

## ***ANÁLISIS DEL TIEMPO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO PRETRATADO***

### ***TIME ANALYSIS OF THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PRETREATED BAGASSE***

*Yaillet Albernas Carvajal<sup>1\*</sup>, Gabriela Corsano<sup>2</sup>, Ronaldo Santos Herrero<sup>1</sup> y  
Erenio González Suárez<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ Santa Clara. Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Desarrollo y Diseño (CONICET-UTN). Avellaneda 3657 - (S3002GJC) Santa Fe, Argentina.

Recibido: Marzo 24, 2014; Revisado: Abril 17, 2014; Aceptado: Mayo 17, 2014

#### **RESUMEN**

En el estudio se hace un análisis del tiempo de hidrólisis enzimática de bagazo pretratado de forma ácida y básica, en función de la obtención de azúcares reductores totales (ART). Para ello se emplean los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, donde se emplearon las enzimas Celulolíticas Novozyme Cellic<sup>R</sup>CTec2 y -glucosidasa con código NS50010, en un experimento con un diseño factorial 2<sup>3</sup> haciendo réplicas al azar. A partir de los parámetros fundamentales de la cinética enzimática determinadas por Albernas 2014, para determinar la velocidad de producción de ART en el tiempo, mediante un modelo cinético pseudo-homogéneo de Michaelis Menten, se combina con los indicadores dinámicos de rentabilidad en busca del tiempo óptimo de hidrólisis enzimática en el proceso de obtención de etanol empleando hidrolizado de bagazo.

**Palabras clave:** hidrólisis enzimática, tiempo

#### **ABSTRACT**

In the study, the time of enzymatic hydrolysis of pretreated acid and alkaline bagasse is analyzed, with the goal of obtaining total reducing sugar production (ART). For it, we used the obtained results at laboratory level, where the Novozyme Cellic<sup>R</sup>CTec<sup>2</sup> and -glucosidase with code NS50010 Cellulolitics enzymes were used; in an experiment with a 2<sup>3</sup> factorial design, making random replicas.

Copyright © 2014. Este es un artículo de acceso abierto, lo que permite su uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

\* Autor para la correspondencia: Y. Albernas, Email: [yailletac@uclv.edu.cu](mailto:yailletac@uclv.edu.cu)

Starting from main parameters of the enzymatic kinetics determined by Albernas 2014 to determine ART production rate in time, and applying a Michaelis Menten pseudo-homogeneous kinetic model, it is combined with the profitability dynamic indicators to find the enzymatic hydrolysis optimal time in the process to obtain ethanol using bagasse hydrolyzate.

**Key words:** enzymatic hydrolysis, time

## **1. INTRODUCCIÓN**

La hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica ha recibido especial atención en la última década debido a su potencial para convertir la fracción celulósica de sustratos lignocelulósicos en azúcares reductores, incluyendo la glucosa, los cuales son materia prima para la producción de bioetanol y otros productos químicos (Jorgensen et al., 2007).

El proceso de obtención de etanol empleando hidrolizado de bagazo presenta etapas discontinuas de muy larga duración, como es el caso de la hidrólisis enzimática que puede presentar tiempos de operación de 24 h e incluso mayores. Este elevado tiempo de operación provoca largos tiempos de residencia de los materiales en los equipos, provocando además una subutilización de los equipos previos a estas etapas, pues se encuentran en espera sin ser utilizados, afectando los costos por este concepto, como lo apunta Albernas 2014.

El objetivo fundamental del presente trabajo es analizar el tiempo de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar pretratado a fin de establecer un compromiso a la hora de realizar los diseños.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***2.1. Desarrollo experimental de la hidrólisis enzimática***

Para obtener las mejores condiciones en la obtención del hidrolizado se realizó un diseño factorial de experimentos  $2^3$  con réplicas al azar, empleando el bagazo pretratado anteriormente en las etapas de hidrólisis ácida y básica y las enzimas Celulolíticas Novozyme Cellic<sup>®</sup>CTec2 y  $\alpha$ -glucosidasa con código NS50010. El experimento se realizó en beakers con un volumen de 25 ml de solución buffer HAc-acetato de sodio de pH 4,8 en zaranda a 150 rpm. Para la determinación ART se aplicó la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a partir de la elaboración previa de la curva de calibración en un Espectrofotómetro Genesys 20 a 540 nm. Por el método de diferencia de pesada se determinó la lignina presente en el bagazo pretratado.

