

**Artículo Original**

**PRETRATAMIENTO EN DOS ETAPAS DEL BAGAZO DE CAÑA  
PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR  
DE XILOSA Y GLUCOSA**

**TWO-STAGE PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE FOR ETHANOL  
PRODUCTION FROM XYLOSE AND GLUCOSE**

Leyanis Mesa Garriga<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4449-5239>  
Erenio González Suárez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5741-8959>  
Yaillet Albernas Carvajal<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4363-4401>

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, Departamento de Bioproductos, Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Recibido: Septiembre 24, 2024; Revisado: Octubre 2, 2024; Aceptado: Octubre 8, 2024

**RESUMEN**

**Introducción:**

El bagazo de caña de azúcar es utilizado para la producción de bioetanol debido a su alto contenido de celulosa y hemicelulosa. El pretratamiento es necesario para hacer accesibles los carbohidratos a las enzimas. Una vía para aumentar el rendimiento de etanol es utilizar todos los azúcares contenidos.

**Objetivo:**

Evaluar la producción de etanol a partir de la xilosa y glucosa obtenidas tras un pretratamiento en dos etapas.

**Materiales y Métodos:**

En la primera etapa de pretratamiento se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1,25 % a 120 °C durante 40 minutos. Esta produjo un hidrolizado rico en xilosa que se fermentó con *Pichia stipitis*. La segunda etapa se realizó utilizando una mezcla de etanol al 30 % (v/v) e hidróxido de sodio en diferentes concentraciones. La digestibilidad enzimática de los sólidos fue



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

\* Autor para la correspondencia: Leyanis Mesa, Email: [leyanis.mesa@gmail.com](mailto:leyanis.mesa@gmail.com)



evaluada con celulasa y se realizó una hidrólisis y fermentación simultánea con *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Resultados y Discusión:**

El rendimiento de la fermentación del hidrolizado rico en xilosa fue 19 % con respecto a los azúcares iniciales. El pretratamiento alcalino redujo la lignina en un 53 %, mejorando la digestibilidad enzimática. Las mejores condiciones experimentales arrojaron un rendimiento de 39,17 g de azúcares por cada 100 g de bagazo y un rendimiento de etanol de 8,14 g/100 g de bagazo.

### **Conclusiones:**

El pretratamiento en dos etapas incrementa la recuperación de azúcares en un 25,12 %. La producción de etanol aumenta un 15,13 % utilizando todos los azúcares obtenidos del pretratamiento y la hidrólisis enzimática del bagazo.

**Palabras clave:** bagazo de caña; etanol; pretratamiento Organosolv; xilosa.

## **ABSTRACT**

### **Introduction:**

Sugarcane bagasse is used for bioethanol production due to its high cellulose and hemicellulose content. Pretreatment is necessary to make carbohydrates accessible to enzymes. One way to increase ethanol yield is to utilize all the sugars contained within it.

### **Objective:**

To evaluate ethanol production from xylose and glucose obtained through a two-stage pretreatment.

### **Materials and Methods:**

In the first pretreatment step, 1.25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used at 120 °C for 40 minutes, producing a hydrolysate rich in xylose that was fermented with *Pichia stipitis*. The second stage was performed using a 30 % (v/v) ethanol mixture and sodium hydroxide at different concentrations. The enzymatic digestibility of the solids was evaluated with cellulase, and simultaneous hydrolysis and fermentation was carried out with *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Results and Discussion:**

The fermentation yield of the hydrolysate rich in xylose was 19 % with respect to the initial sugars. The alkaline pretreatment reduced lignin by 53 %, improving enzymatic digestibility. The best experimental conditions yielded 39.17 g of sugars per 100 g of bagasse and an ethanol yield of 8.14 g/100 g of bagasse.

### **Conclusions:**

Two-stage pretreatment increases sugar recovery by 25.12 %. Ethanol production rises by 15.13 % using all sugars obtained from pretreatment and enzymatic hydrolysis of bagasse.

