 % de sosa y 185 °C en la segunda etapa.

2.2.1.1. Concentración de Glucosa, g/l vs tiempo, h.

Gráfico de Ajuste para el Modelo



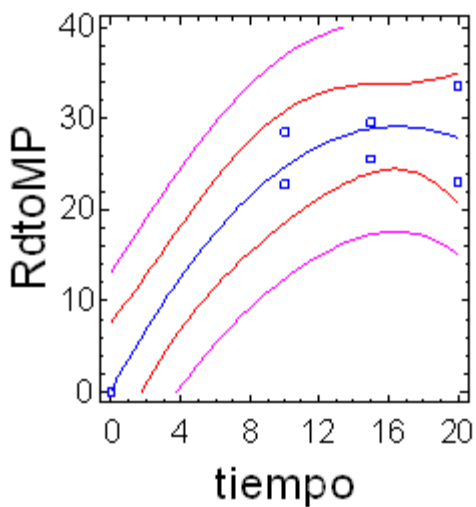
La ecuación del modelo de ajuste es:

$$\text{Conc Glucosa} = 0,413682 + 6,83133 * \text{tiempo} - 0,195241 * \text{tiempo}^2$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, hay relación estadísticamente significativa entre glucosaConc y tiempo para un nivel de confianza del 99%.

2.2.1.2. Rendimiento de glucosa /100 g MP. Vs tiempo h.

Gráfico de Ajuste para el Model



La ecuación de ajuste del modelo es:
 $RdtoMP = 0,166636 + 3,51754 * tiempo - 0,106718 * tiempo^2$.

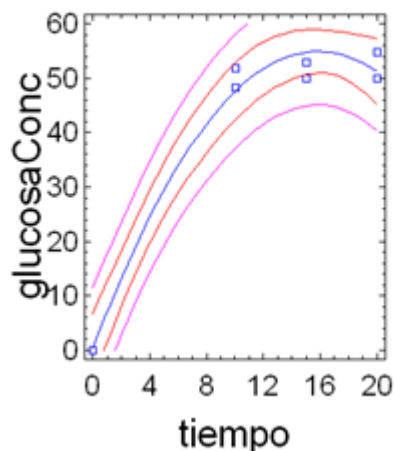
Como se puede observar, para este tipo de pretratamiento, los valores de máximos resultados tanto para la concentración de glucosa como para el rendimiento de glucosa por cada 100 gramos de materia prima, se alcanza entre las 15 y 16 horas por lo que se debe evaluar desde el punto de vista técnico económico si es necesario o no emplear más de 16 horas en esta etapa, y por otro lado en los estudios de sacarificación, incluir la alternativa de presacarificación con alternativas de adición de la levadura entre los tiempos de 6 y 10 horas.

2.2.2 Estudio del comportamiento de la hidrólisis enzimática en el tiempo para el segundo tipo de pretratamiento.

Para la variante de pretratamiento con 40 minutos, 120°C y 4 % de ácido en la primera etapa, así como 60 minutos, etanol al 30 %, 5 % de sosa y 185 °C en la segunda etapa.

2.2.2.1. Concentración de Glucosa, g/l vs tiempo, h.

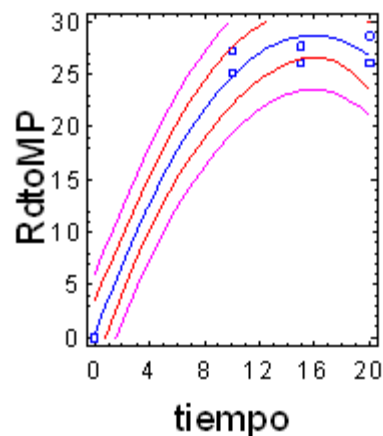
Gráfico de Ajuste para el Model



La ecuación: del modelo de ajuste es
 Concentración de glucosa = $0,416682 + 6,88973 * tiempo - 0,217641 * tiempo^2$

2.2.2.2. Rendimiento de glucosa /100 g MP. Vs tiempo h

Gráfico de Ajuste para el Mode



La ecuación del modelo de ajuste es
 $RdtoMP = 0,217818 + 3,60312 * tiempo - 0,113809 * tiempo^2$.