En el desarrollo de la hidrólisis enzimática las variables independientes estudiadas fueron la temperatura, en la cual el nivel inferior se corresponde con los mejores resultados de Mesa (2010) y el nivel superior 50 °C es la óptima reportada por el fabricante de la enzima empleada. Las otras dos variables estudiadas fueron la concentración de enzima y de sustrato tomando los niveles de las mismas a partir de los estudios de Mesa (2010).

Variables independientes:  $X_1$ : Temperatura (38-50 °C);  $X_2$ : Concentración de la enzima (10-20 UPF/g); CE (0,15-0,31ml/g);  $X_3$ : Concentración de sustrato (5-10 %); CS (50-100 g/L)

Variable dependiente: Formación de Azúcares Reductores Totales (ART)

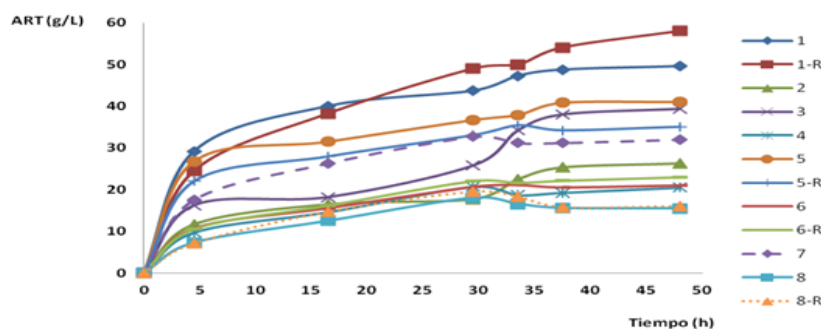
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestra la matriz experimental planteada, se hicieron réplicas al azar de los experimentos 1, 5, 6 y 8. También se muestran los valores máximos de ART obtenidos a las 48 h de experimento.

**Tabla 1.** Matriz experimental para hidrólisis enzimática

Exp	$X_1$	$X_2$	$X_3$	ART max obtenido (g/L)
<b>1</b>	+	+	+	48,74
<b>1a</b>	+	+	+	58,02
<b>2</b>	+	+	-	25,38
<b>3</b>	+	-	+	38,05
<b>4</b>	+	-	-	19,26
<b>5</b>	-	+	+	40,82
<b>5a</b>	-	+	+	35,01
<b>6</b>	-	+	-	20,58
<b>6a</b>	-	+	-	23,03
<b>7</b>	-	-	+	31,23
<b>8</b>	-	-	-	15,59
<b>8a</b>	-	-	-	15,78

En la figura 1 se observa la tendencia de la formación de ART en el tiempo de los experimentos realizados y sus réplicas, apreciándose como tendencia general que la mayor formación de azúcares ocurre en las primeras 5 a 15 horas, pues a partir de allí la formación ocurre de forma más moderada. Si se analiza el experimento 1-R y 8 se observa como en el 1-R la máxima formación de ART es de aproximadamente 58 g/L, siendo este valor mucho mayor que en el experimento 8 que es de 16 g/L, este comportamiento se debe a que en el 1-R la temperatura a la que se llevó a cabo el experimento fue de 50°C siendo esta la temperatura de trabajo óptima reportada para esta enzima y en el 8 fue de 38°C que fue la óptima obtenida por (Mesa, 2010).