**Keywords:** sugarcane bagasse; ethanol; Organosolv pretreatment; xylose.

---

## **1. INTRODUCCIÓN**

La biomasa lignocelulósica se posiciona actualmente como una de las fuentes alternativas más prometedoras de energía a partir de fuentes renovables y de productos químicos, debido a su composición química que la convierten en un sustrato de alto valor biotecnológico (Ashokkumar y col., 2022). Un ejemplo destacado de este tipo de biomasa es el bagazo de caña de azúcar, un residuo agroindustrial abundante en países tropicales y con gran potencial para ser usado en otras aplicaciones como furfural, tableros, biosurfactantes, xilitol, materiales poliméricos (Ajala y col., 2021), además de la ya tradicional generación de energía (Singh y col., 2022). La caña de azúcar ha sido uno de los pilares económicos de Cuba, tanto por la producción histórica de azúcar como por la diversidad de productos derivados de su procesamiento (Jonker y col., 2015).

El bagazo de caña se caracteriza por su elevado contenido de carbohidratos estructurales, principalmente celulosa y hemicelulosa, lo que lo convierte en un sustrato atractivo para la producción de bioetanol sin aumentar el uso de tierras cultivables (Liu y col., 2019). La fermentación para la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos es una tecnología factible. Sin embargo, la estructura recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, compuesta por tres componentes principales, dificulta la hidrólisis y limita la fermentación posterior. Por ello, es adecuado realizar pretratamientos para alterar esta estructura compacta, eliminando hemicelulosa y lignina, y aumentando la superficie accesible de la celulosa para las enzimas (Antunes y col., 2019).

El pretratamiento con ácido diluido en una sola etapa ha demostrado ser efectivo para recuperar xilosa del bagazo de caña (Mesa y col., 2014). Sin embargo, las condiciones de pretratamiento para maximizar la recuperación de cada fracción han limitado el rendimiento total de azúcares. La recuperación de azúcares en este proceso depende principalmente de la temperatura aplicada durante el pretratamiento, ya que la degradación de xilosa es más frecuente a temperaturas elevadas (Gurgel y col., 2012). La reducción en el contenido de xilanos del bagazo durante el pretratamiento mejora la digestibilidad y la recuperación de glucosa en los sólidos residuales, pero estos valores de rendimiento pueden ser aumentados aplicando una segunda etapa de pretratamiento en la cual parte de la lignina sea separada de la celulosa. En este sentido, han sido desarrollados diversos métodos de pretratamiento, entre ellos el Organosolv con etanol, que ha ganado atención por su bajo impacto ambiental, capacidad de reciclaje y baja toxicidad, además de liberar lignina de alta pureza y facilitar la digestión enzimática. Las condiciones alcalinas del pretratamiento Organosolv han demostrado buenos resultados en términos de menor producción de inhibidores, mayor conservación de celulosa y hemicelulosa, y mayor separación de lignina (Mesa y col., 2016a).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la producción de etanol a partir de la xilosa y glucosa obtenidas tras un pretratamiento en dos etapas.

---

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materias primas

El bagazo de caña de azúcar fue recolectado del complejo agroindustrial “Amancio Rodríguez”, en la provincia de Las Tunas, Cuba.

#### 2.1.1 Caracterización del bagazo natural

El bagazo de caña se secó a 35 °C y luego se molió hasta obtener partículas de 1 mm. La humedad se determinó gravimétricamente secando dos gramos de muestra a 135 °C durante dos horas, y el contenido de cenizas se calculó tras incinerar la muestra a 550 °C. Se obtuvieron extractos acuosos y etanólicos utilizando un equipo Soxhlet con 200 mL de agua o etanol, respectivamente, para extraer la muestra durante 24 horas. La caracterización de la biomasa incluyó la determinación de azúcares, lignina y cenizas insolubles mediante hidrólisis ácida, seguido de filtración y análisis de azúcares mediante HPLC (Sluiter y col., 2008).

### 2.2. Pretratamiento

El bagazo de caña se sometió a dos etapas de pretratamiento físico-químico. En la primera etapa, a 20 g de bagazo (en seco) se aplicaron condiciones previamente estudiadas: 120 °C, 1,25 % (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 minutos de reacción y una relación sólido-líquido de 1/7 (Mesa y col., 2014). En la segunda etapa, se utilizó un diseño experimental factorial completo 2<sup>3</sup> basado en estudios previos (Mesa y col., 2016a), empleando una mezcla de etanol al 30 % (v/v) e hidróxido de sodio en diferentes concentraciones para optimizar la deslignificación. Ambos pretratamientos se realizaron en un reactor BERGHOF de 2 L de capacidad. El diseño de experimentos utilizado en la segunda etapa de pretratamiento se muestra en la tabla 1. Para todos los experimentos se mantiene constante la relación sólido-líquido y la concentración de etanol (90 %) al 30 % v/v y, se varía la temperatura, la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo de reacción.