Como se puede observar, también para este tipo de pretratamiento, los valores de máximos resultados tanto para la concentración de glucosa como para el rendimiento de glucosa por cada 100 gramos de materia prima, se alcanza entre las 15 y 16 horas por lo que se debe evaluar, desde el punto de vista técnico económico, si es necesario o no emplear más de 16 horas en esta etapa, y por otro

lado en los estudios de sacarificación, incluir la alternativa de presacarificación con alternativas de adición de la levadura entre los tiempos de 6 y 10 horas.

La etapa de hidrólisis enzimática no es más que una etapa destinada a obtener por esa vía la disponibilidad de azúcares fermentables destinados a la fermentación alcohólica, como se conoce tradicionalmente estos procesos se hacen de forma separada, es decir primero se obtienen los azúcares por una vía u otra en una etapa preparatoria de la fermentación y posteriormente se fermentan.

Luego de completada la hidrólisis enzimática, la tecnología subsiguiente requerida para la fermentación a etanol, no difiere básicamente de la aplicable a otras soluciones de azúcares, excepto en algún detalle cuando la etapa hidrolítica ha generado agentes inhibidores.

Las técnicas tradicionales han evolucionado, conociéndose procesos como:

- Sacarificación y fermentación simultánea. (SSF).
- La presacarificación y fermentación (PRESAC)

El enfoque más novedoso en este campo, es la combinación de la fermentación con la hidrólisis enzimática, mediante dos alternativas fundamentalmente la Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) y la sacarificación y fermentación acopladas (SFA). Las principales ventajas de estos sistemas son el incremento de la velocidad de hidrólisis, debido al decrecimiento continuo de la concentración de glucosa por su asimilación mediante los microorganismos fermentadores, lo cual deriva en la minimización de la inhibición por producto de la etapa hidrolítica y la consiguiente mejora en el rendimiento global de la producción de etanol. Otra alternativa que se ha desarrollado en la denominada presacarificación, en la cual se añaden las levaduras para la fermentación, no al inicio de la hidrólisis enzimática, sino transcurrido un tiempo previamente determinado de hidrólisis enzimática.

Las tres alternativas, como todas tienen sus ventajas y desventajas, a continuación se estudian los resultados obtenidos en el laboratorio para cada una de ellas, dependiendo también de los dos tipos de pretratamiento utilizado antes de la hidrólisis enzimática, los que en lo adelante se refieren como tratamientos A y B.

2.3. Estudios de la etapa fermentativa combinada con las diferentes alternativas de hidrólisis.

2.3.1. Estudio de la etapa fermentativa. Resultados de la Hidrólisis y Fermentación Separadas (SHF). La fermentación es la etapa principal del proceso, no solo porque en ella se produce el etanol, sino porque se reproduce la masa fundamental de levadura (de 8-10 veces la del prefermentador) y además por formarse aquí los productos secundarios, tales como alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos y otros componentes no-etanol minoritarios que como se conoce le dan las características organolépticas al aguardiente, ron y alcoholes.

Los sistemas fermentativos tradicionales se basan en microorganismos libres en reactores agitados discontinuos. Estos equipos presentan algunas desventajas, entre las cuales podemos citar: la pérdida de eficiencia asociada a los lapsos periódicos de parada, reacondicionamiento y esterilización, puesta en marcha, con la consiguiente mayor repercusión de los costos fijos derivados de esa baja productividad global, la heterogeneidad del producto obtenido en sucesivas operaciones, la dificultad para integrar esta operación a otras etapas del proceso, debido a su carácter discontinuo, lo cual implica que la separación del producto desde la masa de reacción recién se lleva a cabo una vez finalizada la fermentación, los periodos relativamente prolongados que requiere el completamiento de cada operación sucesiva de fermentación, etc. La respuesta tecnológica más directa a los inconvenientes mencionados, está dada por el diseño de fermentadores continuos, con diversas configuraciones.

