

EVALUACIÓN DEL PRETRATAMIENTO ORGANOSOLV DEL BAGAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL (I PARTE)

Leyanis Mesa Garriga, Erenio González Suárez,

Centro de Análisis de Procesos. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Eulogio Castro Galiano

Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. España.

Delvis R. Acosta Martínez,

Estudiante de Licenciatura en Química.

Yenisley Duarte Alvarez,

Refinería de petróleo.

Recibido:

Aceptado:

El presente trabajo está encaminado a la evaluación de la etapa de pretratamiento del bagazo de la caña de azúcar para la producción de etanol. Se analizaron diferentes alternativas, evaluando el pretratamiento Organosolv usando catalizador ácido. Para este análisis se utilizó un diseño factorial completo del tipo 2^k ; se analizaron 3 variables independientes, las cuales fueron: tiempo, % de etanol y relación sólido líquido. La eficiencia del pretratamiento fue evaluada a través de la hidrólisis enzimática.

Palabras clave: Bagazo de caña de azúcar, pretratamiento Organosolv, hidrólisis enzimática, diseño fraccional completo.

EVALUATION OF ORGANOSOLV PRETREATMENT OF SUGAR CANE BAGASSE FOR ETANOL OBTENTION (I PART)

Abstract. The present work is focused to evaluation of the pretreatment stage of sugar cane bagasse for ethanol production. They were analyzed different alternatives, evaluating Organosolv pretreatment using acid catalyst. For this analysis a 2^k complete factorial design was used; 3 independent variables were analyzed, which are: time, ethanol % and liquid-solid ratio. The efficiency of the pretreatment was evaluated through the enzymatic hydrolysis.

Key words: Sugar cane bagasses, Organosolv pretreatment, enzymatic hydrolysis, complete fractional design.

INTRODUCCIÓN

El alto consumo energético ha llevado a una inevitable disminución de las reservas de combustibles fósiles y a la obtención de un ambiente con niveles preocupantes de contaminación.

Debido a esta problemática el etanol ha ocupado un lugar importante dentro de los combustibles a partir de fuentes renovables, sobre todo la producción de bioetanol de segunda generación para su aplicación en el sector del transporte, como una alternativa al empleo de las gasolinas, ya sea como aditivo, en mezclas, como único combustible o como materia prima para la producción de hidrógeno o biodiesel.

En Villa Clara, son generados anualmente, como subproducto de la molienda de la caña de azúcar 450 000 toneladas de bagazo, de las cuales, entre el 60 % y el 90 % son utilizadas para alimentación de calderas y, entre el 10 % y el 40% no poseen destino apropiado. Por lo que el bagazo de caña, es uno de los materiales lignocelulósicos con mayor potencial para la producción de etanol y otros productos de interés dentro del concepto de biorrefinerías.

Entre las tecnologías actuales de pretratamiento, está siendo evaluado el proceso Organosolv con etanol 1,6. Este proceso, históricamente, ha sido investigado desde la perspectiva de la industria de la pulpa y el papel. Pero varios estudios han demostrado la calidad de la fracción lignina extraída durante el pulpeo, incluyendo la demostración de su potencial para la fabricación de varios co-productos tales como polímeros biodegradables, por lo que en este trabajo nos proponemos realizar una evaluación del pretratamiento Organosolv usando catalizador ácido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la materia prima

El bagazo de caña de azúcar proviene del utilizado en la fábrica de papel Sergio González de la provincia de Cienfuegos, Cuba. Este fue desmedulado y conservado a granel según las normas técnicas establecidas.³ La composición química del bagazo de la

caña de azúcar utilizado en este estudio se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de bagazo de la caña de azúcar expresado como % de materia seca

Composición	%
Glucano	50,36
Xilano	22,24
Lignina	22,15
Extractivos	6,34
Cenizas	1,33