**Tabla 1.** Matriz experimental de diseño factorial completo 2<sup>3</sup> usada en la segunda etapa del pretratamiento del bagazo de la caña de azúcar

<i>Experimentos</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>NaOH (%)</i>
1	- (175 °C)	- (30 min)	+ (12%)
2	+ (195 °C)	+ (60 min)	- (7%)
3	- (175 °C)	- (30 min)	- (7%)
4	+ (195 °C)	+ (60 min)	+ (12%)
5	+ (195 °C)	- (30 min)	+ (12%)
6	- (175 °C)	+ (60 min)	- (7%)
7	+ (195 °C)	- (30 min)	- (7%)
8	- (175 °C)	+ (60 min)	+ (12%)

### 2.3. Hidrólisis enzimática

Todas las muestras obtenidas de la segunda etapa de pretratamiento utilizando el diseño experimental fueron sometidas a hidrólisis enzimática para evaluar la digestibilidad

enzimática del sólido pretratado antes de la fermentación. Se utilizó un 5% de sólido pretratado en 10 mL de solución buffer de pH 4,8, con una concentración enzimática de 25 UPF/g de sustrato, empleando las enzimas Cellic CTec2 y  $\beta$ -glucosidasa. Los experimentos se realizaron a 50 °C y 150 rpm durante 24 horas, y los azúcares reductores totales (ART) liberados se determinaron mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Pérez, 2013). El rendimiento de ART fue calculado siguiendo la ecuación 1.

$$\text{Rendimiento} \left( \frac{\text{g}}{100} \text{ g MP} \right) = C_{\text{ART}} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \times \frac{V(L)}{\text{MP}(g)} \times 100 \quad (1)$$

donde C es la concentración de azúcares (xilosa) en la fracción líquida, V es el volumen de la fracción líquida y MP es la materia prima inicial.

#### **2.4. Procesos fermentativos**

El licor producto de la primera etapa de pretratamiento se fermenta con la levadura *Pichia stipitis*. Este licor se considera rico en azúcares procedentes de la fracción hemicelulósica, es decir, azúcares de cinco átomos, principalmente por xilosa (Morales-Zamora y col., 2012).

Para la hidrólisis y fermentación simultáneas se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ya que la mayor proporción de azúcar obtenida de esta etapa es la glucosa.

##### **2.4.1. Preparación de los inóculos de *P. stipitis* y *S. cerevisiae* para la fermentación del licor hidrolizado de la primera etapa de pretratamiento y la HFS, respectivamente**

La cepa de levadura utilizada para la fermentación alcohólica del hidrolizado de la primera etapa de pretratamiento fue *Pichia stipitis* de la Colección de Cultivos DER CIEMAT (España). El inóculo se cultivó transfiriendo un criovial de células en matraces Erlenmeyer de 100 ml que contenían 25 ml de medio sintético esterilizado compuesto de (g/L) xilosa (30,0), extracto de levadura (5,0), cloruro de amonio (0,2), hidrógeno fosfato de potasio (0,1) y sulfato de magnesio heptahidratado (0,3). A continuación, las células se incubaron en un agitador rotatorio a 30 °C y 150 rpm durante 12 h.

*Saccharomyces cerevisiae* comercial fue la levadura utilizada para la fermentación etanólica de la fracción sólida obtenida después de la segunda etapa de pretratamiento. Para la preparación del inóculo, las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 25 mL de un medio semejante al anterior pero la fuente de azúcar fue la glucosa a 30 g/L. Los experimentos con el inóculo se incubaron en un agitador rotatorio a 30 °C, 150 rpm durante 16 h.

##### **2.4.2. Fermentación del licor hidrolizado**

Para la fermentación, se esterilizaron 25 mL de licor neutralizado con hidróxido de calcio en tres frascos, se añadió 1 mL del prefermento y los mismos componentes del medio de cultivo para la obtención del inóculo excepto la xilosa, se agitó a 150 rpm, 30 °C, durante 48 horas. La concentración de etanol se determinó por cromatografía gaseosa (Pérez, 2013). El hidróxido de calcio fue añadido lentamente y con agitación constante hasta alcanzar pH 5. El rendimiento de azúcares se calculó de acuerdo con la ecuación 1.