En el estudio realizado, no se profundizó en detalles en relación a las formas y equipos de realizar estos procesos y se prefirió un sistema discontinuo fácil de reproducir en el laboratorio.

Para el estudio se seleccionaron los dos tipos de pretratamiento antes referidos como A y B, con una hidrólisis enzimática realizada con una carga enzimática de 30 UPF y un por ciento de sólidos en la hidrólisis enzimática de 10. La hidrólisis enzimática se realizó en un período de 24 Horas y la fermentación alcohólica de 24 horas.

Las condiciones experimentales y las respuestas obtenidas para cada caso fueron las siguientes:

Variables/ Niveles	Nivel	Nivel
Tipo de pretratamiento	A	B
Carga Enzimática;	30 UPF	30 UPF
Sólidos;	10 %	10 %
Tiempo de Hidrólisis Enzimática;	24 horas	24 horas
Tiempo de la fermentación;	24 horas	24 horas
Valores obtenidos;		
Concentración de etanol, g/l :	21,22	23,27
Insumo de bagazo; Kg _{bagazo} /litro :	5,26	5,06

sacarificación(50°C) y para la fermentación (30°C), respectivamente. El etanol puede exhibir también inhibición de la actividad de la celulasa en el proceso Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) y con ello perjudicarse los resultados de este procesos. Se han encontrado, pérdidas en celulasas 9%, 36% y 64% de su actividad original a concentraciones de etanol de 9, 35 y 60 g/l, respectivamente, a 38°C durante el proceso SSF (Wu y Lee;1997).

Como aquí se observa tanto las concentraciones de etanol, como los insumos de bagazo por litro de etanol se encontraron ventajosos para el caso en el cual se utiliza el pretratamiento B.

2.3.2. Estudios de la etapa fermentativa. Resultados del Diseño 2² de la Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF).

El proceso Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) ha sido ampliamente estudiado para reducir la inhibición de productos finales de la hidrólisis. En el proceso, los azúcares reductores producidos en la hidrólisis de la celulosa o en la sacarificación son simultáneamente fermentados a etanol, lo cual reduce grandemente la inhibición del producto por la hidrólisis (González, et al, 2006).

Comparando los procesos de hidrólisis-fermentación en dos etapas con los de Sacarificación y Fermentación Simultánea, tenemos de acuerdo con los resultados alcanzados por otros autores, que SSF tiene como ventajas:

- 1) El incremento de la velocidad de hidrólisis por conversión de azúcares que inhiben la actividad de las celulasas;
- 2) El menor requerimiento de enzimas;
- 3) Los altos rendimientos del producto;
- 4) Los menores requerimientos de condiciones estériles puesto que la glucosa es eliminada inmediatamente y el etanol es producido en un tiempo del proceso más corto;
- 5) Menos volumen de reactor.

Sin embargo aún resta resolver algunas desventajas técnicas del método. La fundamental está referida a la necesidad de trabajar a una temperatura de compromiso intermedia entre las optimas para la

Estas desventajas las cuales necesitan ser consideradas por SSF son: (González, et al, 2006).

- 1) Temperaturas incompatibles de hidrólisis y fermentación,
- 2) Tolerancia al etanol por microbios, y
- 3) Inhibición de enzimas por etanol.

Esta operación a temperaturas subóptimas para la hidrólisis, resulta en el requerimiento de grandes volúmenes de fermentador de manera de alcanzar tiempos de residencia adecuados, lo que indudablemente incide desfavorablemente en los valores inversionistas y los costos productivos, por otro lado la calidad de los residuos, de origen agroalimentario, pueden cambiar de un día a otro, de manera que es de interés estimar los parámetros de la sacarificación y fermentación simultanea (Davis, R. A.E.; 2008).