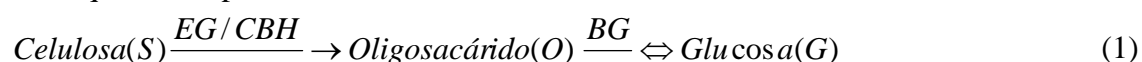


**Figura 1.** Formación de ART experimentales en el tiempo

Si se compara el 1-R con el 2, en el cual se mantienen constantes la temperatura y la concentración de enzima, se observa que a medida que es mayor la concentración de sustrato (1-R) mayor es la formación de ART, manteniéndose el mismo comportamiento en el caso de la concentración de la enzima en los experimentos 1-R y 3 en los cuales se evidencia claramente que a mayor concentración de enzima mayor será la formación de ART notando una diferencia marcada de producción de ART de aproximadamente 18 g/L.

Para determinar la velocidad de producción de ART en el tiempo se emplea el mecanismo simplificado pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten, que parte de que el azúcar se produce de un sustrato soluble hipotético cuya concentración inicial correspondería a la concentración de ART producida finalmente según lo planteado en (Li et al., 2004) y González (2007).

Un esquema simplificado del mecanismo de reacción se muestra a continuación:



Donde: **S**: Sustrato insoluble, **O**: Oligosacárido soluble, **G**: Glucosa, **EG**:

Endoglucanasa, **CBH**: Celobiohidrolasa, **BG**: - glucosidasa

En su trabajo, Albernas 2014, desarrolló este mecanismo pseudo-homogéneo de Michaelis Menten con el cual determinó la expresión de la cinética del bagazo pretratado bajo las condiciones tratadas en el presente, bajo la expresión:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{k E_o(T_\infty - T)}{K_M [1 + (1/K_I)T] + 0,9(T_\infty - T)} \quad (2)$$

Donde:

$T$  : Representa el máximo valor de T (O+G) alcanzado durante la reacción

$(T - T)$ : Concentración de sustrato hipotético del modelo pseudo-homogéneo.

$0,9$ : Relación entre el peso molecular de una unidad de glucosa en celulosa y el peso molecular de la glucosa.

$k$ : Constante aparente que representa la frecuencia de enlace entre celulosa y celulasa

$K_M$ : Constante aparente de Michaelis - Menten que representa la afinidad entre la celulosa y la celulasa.

$K_I$ : Constante aparente de inhibición competitiva o no competitiva entre celulosa-glucosa y celulasa.

$E_o$ : Concentración inicial de la enzima.

Luego de desarrollada la metodología propuesta por (Li et al., 2004) y abordada por González (2007), Albernas (2014) obtiene los parámetros del mecanismo pseudo-homogéneo y e determina la expresión de velocidad de reacción de la formación de ART en el tiempo que sería:

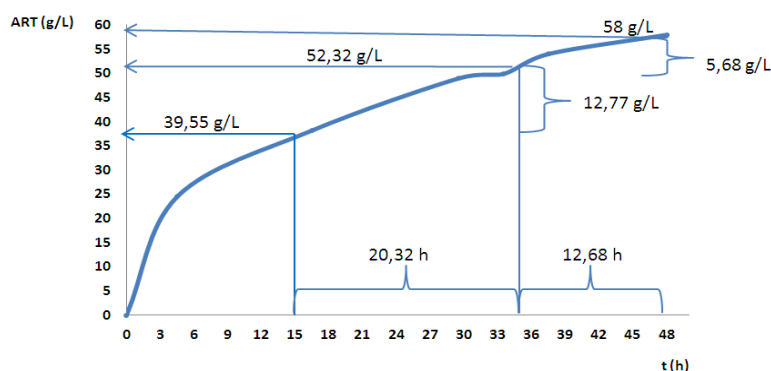
$$\frac{dT}{dt} = \frac{0,735 \cdot 42,2 (58 - T)}{217,49 [1 + (1/32,6)T] + 0,9(58 - T)} \quad (3)$$

Para el cálculo del tiempo real en que ocurre la reacción de hidrólisis formándose los azúcares reductores, para el experimento 1-R, Albernas 2014, se plantea la siguiente expresión:

$$t = \int_{T_0}^T \frac{K_M \left[ 1 + \left( \frac{1}{K_I} \right) T \right] + 0,9 (T_\infty - T)}{k E_0 (T_\infty - T)} dT \quad (4)$$