### 2.4.3. Hidrólisis y fermentación simultáneas (HFS)

El sólido obtenido luego de la segunda etapa de pretratamiento con la mayor digestibilidad fue sometido a un proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas (HFS). Las condiciones de la HFS fueron 45 °C, agitación a 150 rpm, durante 48 horas, utilizando un 10 % de bagazo pretratado en un volumen total de 25 mL en un Erlenmeyer de 100 mL. Las actividades enzimáticas utilizadas fueron las mismas del epígrafe 2.3. En la fermentación se utilizó un 10 % (v/v) del inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Mesa y col., 2016b) y se adicionaron los mismos componentes y concentraciones del medio de cultivo para la preparación del inóculo excepto la glucosa. La concentración de etanol fue determinada por cromatografía gaseosa (Pérez, 2013).

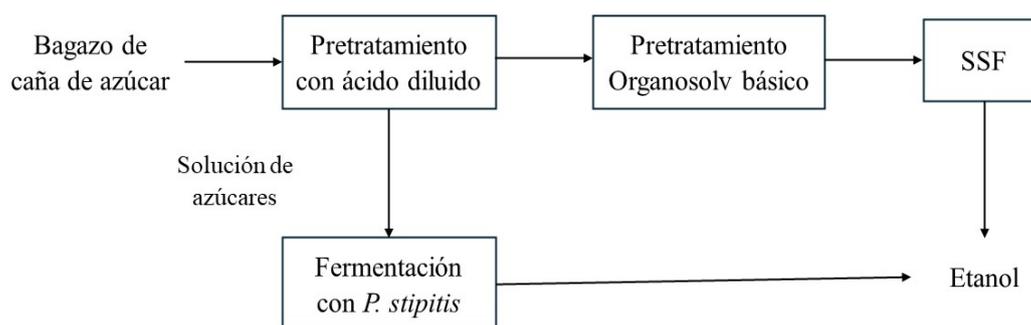
## 2.5. Métodos analíticos

### 2.5.1. Determinación de la concentración de azúcares en los licores obtenidos en la primera etapa de pretratamientos

La concentración de azúcares fue determinada en los licores obtenidos en la primera etapa del pretratamiento. Luego el pH de los licores de 1,45 en promedio, fue necesario llevarlo a pH 5 con hidróxido de calcio, para la posterior fermentación, y se volvió a medir la concentración de azúcares reductores tras este proceso. La concentración de azúcares se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un dispositivo equipado con un detector de índice de refracción y una columna Aminex-HPX 87H a 65 °C. Como eluyente se utilizó una solución acuosa de 4 mM $H_2SO_4$  a un caudal de 0,6 mL/min.

### 2.5.2. Determinación de la concentración de azúcares después de la hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados

La concentración de ART en las etapas de hidrólisis enzimática se determinó usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Pérez, 2013). La figura 1 muestra el esquema de proceso usado en el trabajo.



**Figura 1.** Esquema del proceso para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña  
Fuente: elaboración propia

### 2.5.3. Determinación de la concentración de etanol

La concentración de etanol se determinó usando cromatografía gaseosa utilizando un dispositivo Agilent equipado con un detector de ionización por llama y una columna DB-ALC2 e hidrógeno como gas portador (Pérez, 2013).

## 2.6. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables concentración de NaOH, tiempo y temperatura en la segunda etapa del pretratamiento Organosolv, fue usado un diseño factorial completo del tipo  $2^3$ . Estos experimentos se realizaron por duplicado y en orden aleatorio. La concentración de ART (g/L) y el rendimiento (gramos de ART por 100 g de materia prima inicial) (ecuación 1) se tomaron como respuestas de estos experimentos. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Protimiza (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>). La matriz experimental se muestra en la tabla 1 junto con los valores reales de las variables a evaluar.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Pretratamiento hidrólisis ácida diluida del bagazo de caña de azúcar

La composición del bagazo fue: Celulosa 49,03 %, Hemicelulosa 15,84 %, Lignina 27,22 %, Cenizas ácido insoluble 3,64 %, Extractivos 5,58 %.