Los microorganismos usados en la SSF son usualmente los hongos *T. Reesei* y la levadura *S. Cerevisiae*. La temperatura óptima de la SSF es alrededor de 38°C, la cual es un compromiso entre la temperatura óptima de la hidrólisis (45-50°C) y la fermentación (30°C). La hidrólisis es usualmente el proceso de velocidad-limitante en SSF. Levaduras y bacterias termotolerantes han sido usadas en la SSF para aumentar la temperatura cerca de la temperatura óptima de hidrólisis.

Para el estudio se utilizaron los dos tipos de pretratamiento antes empleados y referidos como A y B, con una hidrólisis enzimática realizada con una carga enzimática de 30 UPF y un por ciento de sólidos en la hidrólisis enzimática de 10. La hidrólisis enzimática y sacarificación simultánea se realizó en un período de 24 horas totales para cada una de los sistemas de pretratamiento.

Los experimentos se desarrollaron mediante un diseño factorial del tipo 2², las condiciones experimentales, el modelo obtenido del comportamiento del proceso y la mejor respuesta obtenida fueron las siguientes

Variables consideradas/ Niveles.	Bajo	Alto
X1: Tiempo de inoculación;	6 horas.	10 horas.
X2: Tipo de pretratamiento,	A	B
X3: Carga Enzimática, UPF	10 UPF	30 UPF
X4: Sólidos,	13 %	16 %
Tiempo de HSS en la PRESAC	24 Horas	24 Horas

Variables/ Niveles	Bajo	Alto
X1: Tipo de pretratamiento	A	B
X2: Carga Enzimática	10 UPF	30 UPF
Sólidos;	10 %	10 %
Tiempo total de HSS	24 Horas	24 Horas

De los resultados del experimento se obtuvo una expresión del efecto de las variables en la concentración de etanol obtenida en la fermentación encontrándose solo significativa la influencia de la carga enzimática (X2), y no la del tipo de pretratamiento, para lo cual el valor máximo factible de respuesta del sistema fue determinado.

Siendo, Y (Etanol, g/l) = $26.14 + 0.87X2$

Valor Máximos posibles de obtener: 27,01 g/l; 5,79 Kg_{bagazo}/l, los que como se observa aun cuando se utiliza una carga enzimática máxima son inferiores a los obtenidos en la sacarificación y fermentación separadas, por lo que los efectos inhibitorios pueden estar presente en la actividad de la celulasa o la relativa disminución de tiempos empleado para ambas operaciones es de 48 horas a 24 horas perjudicaron los resultados, aspectos en los que habrá que profundizar.

2.3.3. Estudios de la etapa fermentativa. Plan experimental 2⁴⁻¹ para la PreSacarificación y Fermentación.

Una alternativa que se ha desarrollado es permitir la hidrólisis enzimática por separado de la fermentación por un número de horas con el fin de lograr una sacarificación efectiva, al evitar la temprana inhibición alcohólica de la celulasa, a estos efectos es necesario estudiar cual es el tiempo en el cual debe permitirse la hidrólisis por separado y a partir del cual debe procederse al proceso de sacarificación y fermentación simultánea de 24 horas, a estos efectos se realizó el estudio mediante un diseño factorial parcial del tipo 2⁴⁻¹ Las condiciones experimentales, el modelo obtenido del comportamiento del proceso y la mejor respuesta obtenida fueron las siguientes

De los resultados del experimento se obtuvo una expresión del efecto de las variables en la concentración de etanol obtenida en la fermentación, para lo cual el valor máximo factible de respuesta del sistema fue determinado.