Donde t está en h;  $T_0 = 1,53$  g/L,  $T = 52,32$  g/L,  $K_M = 217,49$  g/L,  $K_I = 32,6$  g/L,  $T_\infty = 58$  g/L,  $k = 0,735$  h<sup>-1</sup>,  $E_0 = 42,2$  g/L

Para el modelo desarrollado se obtienen los valores de tiempo transcurrido, pero para el diseño de la etapa se necesita establecer un compromiso entre los ART a obtener en el hidrolizado y el tiempo que transcurre, por ejemplo para un tiempo de 48 h se obtienen 58 g/L, sin embargo para un tiempo de 35,31 h se obtienen 52,32 g/L, o sea que en 12,68 h menos se obtienen solo 5,68 g/L menos, así se está evitando una espera de 12,69 h.



**Figura 2.** Análisis de la relación ART obtenido y tiempo transcurrido en la hidrólisis enzimática para el experimento 1-R

Si se comparan los ART obtenidos a las 15 h que son 39,55 g/L, se puede apreciar que con respecto a las 35,31 h son 20,32 h menos de espera que corresponde, solo a 12,77 g/L menos.

### 3.1. Determinación del tiempo óptimo de hidrólisis enzimática

Esta etapa es una de las críticas del proceso por su larga duración, por lo que se debe analizar la obtención de un tiempo mínimo que permita obtener un nivel de ART adecuado y que garantice la eficiencia de la etapa. Para el caso de obtención de etanol empleando hidrolizado de bagazo, Albernas 2014, estudia 4 alternativas combinado con los indicadores de rentabilidad:

Alternativa 1: comprar todo el equipamiento y vender etanol.

Alternativa 2: acoplarlo a una destilería y vender etanol (*no se compra prefermentación y fermentación*)

Alternativa 3: comprar todo el equipamiento y vender etanol y furfural

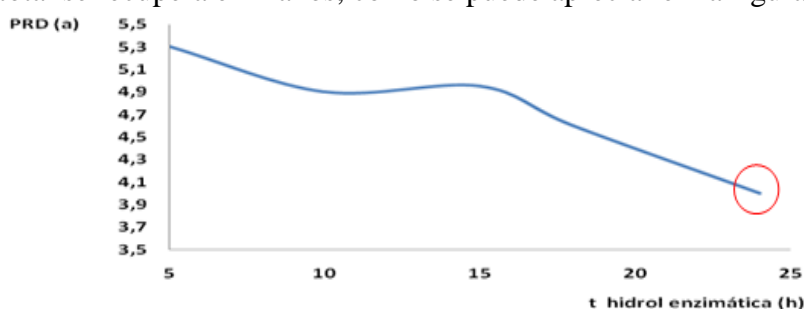
Alternativa 4: acoplarlo a una destilería y vender etanol y furfural (*no se compra prefermentación y fermentación*)

Lo cual da como resultado 4 alternativas con 5 opciones de diseño dentro de cada una de ellas; por lo que en cada caso se hizo el estudio de factibilidad de estos resultados

con la con la metodología de (Peters y Timmerhaus, 1968), en busca del tiempo de hidrólisis enzimática óptimo en cada una de ellas.

Se analiza una primera variante de comprar todo el equipamiento y vender solo etanol, en esta variante el tiempo óptimo global es de 24 h y se recupera en 13 años, que es donde presenta el mínimo global, lo cual no es económicamente factible, por lo cual se desecha esta alternativa.

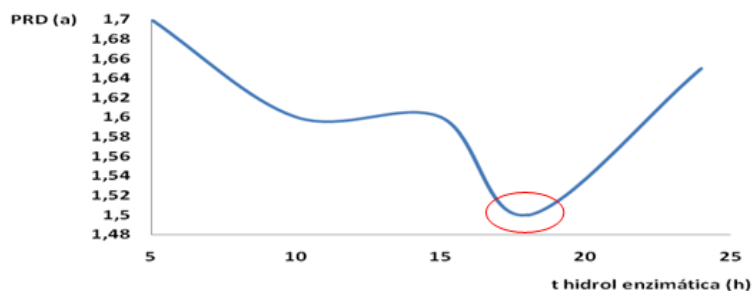
Haciendo un análisis de emplear el hidrolizado obtenido junto con las mieles de una destilería y completar la capacidad de la misma, por no disponer de miel para todo el año, implica que en el proceso inversionista no se compran los equipos correspondientes a las etapas de prefermentación y fermentación. Esta alternativa de acoplar a una destilería, implicaría que la etapa de hidrólisis enzimática tendría una duración de 24 h y la inversión total se recupera en 4 años, como se puede apreciar en la figura 3.