Procedimiento Analítico

El peso seco fue determinado por secado hasta peso constante a 105 °C en una estufa de convección. Las cenizas fueron determinadas de acuerdo a lo reportado en el estándar method TAPPI T211 om-93. Los extractivos fueron determinados de acuerdo al Estándar Test Method E1 690-01. La lignina Klason fue determinada de acuerdo al Standard Method TAPPI T-222. El hidrolizado de esta determinación fue mantenido para el análisis de los monosacáridos y lignina soluble en ácido. La lignina soluble en ácido fue determinada a partir de la absorbancia a 205 nm. La determinación de monosacáridos en pulpa, se realizó mediante cromatografía líquida HPLC (cromatógrafo Waters), utilizando una columna AMINEX-HPX87H (BIORAD).

Pretratamiento Organosolv con etanol

El bagazo de caña de azúcar fue cocinado en un digestor piloto de acero inoxidable de 50 lt de capacidad. Se mantuvo constante la temperatura (175 °C) y la concentración de ácido sulfúrico utilizado como catalizador (1,25 % en base a fibra seca) según resultados reportados anteriormente.⁴ Los rangos de las variables estudiadas [tiempo (15 a 40 minutos); % etanol utilizado en la solución, 0-45 %(v/v); Relación Sólido/líquido, (1/5-1/7)] fueron escogidos teniendo en cuenta resultados anteriores que reflejan el impacto ambiental positivo de esta tecnología y condiciones óptimas para la obtención de pulpa para papel,² y rangos de operación recogidos de la literatura.^{5,6} Los sólidos pretratados fueron separados del licor de pulpeo y lavados. Las pulpas lavadas fueron conservadas a

4 °C para el análisis químico y la determinación de la actuación de la hidrólisis enzimática.

Hidrólisis enzimática

Las preparaciones de Celulasa comercial y β -glucosidasa (Celluclast y Novozyme 188, respectivamente) fueron donadas por Novozyme (Bagsvaerd, Dinamarca). La actividad de la celulasa fue determinada usando los ensayos de papel de filtro recomendados por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y está expresada en unidades de papel de filtro (FPU). La actividad de la β -glucosidasa fue determinada usando el p-nitrofenil- β -D-glucoside como sustrato como se describió anteriormente, y es expresada en unidades de celobiase (CBU).

Celluclast fue suplementada con β -glucosidasa (1ml FPU: 0,1ml CBU) para disminuir la inhibición por producto causada por la acumulación de celobiosa. Los experimentos de hidrólisis a batch fueron conducidos a 5 % (p/v) de consistencia del sustrato en buffer citrato a pH 4,8. Las mezclas de 25 ml fueron incubadas a 50 °C con 150 rpm, en un agitador rotatorio y fueron tomadas muestras periódicamente para el análisis de azúcares.

Plan experimental

El plan experimental del pretratamiento y los niveles de las variables independientes se muestran en la tabla 2. X_1 (tiempo) tiene como límite inferior 15 minutos y como límite superior 40 minutos. X_2 (% alcohólico) fue incluido para evaluar el efecto del etanol se encuentra entre 0 % y 45 % (v/v) y el límite inferior y superior de X_3 (Relación sólido-líquido) fue de 1/5 y 1/7, respectivamente. Los resultados fueron analizados con el software Statgraphic v 5.

En el pretratamiento se evalúan 2 parámetros fundamentales; el rendimiento de glucanos, por ser la fracción que brinda los azúcares potencialmente fermentables y la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados obtenidos, factor clave para la obtención de los azúcares susceptibles a ser fermentados.

Tabla 2. Diseño experimental 2³ aplicado al pretratamiento Organosolv del bagazo de la caña de azúcar

Exp.	X1 (Tiempo min)	X2 (% Alcohólico)	X3 (Rel. S/L)
1	40 (+)	45% (+)	1/7(+)
2	40(+)	45%(+)	1/5(-)
3	40(+)	0(-)	1/7(+)
4	40(+)	0(-)	1/5(-)
5	15(-)	45%(+)	1/7(+)
6	15(-)	45%(+)	1/5(-)
7	15(-)	0(-)	1/7(+)
8	15(-)	0(-)	1/5(-)

* Los signos entre paréntesis representan los valores codificados.