La condición de la hidrólisis ácida diluida aplicada en este trabajo separa la hemicelulosa del bagazo de caña y produce licores ricos en xilosa (Mesa y col., 2014). Estos hidrolizados también contienen cantidades de furfural, hidroximetil furfural, ácido acético entre otros compuestos que resultan ser inhibitorios de las levaduras en la fermentación (Silva y col., 2016). Las concentraciones de furfural estuvieron en el orden de 1 g/L y esta concentración es inhibitoria para el buen desempeño de las levaduras en la fermentación (Mesa y col., 2014).

El contenido de xilosa obtenido tras la aplicación del pretratamiento con ácido diluido al bagazo fue de 19 g/L y el de glucosa fue de 4 g/L. La concentración de xilosa es mayor que la de glucosa, lo que indica mayor susceptibilidad de la hemicelulosa al tratamiento ácido (Mesa y col., 2016b). El pH del hidrolizado obtenido fue de 1,45 en promedio, por lo que fue necesario elevarlo hasta aproximadamente 5 que es el pH de trabajo de la levadura *P. stipitis*. Tras este proceso, la concentración de azúcares volvió a ser medida y se verificó que disminuye un 38 % la concentración total de azúcares, terminando en 14,26 g/L, siendo 12,36 g/L de xilosa y 1,9 g/L de glucosa. Con la aplicación del hidróxido de calcio se ajusta el pH y también puede disminuir la presencia de inhibidores en el hidrolizado, pero conlleva a pérdidas de azúcares de acuerdo con algunos reportes (Vallejos y col., 2016).

La fermentación con *P. stipitis* produjo 2,8 g/L de etanol tras 48 horas. El resultado es más bajo que el esperado, siendo un 19% de rendimiento con respecto a los azúcares iniciales. Este bajo rendimiento puede deberse a varios factores como: presencia aún de inhibidores que afectan la fermentación de la levadura, que las condiciones de tamaño de inóculo y composición del medio de cultivo no fueron las más adecuadas, también el desvío del metabolismo de la levadura hacia la producción de xilitol en vez de etanol (Bhavana y col., 2024). En este caso, se sugiere optimizar la etapa de detoxificación del hidrolizado o utilizar otros métodos de detoxificación, aplicar una etapa de adaptación de la levadura a los inhibidores para mejorar el rendimiento, lo que abre nuevas perspectivas para su aplicación industrial, dado el potencial de *P. stipitis* de alcanzar rendimientos de etanol superiores.

El sólido resultante de esta primera etapa de pretratamiento contiene un 23,15 % de lignina. Debido al elevado porcentaje, se aplica una segunda etapa de pretratamiento

---

dirigida a lograr una reducción en el contenido de lignina y así mayor digestibilidad enzimática.

### 3.2. Segunda etapa de pretratamiento

En esta etapa, el sólido es tratado para reducir el contenido de lignina y aumentar la cantidad de azúcares reductores totales luego de la evaluación de la hidrólisis enzimática. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos de la concentración de ART y el rendimiento después de la hidrólisis enzimática.

**Tabla 2.** Concentración de ART (g/L) y rendimiento de ART/100 g de bagazo inicial después de la hidrólisis enzimática

<i>Variables</i>				<i>Parámetros respuesta</i>	
<i>Experimentos</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>NaOH (%)</i>	<i>Concentración de ART (g/L)</i>	<i>g de ART/100g de MP</i>
1	-	-	+	9,57	8,92
2	+	+	-	29,73	30,01
3	-	-	-	7,04	7,89
4	+	+	+	35,79	33,11
5	+	-	+	42,49	39,17
6	-	+	-	7,22	7,52
7	+	-	-	8,69	8,71
8	-	+	+	11,39	10,49

Como se observa en la tabla 2, los mayores valores de concentración de ART son los obtenidos en el experimento 5. Esta condición usa los niveles superiores de temperatura y concentración de NaOH, correspondiendo a la menor concentración de lignina (datos de concentración de lignina no mostrados) presente en el material pretratado con un 12,78 %, lo que significa una reducción del 53 % con respecto a la lignina contenida en el bagazo. El pretratamiento Organosolv con NaOH incrementa la deslignificación del material lignocelulósico y tiene como ventaja la reducción en la generación de inhibidores de la fermentación (Niju y Swathika, 2019).