Siendo Y (Etanol, g/litro) =
 $27.44 + 0.97X1 + 0.81X2 + 2.28X3 + 2.71X4 - 0.57X1X3 + 0.68 X1X4$

Valor Máximo posible obtenido:

$33,64 \text{ g/l. } 5,29 \text{ Kg}_{\text{bagazo}}/\text{l}$

Los resultados aquí obtenidos pueden estar influidos por trabajar en un mayor por ciento de sólidos, entre 13 y 16 %, y también desde luego el efecto de la hidrólisis independiente, que muestra su importancia al encontrarse significativa la diferencia entre 6 y 10 horas, lo que puede ser especialmente significativo en lo referente al requerimiento de bagazo por litro de etanol.

2.3.4. Resumen comparativo:

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos en cada uno de los diferentes tipos de combinación de sacarificación y fermentación simultánea, es significativo que el procedimiento de sacarificación y fermentación simultánea, aunque tiene con referencia a la sacarificación y fermentación separada, mejores resultados en la concentración de etanol después de la fermentación, lo que permite ahorros energéticos en la etapa de separación del etanol, agota menos las posibilidades de obtener etanol del bagazo, lo que puede explicarse por un efecto inhibitorio de las celulasas por el etanol, lo que es reiterado por los mejores valores obtenidos en la PRESAC del aprovechamiento del bagazo.

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos en los diferentes tipos de sacarificación y fermentación simultanea.

Tipo de Sacarificación y Fermentación	Concentración de etanol obtenida posible.	Bagazo requerido para obtener un litro de etanol, posible.
Separada	23,27	5,06 Kg _{bagazo} /l
Simultanea	27,01 g/l.	5,79 Kg _{bagazo} /l
PRESAC	35,4 g/l.	5,29 Kg _{bagazo} /l

Por otro lado las mejores concentraciones de gramos etanol por litro encontradas para la SSF y la PRESAC pueden estar influidas por trabajar también a mayores valores de carga enzimática en ambos caso en relación con el caso de la sacarificación y fermentación separada y por cientos de sólido en una alternativa del PRESAC. No obstante los resultados obtenidos en la PRESAC en lo referente a ser favorable más altos tiempos para la inoculación de las levaduras, indican que debe profundizarse en este proceso.

III. Conclusiones

- 1.El proceso de hidrólisis enzimática para los productos celuligniticos resultado de los retratamientos en dos etapas, una acida, destinada a la separación del xilano, y otra básica, fundamentalmente destinada a la separación de la lignina, está influido positivamente, por el incremento de la adición de tensoactivos, de xilanasas y celulasas tanto para bagazos tratados a baja temperatura, para recuperar y utilizar la xilosa en procesos fermentativos, o la tratada a más alta temperatura para emplear la xilosa en la producción de furfural.
- 2.Los modelos obtenidos predicen con buena exactitud las mejores condiciones de conducción del proceso, aunque como era de esperar reflejan que el impacto de la concentración de sólidos mientras que favorece la concentración de glucosa no permite el mejor resultado en lo referente a los azúcares obtenidos en la hidrólisis enzimática por peso de materia prima.
- 3.Los resultados tanto de concentración de glucosa como de gramos de glucosa por 100 gramos de bagazo, alcanzan valores aceptables entre las 16 y 17 horas de hidrólisis por lo que es aconsejable estudiar con los diferentes sistemas fermentativos disponibles trabajar para disminuir los tiempos

dedicados a la hidrólisis en menos de 24 horas.
 4.El comportamiento de las diferentes alternativas de sacarificación y fermentación indica ventajas en los resultados de la sacarificación y fermentación por separado en lo referente al agotamiento del bagazo, sin embargo si se analiza comparativamente los resultados de la FSS con la PRESAC se concluye que se pueden explorar condiciones óptimas de compromiso.