DESARROLLO

Selección de condiciones del pretratamiento Organosolv de bagazo de caña de azúcar

El primer paso de un proceso de hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos lo constituye el pretratamiento, que tiene como objetivo alterar su compleja estructura permitiendo el acceso a las enzimas. El efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico empleado como sustrato en la sacarificación enzimática, se evaluó sobre la recuperación de sólidos del material pretratado ocurrido como consecuencia del pretratamiento y sobre la composición del residuo obtenido. Además, se evaluó la eficiencia de la hidrólisis enzimática en el sólido pretratado en los diferentes puntos del diseño. Considerando las variables respuestas relativas a la composición del sólido; % recuperación de sólidos, composición del sólido insoluble, y las referidas a la etapa de hidrólisis enzimática, a decir, concentración de glucosa y rendimiento de glucosa por 100 gramos de materia inicial; se determinaron las condiciones del pretratamiento más adecuadas para el bagazo de la caña de azúcar.

Efecto del pretratamiento en la composición

Aunque desde el punto de vista de la economía global del proceso hay que buscar las condiciones en las que la degradación de la celulosa y hemicelulosa sea mínima, uno de los objetivos fundamentales del pretratamiento debe ser aumentar al máximo la eficiencia de sacarificación (ES) de la celulosa.⁷ De este modo podría obtenerse una mayor concentra-

ción de azúcares que permitan la obtención de mostos con un mayor contenido alcohólico lo que contribuye a una mayor eficiencia del proceso. Se determinó la eficacia de sacarificación de los sólidos pretratados obtenidos en cada pretratamiento, mediante test de hidrólisis enzimática a las 24 horas. En la tabla 3 se muestran los resultados de la caracterización del material pretratado.

Analizando el caso referente a los por cientos de xilano y lignina en el sólido pretratado, se observa que disminuyen al aplicar las condiciones de pretratamiento que corresponden según el diseño, lo cual es favorable al proceso, debido a experiencias anteriores donde se demuestra que la presencia hemicelulosa y la lignina no benefician el proceso de hidrólisis enzimática.⁴

Tabla 3. Recobrado de sólido total (%) y composición (% materia seca) del sólido insoluble en agua resultado del pretratamiento Organosolv correspondiente a las diferentes condiciones previstas en el diseño 2³ aplicado

Experimento	Glucano %	Xilano %	Lignina %	Recuperación %
1	75,17	9,80	24,54	60,25
2	74,19	7,57	25,65	60,89
3	67,10	6,19	27,49	57,00
4	77,61	6,07	25,38	51,82
5	68,63	10,23	24,68	62,19
6	72,67	8,57	25,40	68,11
7	74,30	7,91	25,33	66,39
8	73,97	8,25	26,51	64,58

En el análisis de los modelos obtenidos para cada parámetro respuesta analizado en este caso (datos no mostrados), se determina la significación de cada

variable independiente, las cuales se muestran en los diagramas de Pareto obtenidos en cada caso, según la figura 1.