En la hidrólisis enzimática realizada a los sólidos pretratados en condiciones alcalinas, el experimento 5 mostró los mejores resultados, con una concentración de azúcares reductores totales de 42,49 g/L y un rendimiento de 39,17 g de azúcares por cada 100 gramos de materia prima inicial. Estos resultados indican que el sólido obtenido en dicho experimento presentó una alta digestibilidad enzimática. Los resultados obtenidos en este trabajo son superiores a trabajos del mismo equipo investigador usando el pretratamiento en dos etapas (Mesa y col., 2016b) en el cual se usaron concentraciones más bajas de NaOH el pretratamiento Organosolv (175°C, 3 % (m/v) de NaOH, 30 % etanol (v/v)).

#### 3.2.1. Análisis de las variables estudiadas

El análisis estadístico para los dos parámetros respuestas analizados reveló que la temperatura y la concentración de NaOH son las variables que fueron significativas

sobre ambos parámetros respuestas. La tabla 3 muestra el análisis de regresión de las variables estudiadas con los parámetros respuestas.

**Tabla 3.** Análisis de regresión del experimento

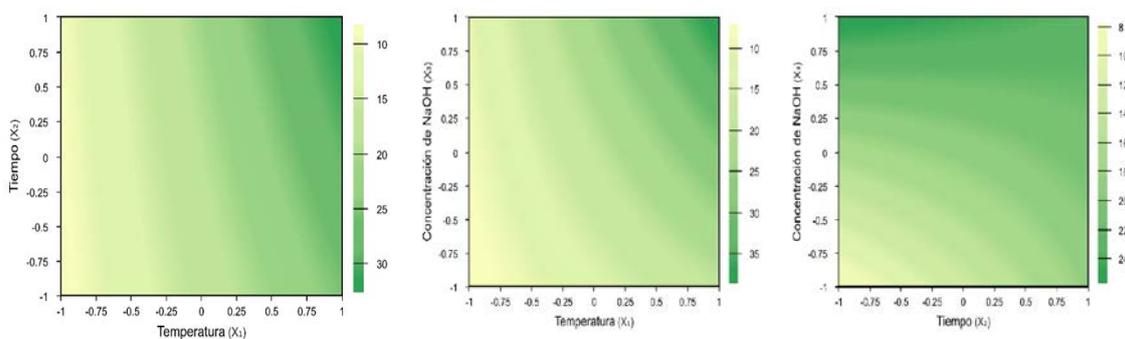
<i>Variables</i>	<i>Concentración de ART (g/L)</i>				<i>Rendimiento de ART/100 gMP</i>			
	<i>Coficiente</i>	<i>Error Standard</i>	<i>t-calc</i>	<i>p-value</i>	<i>Coficiente</i>	<i>Error Standard</i>	<i>t-calc</i>	<i>p-value</i>
Media	18,88	1,23	15,39	0,0000	18,27	1,20	15,23	0,0000
X <sub>1</sub>	10,12	1,23	8,25	0,000	9,56	1,20	7,97	0,0000
X <sub>2</sub>	2,07	1,23	1,68	0,129	2,12	1,20	1,77	0,1110
X <sub>3</sub>	5,67	1,23	4,62	0,0013	4,75	1,20	3,96	0,0033
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1,57	1,23	1,28	0,2316	1,81	1,20	1,51	0,1649
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	4,05	1,23	3,30	0,0092	3,74	1,20	3,12	0,0124
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-3,25	1,23	-2,65	0,0265	-3,10	1,20	-2,59	0,0294
R <sup>2</sup>	92,55				91,82			