**Figura 3.** Perfil de PRD – tiempo de hidrólisis enzimática en la alternativa de acoplarlo a una destilería y vender etanol

Haciendo un análisis de la producción de coproducto (*furfural*), en conjunto con el bioetanol, para el caso de comprar todo el equipamiento el período de recuperación mínimo de 3,1 años, se encuentra a las 5 h, lo cual implica que lo importante en este caso no es la producción de azúcares para obtener bioetanol, pues a las 5 h solo se han obtenido 24,59 g/L de ART, o sea que este caso le da mayor importancia a la producción de coproducto, por lo que esta alternativa no resulta atractiva para su implementación.

Un último análisis de la posibilidad de aprovechar la capacidad instalada en prefermentación y fermentación al acoplarlo a una destilería y produciendo además furfural, arroja un mayor aprovechamiento del bagazo para la producción de azúcares, permitiendo recuperar la inversión en 1,5 años como se aprecia en la figura 4 y el tiempo óptimo es de 18 h.



**Figura 4.** Perfil de PRD – tiempo de hidrólisis enzimática en la alternativa de acoplarlo a una destilería y vender etanol y furfural

La variante más atractiva a aplicar es la de obtener el bioetanol acoplado a una destilería empleando el hidrolizado de bagazo como un sustrato complementario para satisfacer la carencia de miel de la misma y al implementarla, si se logra tener un mercado seguro para el furfural, pues entonces se completaría la inversión en este sentido, teniendo en cuenta la última variante analizada.

#### **4. CONCLUSIONES**

1. El experimento que mejores condiciones presenta en la etapa de hidrólisis enzimática es el experimento 1-R con la mayor producción de ART en el tiempo que es de 58 g/L con una concentración máxima de enzima y sustrato de 0,31 ml/g y 100 g/L respectivamente.
2. Al establecer un compromiso entre el tiempo de reacción de la hidrólisis enzimática y los ART obtenidos y teniendo en cuenta el comportamiento de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado, bajo las condiciones estudiadas, se aprecia que el mayor salto en la producción de ART ocurre en las primeras 15 horas con 39,55 g/L.
3. El análisis combinado del modelo matemático con los indicadores dinámicos de rentabilidad demostró que el tiempo óptimo de hidrólisis enzimática en la alternativa de acoplarlo a una destilería y vender etanol es de 24 h obteniendo 45,56 g/L de hidrolizado y en la alternativa de obtener el bioetanol acoplado a una destilería vendiendo etanol y furfural es de 18 h obteniendo 40,56 g/L de hidrolizado.

#### **REFERENCIAS**

- Albernas, Y., Procedimiento para la síntesis y el diseño óptimo de plantas discontinuas de obtención de bioetanol empleando bagazo de caña de azúcar., Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara, 2014.
- González, A., Hidrólisis enzimática de bagazo de caña; cinética y diseño preliminar de reactores., Trabajo presentado en opción al título de Ingeniero Químico, Universidad industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química Bucaramanga, 2007.
- Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J. & Felby, C., Liquefaction of Lignocellulose at High- Solids Concentrations., *Biotechnology Bioengineering* 96, 2007, pp. 862-870.
- Li, C., Yoshimoto, M., Tsukuda, N., Fukunaga, K. & Nakao, K., A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation., *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 19, 2004, pp. 155–164.
- Mesa, L., Estrategia Investigativa para la Tecnología de Obtención de Etanol y Coproductos del Bagazo de la Caña de Azúcar., Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Departamento de Ingeniería Química, Santa Clara, 2010.
- Peters, M. S. & Timmerhaus, K. D., *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, Second Edition, La Habana, 1968.