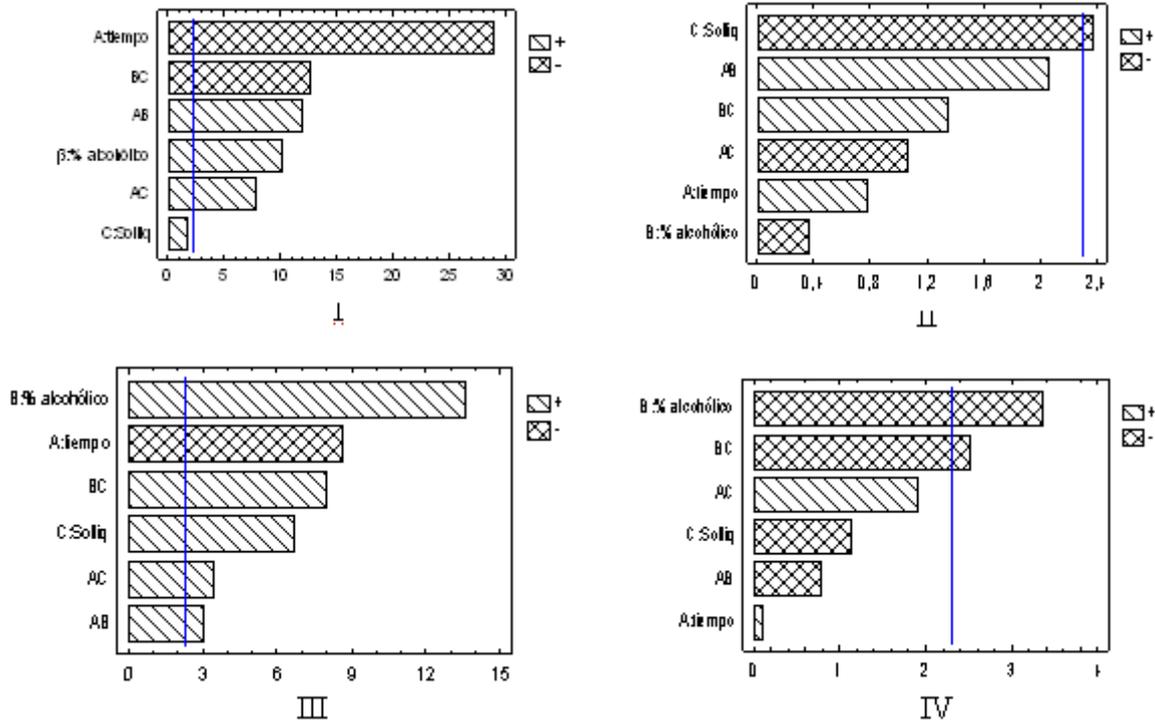


Figura 1. Diagramas de Pareto para parámetros respuestas I: % de Recuperación, II: % Glucano, III: % Xilano, IV % lignina

Como se puede apreciar en la figura 1, en el caso del por ciento de recuperación de sólidos se ve afectado por el tiempo, o sea, a medida que el tiempo aumenta disminuye este parámetro. Se puede observar, además, la influencia positiva sobre este parámetro de la utilización de etanol en el pretratamiento, lo cual es corroborado por otros autores que plantean que el uso de solventes orgánicos en el pretratamiento incrementa la recuperación de sólidos en esta etapa. En este caso, la relación sólido/líquido, como variable independiente lineal no resultó significativa. Analizando esta variable en la interacción con el por ciento alcohólico utilizado se observa que la interacción resulta significativa, la cual presenta signo negativo y como se explicó arriba, el uso del etanol en el proceso favorece la recuperación de sólidos lo cual se verifica por el signo positivo de esta variable, por lo que es factible usar la relación sólido-líquido 1/5 (signo -), lo cual favorece que el consumo de agua de esta etapa de pretratamiento sea menor.

Para el caso del contenido de xilano en los sólidos pretratados, se observa que el uso de etanol en la etapa de pretratamiento, tiene efecto negativo sobre la eliminación de xilano del bagazo, aspecto a considerar, sobre la base de que el objetivo de usar el catalizador ácido, es la eliminación de xilano, debido a que este componente afecta negativamente la hidrólisis enzimática. Para el caso de la variable tiempo es recomendable utilizar 40 minutos, ya que tiene más efecto sobre esta fracción xilano, y en el

análisis de la relación sólido/líquido, se obtienen mejores resultados usando la correspondiente al nivel inferior (1/5).