Como se puede apreciar en la tabla 3, las variables significativas (p-value menores que 0,05) fueron la temperatura (X<sub>1</sub>) y la concentración de NaOH (X<sub>3</sub>). A temperaturas superiores a 180 °C, se produce una solubilización exotérmica que abre la estructura de la biomasa, disociando el complejo celulosa-lignina y aumentando el área superficial de la celulosa, lo que facilita la hidrólisis de los enlaces β-glucosídicos. El uso de NaOH se asocia más con la solubilización de la lignina (Manfredi y col., 2016). De acuerdo con las ecuaciones 2 y 3, ambas variables significativas fueron positivas para los dos parámetros estudiados, es decir, a medida que la temperatura y la concentración de NaOH se incrementan, en el intervalo estudiado, la concentración y rendimiento de azúcares aumenta. Este comportamiento coincide con lo reportado por otros autores (Zhang y col., 2020). El tiempo (X<sub>2</sub>) no resultó significativo, no obstante, su interacción con la concentración de NaOH si fue significativa y con signo negativo, indicando que cuando la concentración de NaOH (X<sub>3</sub>) está en su nivel superior, el tiempo debe encontrarse en el límite inferior, es decir, que el pretratamiento se lleve en el menor tiempo evaluado.

$$Y_1 = 18,88 + 10,12X_1 + 2,07X_2 + 5,67X_3 + 1,57X_1X_2 + 4,05X_1X_3 - 3,25X_2X_3 \quad (2)$$

$$Y_2 = 18,27 + 9,56X_1 + 2,12X_2 + 4,75X_3 + 1,81X_1X_2 + 3,74X_1X_3 - 3,10X_2X_3 \quad (3)$$

La figura 2 muestra las superficies de respuesta de cada combinación de variables para la concentración de ART. El comportamiento del rendimiento es similar.



**Figura 2.** Superficie de respuesta de cada combinación de las variables con la concentración de ART

### 3.3. Hidrólisis y fermentación simultáneas (HFS)

Para realizar la evaluación de la hidrólisis y fermentación simultánea se escogió la condición del experimento 5 (ver tabla 2). Este sólido pretratado presentó la mayor concentración de azúcares, y en este trabajo se busca maximizar la obtención de etanol y con este sólido se realizó la HFS. El proceso fue seguido durante 48 horas y al final de este tiempo se obtuvo una concentración de etanol de 15,7 g/L representando un rendimiento de etanol de 8,14 g de etanol por cada 100 gramos de bagazo natural. El rendimiento de etanol fue de 72,4 % con respecto al rendimiento teórico de etanol (0,51 g de etanol por gramo de glucosa). En la literatura se reportan resultados superiores usando otras configuraciones de proceso como una etapa de presacarificación antes de la HFS, también se evalúan procesos fed-batch (Wanderley y col., 2013), elementos que se tendrán en cuenta en evaluaciones futuras.

## 4. CONCLUSIONES

1. El uso de los niveles superiores de temperatura y concentración de NaOH durante el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar incrementa significativamente la accesibilidad de la celulosa, lo que resulta en una mayor liberación de azúcares reductores.
2. La producción de etanol con *Pichia stipitis* utilizando los azúcares del hidrolizado obtenido en la primera etapa de pretratamiento aumentó un 15,3% en comparación con el uso solamente de la fracción sólida tras la segunda etapa de pretratamiento, mediante hidrólisis y fermentación simultánea (HFS) con *Saccharomyces cerevisiae*.

## REFERENCIAS

- Ajala, E.O., Ighalo, F.O., Ajala, M.A., Adeniyi, A.G., & Ayanshola, A.M., Sugarcane bagasse: a biomass sufficiently applied for improving global energy, environment and economic sustainability., *Bioresources and Bioprocessing*, Vol. 8, No. 87, 2021, pp. 1-25. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00440-z>
- Antunes, F.A.F., Chandel, A.K., Terán-Hilares, R., Ingle, A.P., Rai, M., dos Santos Milessi, T.S., da Silva, S.S., & dos Santos, J.C., Overcoming challenges in lignocellulosic biomass pretreatment for second-generation (2G) sugar production:

- emerging role of nano, biotechnological and promising approaches., 3 Biotech, Vol. 9, No. 6, 2019, pp. 230-247. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1761-1>
- Ashokkumar, V., Venkatkarthick, R., Jayashree, S., Chuetor, S., Dharmaraj, S., Kumar, G., Chen, W.H., & Ngamcharussrivichai, Ch. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review., Bioresource Technology, Vol. 344, Part B, 2022, pp. 126195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>
- Bhavana, B.K., Mudliar, S.N., & Debnath, V.V.B.S. Effect of furfural, acetic acid and 5 - hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497., Biomass Conversion and Biorefinery, Vol. 14, 2024, pp. 4909–4923. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02758-w>
- <https://experimental-design.protimiza.com.br/>., Protimiza Experimental Design, Brazil, 2014.
- Morales-Zamora, M., Espino-Leal, I., Mesa-Garriga, L., Acosta-Martínez, D., González-Suárez, E., y Castro-Galiano, E., Evaluación de residuales de la hidrólisis ácida del bagazo como productos de alto valor añadido., Afinidad, Vol. LXVIII, No., 556, 2012, pp. 453-458. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/268154>
- Gurgel, L.V.A., Marabezi, K., Zambom, M.D., & Curvelo, A.A.D.S., Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at high temperatures: A Kinetic study of cellulose saccharification and glucose decomposition. Part I: Sulfuric acid as the catalyst., Industrial and Engineering Chemistry Research, Vol. 51, No. 3, 2012, pp. 1173–1185. <https://doi.org/10.1021/ie2025739>
- Jonker, J.G.G., van der Hilst, F., Junginger, H.M., Cavalett, O., Chagas, M.F., & Faaij, A.P.C., Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies., Applied Energy, Vol. 147, 2015, pp. 593–610. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.090>
- Liu, C.G., Xiao, Y., Xia, X.X., Zhao, X.Q., Peng, L., Srinophakun, P., & Bai, F.W., Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions., Biotechnology Advances, Vol. 37, No. 3, 2019, pp. 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.002>
- Manfredi, A.P., Ballesteros, I., Sáez, F., Perotti, N.I., Martínez, M.A., & Negro, M.J., Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol., Bioresource Technology, Vol. 260, 2016, pp. 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.114>
- Mesa, L., Morales, M., González, E., Cara, C., Romero, I., Castro, E., & Mussatto, S.I., Restructuring the processes for furfural and xylose production from sugarcane bagasse in a biorefinery concept for ethanol production., Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, Vol. 85, 2014, pp. 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2014.07.012>
- Mesa, L., Albernas, Y., Morales, M., Corsano, G., & González, E., Integration of Organosolv Process for Biomass Pretreatment in a Biorefinery., Chapter 11, In Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery, 2016a, pp. 229–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00011-6>
-

- Mesa, L., López, N., Cara, C., Castro, E., González, E., & Mussatto, S.I., Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production., *Renewable Energy*, Vol. 86, 2016b, pp. 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.105>
- Niju, S., & Swathika, M., Delignification of sugarcane bagasse using pretreatment strategies for bioethanol production., *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Vol. 20, 2019, 101263. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101263>
- Pérez, N., Utilización del bagazo de la caña de azúcar para la obtención de celulosa y etanol., Tesis presentada en opción al título de Licenciado en Ciencias Químicas, en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 2013.
- Silva, A.S., Oliveira, A.M., De Farias, C.E., & Abud, A.K.S., Inhibitors influence on ethanol fermentation by *pichia stipitis*., *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 49, 2016, pp. 367–372. <https://doi.org/10.3303/CET1649062>
- Singh, N., Singhania, R.R., Nigam, P.S., Dong, C. Di, Patel, A.K., & Puri, M., Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives., *Bioresource Technology*, Vol. 344, 2022, 126415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126415>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, H., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D., Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, NREL, 2008, pp. 1-15. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>
- Vallejos, ME., Chade, M., Beda, E., Inés, D., Gisela, J., Esteban, F., & Cristina, M., Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse., *Industrial Crops and Products*, Vol. 91, 2016, pp. 161–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.007>
- Wanderley, M.C. de A., Martín, C., Rocha, G.J., & Gouveia, E.R., Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis., *Bioresource Technology*, Vol. 128, 2013, pp. 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.131>
- Zhang, H., Zhang, J., Xie, J., & Qin, Y., Effects of NaOH-catalyzed organosolv pretreatment and surfactant on the sugar production from sugarcane bagasse., *Bioresource Technology*, Vol. 312, 2020, 123601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123601>

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

- Dr.C. Leyanis Mesa Garriga. Investigación, redacción-revisión y edición, supervisión.
  - Dr.Sc. Erenio González Suárez. Gestión de proyectos, supervisión.
  - Dr.C. Yaillet Albernas Carvajal. Redacción-revisión y edición.
-