IV. Bibliografía

- 1.Box, G. P. A., J.S. Hunter, "The 2k^p fraccional, Factorial Designs". Technometrics, 3 (3): 333, 1961.
- 2.Davies, R.A. Parameter Estimation for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Food Waste Into Ethanol Using Matlab Simulink. Appl Biochem Biotechnol (2008) 147:11–21
- 3.González Suárez, E, L. Mesa Garriga, K. Ojeda, V. Kafarov, M. González Cortes, Y Catá Salgado, M. Lopretti. Posibilidades de producción de bioetanol utilizando de forma paralela sustratos azucarados y residuos lignocelulósicos. En "Posibilidades prospectivas de producción de bioetanol aprovechando integralmente los residuos Agroindustriales sin agredir el medio ambiente", Ciudad de la Habana, 2006.ISBN:959-7136-44-9
- 4.González Suárez, E., M. Morales Zamora, L. Mesa Garriga, D. Acosta Martínez, E. Castro Galiano, Posibilidades de la inclusión del etanol de lignocelulósico en la reconversión de una instalación de la industria de la caña de azúcar II Taller Nacional de etanol de Residuos lignocelulosicos, Ciudad de la Habana, Cuba, 2009.
- 5.Mesa, L.; E. González: Aplicación del método de Plackett Burman al estudio preliminar de las posibilidades del pretratamiento organosolv en la

- bioconversion de bagazo de caña de azúcar a etanol, I Taller Nacional de etanol de Residuos lignocelulosicos, Ciudad de la Habana, Cuba, 2008.
- 6.Mesa, L.; E. González, Evaluación Preliminar del Pretratamiento Organosolv del Bagazo de la Caña de Azúcar para la Obtención de Azúcares Fermentables con vistas a la producción de Etanol. 5to. Taller Internacional de Energía y Medio Ambiente. Cienfuegos, Cuba, 2008
- 7.Mesa, L, González, E, Albernas Y, González M. Díaz M, Castro E Economic Evaluation of Pretreatment Alternatives for Ethanol Production from Sugar Cane Bagasse, Hamburg, 2009.
- 8.Mesa, L, González, E, Albernas Y, González M. Cara, C., Castro E. Técnico - Economic Evaluation of Alternatives for Assimilation of Ethanol Production Technology from Sugar Cane Bagasse, Croacia, 2009.
- 9.Mesa, L.; González, E. Propuesta de condiciones más favorables en el pretratamiento en dos etapas ácido-base del bagazo de Caña de azúcar para etanol, Centroazucar, en revisión, 2009.
- 10.Octave Stéphane; Daniel Thomas: Biorefinery: Toward and Industrial metabolism. *Biochimie*. 91(2009).659-664).
- 11.Pan, X; Cludio Arato; Neil Gilkes; David Greg; Warren Mabee; Kendall Pye, Zhizhuang Xiao Zhang; Johan Saddler. Biorefining of Softwoods Using Ethanol Organosolv Pulping: Preliminary Evaluation of Process Streams for Manufacture of Fuel-Grade Ethanol and Co-Products. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 90, Nro 4, May 20, 2005.
- 12.Peñuela Vásquez, Mariana Juliana Nascimento C. Da Silva, Mauricio Bezerra de Souza Jr., and Nei Pereira Jr. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 136-140, 2007 141-153.200.
- 13.Prvan, T. Deborah J. Street. An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs. *Journal of Statistical Planning and inference*. 106 (2002)24-269.
- 14.Sassner, Per, Mats Galbe, Guido Zacchi: Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 32 (2008) 422-430).
- 15.Vealderez Ponte Rocha, M.. Tigressa Helena Soares Rodrigues, Gorete Ribeiro de Mancedo, Luciana R. B. Gongalves. Enzymatic Hydrolysis and fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Alkali and Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production. *Biochem Biotechnol* (2009) 155:407-417.
- 16.Wu, Z., Lee, Y.Y., 1997. Inhibition of enzymatic of cellulose by ethanol. *Biotech. Lett.* 19. 977-979.
- 17.Yang, Bin, Wymann, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Society of chemical Industry and John Wiley & Sons, Ltd/ Biofuels, bioproduct. Bioref.* 2:26-4. 2007.