En el análisis del contenido de lignina, la única variable independiente estudiada que resultó significativa fue el por ciento alcohólico. Cuando se usa etanol en el pretratamiento disminuye el contenido de lignina. Varios trabajos plantean que el uso de etanol en la etapa de pretratamiento incrementa la difusividad de la lignina en el licor de cocción.² La lignina obtenida por este proceso, posee una calidad superior a la obtenida a través de otros procesos, lo que puede ser aprovechado dentro del concepto de biorrefinerías.

Analizando la fracción glucano, la variable independiente significativa fue la relación sólido líquido y se afecta menos esta fracción cuando se usa la relación sólido/ líquido de 1/5, lo cual es muy favorable, debido a que se disminuye el consumo de agua y se conserva esta fracción, que es la que brinda potencialmente los azúcares a ser fermentados.

Para el análisis de los resultados de la evaluación del pretratamiento a través de la hidrólisis enzimática, se tomaron como parámetros respuestas la concentración de glucosa y el rendimiento de glucosa por 100 g de materia prima inicial, parámetros claves en la evaluación de este proceso.

Los resultados se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Concentración de glucosa (g/L) y gramos de glucosa/100 g de materia prima inicial en cada unas de las condiciones del experimento después de la HE

Experimento	Conc Gluc g/L	G gluc/100 g de MP
1	13,68	16,48
2	13,58	16,53
3	12,71	14,49
4	14,50	15,03
5	12,80	15,92
6	12,04	16,40
7	11,34	15,05
8	12,73	16,44

Los modelos obtenidos para estos dos parámetros respuestas se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Modelos obtenidos para los parámetros respuestas Concentración de glucosa y g de glucosa por materia prima inicial

Parámetros Respuesta	Modelo Obtenido	R ²
Conc. de Glucosa (g/L)	$12,77 + 0,53\text{tiempo} + 0,045\% \text{alc} - 0,27\text{RS-L} - 0,014\text{tiempo} * \% \text{alc} - 0,19\text{tiempo} * \text{RS-L} + 0,43\% \text{alc} * \text{RS-L}$	86,52
G de gluc/100 g de MP _i	$15,72 - 0,18\text{tiempo} + 0,49\% \text{alc} - 0,30\text{RS-L} + 0,32\text{tiempo} * \% \text{alc} + 0,13\text{tiempo} * \text{RS-L} + 0,15\% \text{alc} * \text{RS-L}$	98,07

En la tabla 6 se presenta el análisis de varianza de los parámetros respuestas asociados a la HE.

Tabla 6. ANOVA de la Concentración de glucosa (g/L) y gramos de glucosa por 100 gramos de materia prima inicial

Parámetro: Concentración de glucosa (g/L)				
Fuente	Suma de cuadrados	GL	F-ratio	P-valor
A: tiempo	4,59	1	42,42	0,0002
B: % alc	0,033	1	0,31	0,594
C: RS-L	1,248	1	11,54	0,0094
AB	0,0033	1	0,03	0,8686
AC	0,5738	1	5,30	0,0503
BC	3,036	1	28,06	0,0007
Parámetro: G de glucosa/100 g de MP inicial				
A: tiempo	0,536	1	43,01	0,0002
B: % alc	3,99	1	319,84	0,0000
C: RS-L	1,50	1	120,78	0,0000
AB	1,722	1	138,09	0,0000
AC	0,299	1	24,03	0,0012
BC	0,406	1	32,58	0,0005

Como se observa en la tabla 6, con los datos de ANOVA, para el caso de la concentración de glucosa, resultan significativas las variables lineales: tiempo, la de mayor significación y analizando el signo positivo de su coeficiente (ver tabla 5), se evidencia que el pretratamiento a 40 minutos favorece el parámetro respuesta concentración de glucosa. Como se discutió anteriormente al usar un mayor tiempo de pretratamiento en las condiciones ensayadas, la eliminación de xilano es mayor, analizando que el xilano ofrece una barrera a las enzimas celulolíticas para su actuación sobre la celulosa del material pretratado. La relación sólido/líquido también resultó significativa y es factible usar la correspondiente a 1/5, con los beneficios que trae consigo usar esta relación, ya explicados anteriormente.

Para el caso del parámetro respuesta g de glucosa/100 gramos de materia prima inicial, todas las va-

riables lineales así como sus interacciones resultaron significativas. La variable de mayor significación resultó el % alcohólico, ver valores de Fisher en la tabla 6, y según el signo del coeficiente del modelo en la tabla 5, el cual es positivo, el rendimiento por 100 gramos de materia prima inicial incluye la recuperación de sólidos y como fue explicado anteriormente, el uso del etanol en el pretratamiento incrementa este parámetro. La interacción entre el tiempo y el % alcohólico resultó con gran nivel de significación y el signo del coeficiente es positivo lo que corrobora que usar el tiempo 40 minutos de pretratamiento incrementa el rendimiento por materia prima inicial, al igual que al usar ese tiempo aumenta la concentración de glucosa en el hidrolizado, dos factores que favorecen las etapas subsiguientes del proceso. Se corrobora aquí la factibilidad de usar la relación sólido/líquido de 1/5.

CONCLUSIONES

Como conclusiones de este trabajo podemos citar:

1. El proceso Organosolv aplicado a la etapa de pretratamiento del bagazo de la caña de azúcar para la obtención de etanol ofrece ventajas significativas en los parámetros respuestas evaluados en este caso.
2. El uso de un tiempo de 40 minutos en la etapa de pretratamiento mostró resultados superiores en cuanto a concentración de glucosa y g de glucosa por 100 gramos de materia prima inicial.
3. El uso de una relación sólido/líquido de 1/5 en el pretratamiento resultó en mejores resultados en los parámetros respuestas evaluados.
4. Es necesario continuar con el mejoramiento de esta etapa para incrementar los valores de los parámetros respuestas analizados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del proyecto CITMA Nacional "Posibilidades de obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos", al proyecto AECID "Obtención de bioetanol y coproductos a partir de fuentes alternativas de biomasa" así como a la Red Cytel "Nuevas tecnologías para la obtención de biocombustibles".

BIBLIOGRAFÍA

1. ARAQUE, E.; C.; PARRA J.; FREER D.; CONTRERAS J.; RODRIGUEZ Y OTROS: Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme Microb Technol*, doi:10.1016/j.enzmictec.2007.08.006 (en prensa), 2007.
2. GONZÁLEZ, M.: Impacto global de una tecnología más limpia en la fabricación de papel para ondular, Tesis de disertación en opción al grado científico de Doctor en Ciencias específicas (PhD) Universidad Central de Las Villas, 2004.
3. GONZÁLEZ, E.: Aplicación del análisis de procesos en la intensificación de diferentes industrias de Cuba. Tesis de disertación para la obtención del grado científico de Doctor en Ciencias (segundo nivel en Cuba). Universidad Central de Las Villas. Cuba, 1991.
4. MESA, L. Y 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. IV Taller Caribeño de Energía y Medio Ambiente. Universidad de Cienfuegos, Cuba, 2008.
5. PAN, XJ.; C. ARATO N.; GILKES D.; GREGG W.; MABEE K.; PYE, ET AL.: "Biorefining of softwood using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process stream for manufacture of fuel grade ethanol and co-products. *Biotechnol Bioeng* (90): 473-81, 2005.
6. PAN, XJ.; N.; GILKES J.; KADLA K.; PYE S.; SAKA D.; GREGG, ET AL.: "Bioconversion of Hybrid Poplar to ethanol and co-products using an Organosolv fractionation Process: Optimization of Process Yields." *Biotechnol Bioeng*; (94): 851-61, 2006.
7. WU, J. AND L.K. JU: "Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition." *Biotechnol. Prog.* (14), 649-652, 1998.