

Avances en el uso del licor hidrolizado de bagazo en la fermentación de mezclas azucaradas

M. Morales-Zamora¹, A.C. de Armas Martínez¹, L. Mesa-Garriga²,
D. Acosta-Martínez³ y E. González-Suárez¹

¹Departamento de Ingeniería Química. Facultad Química- Farmacia. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Cuba. ²Departamento de Biotecnología. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. ³Centro de Graduados en Investigación en Química. Instituto Tecnológico de Tijuana. Tijuana. México.

Advances in the use of the hydrolyzed liquor of bagasse in the fermentation of sugary mixtures

Avenços en l'ús del licor hidrolitzat de bagàs en la fermentació de mesclades ensucrades

RECEIVED: 17 MARCH 2017; REVISED: 7 NOVEMBER 2017; ACCEPTED: 22 DECEMBER 2017

SUMMARY

The investigation beginning from giving continuity to the research strategy has been studied since previous investigation^{1,2}, about the pre-treatment of bagasse towards the obtaining of products with high added value. The main objective is to evaluate the possibilities of using bagasse hydrolyzed liquor in the formulation and fermentation of sugary substrates mixtures to obtain ethanol. The enzymatic hydrolysis of the bagasse is performed, considering the best conditions obtained^{3,4} and a simplex lattice mixtures design with centroide for the mixtures of substrates, final molasse, filter juice and bagasse hydrolyzate is carried out. The statistical results are satisfactory, and allow reaching an optimum region for mixtures formulation. In conclusion, preliminary studies of the use of bagasse hydrolyzed liquor provide a sugary substrate process, favoring a lower consumption of molasse and water, and a reduction of molasse for purchase in non-harvest time.

Key words: Mixtures; molasses; juice; hydrolyzate; bagasse.

RESUMEN

El trabajo parte de dar continuidad, a la estrategia investigativa que se viene estudiando desde trabajos anteriores^{1,2}, acerca del pretratamiento del bagazo hacia la obtención de productos de alto valor agregado. El objetivo fundamental es evaluar las posibilidades de utilización del licor hidrolizado del bagazo en la

formulación y fermentación de mezclas de sustratos azucarados hacia la obtención de etanol. Se realiza la hidrólisis enzimática del bagazo, considerando las mejores condiciones obtenidas^{3,4}, y se realiza un diseño de mezclas enrejado simplex con Centroides para las mezclas de sustratos, miel final, jugo de los filtros y licor hidrolizado de bagazo. Los resultados estadísticos son satisfactorios, y permiten llegar a una región óptima para la formulación de las mezclas. Como conclusión, se obtiene que los estudios preliminares de utilización del licor hidrolizado de bagazo brinda un sustrato azucarado al proceso, favoreciendo un menor consumo de miel y agua, y una reducción de miel por concepto de compra en tiempo fuera de cosecha.

Palabras claves: Mezclas; miel; jugo; hidrolizado; bagazo.

RESUM

El treball parteix de donar continuïtat a l'estratègia investigadora que s'ha estudiat en treballs anteriors^{1,2}, sobre el pretractament del bagàs cap a l'obtenció de productes d'alt valor afegit. L'objectiu fonamental és avaluar les possibilitats d'utilització del licor hidrolitzat del bagàs en la formulació i fermentació de mesclades de substrats ensucrats cap a l'obtenció d'etanol. Es realitza la hidròlisi enzimàtica del bagàs, conside-

*Corresponding author: marlenm@uclv.edu.cu

rant les millors condicions obtingudes^{3,4} i es realitza un disseny de mescles enreixat simplex amb Baricentre per a les barreges de substrats, mel final, suc dels filtres i hidrolitzat de bagàs. Els resultats estadístics són satisfactoris, i permeten arribar a una regió òptima per a la formulació de les mescles. Com a conclusió, s'obté que els estudis preliminars d'utilització del licor hidrolitzat de bagàs brindan un substrat ensucrat al procés, afavorint en un menor consum de mel i aigua, i una reducció de mel per concepte de compra en temps fora de collita.

Paraules clau: Mescles; mel; suc; hidrolitzat; bagàs.

INTRODUCCIÓN

Como es conocido, el bagazo es un subproducto con elevadas potencialidades de desarrollo dado los volúmenes que se obtienen y a la composición de celulosa, hemicelulosa, lignina y otros componentes que generan productos de alto valor agregado^{5,6,8,9,10}. Sus usos van destinados principalmente hacia la generación de energía térmica y eléctrica, y como materia prima para la producción de tableros, alimento animal, furfural, y más reciente hacia la producción de etanol de segunda generación.

Por otra parte, el pretratamiento del bagazo permite el fraccionamiento de la biomasa en sus componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina), la reducción de la cristalinidad de la celulosa y el aumento del área superficial accesible³⁻⁹.

Como se ha venido estudiando en trabajos anteriores¹⁻⁴, y en consecuencia con la estrategia investigativa de los pretratamientos del bagazo, según el esquema de la figura 1, en la etapa de hidrólisis del bagazo para la obtención de xilosa y furfural, los resultados se han visto favorecidos a la utilización del sólido pretratado y el sólido residual de la hidrólisis enzimática en la obtención de tableros de fibras, quedando por analizar la utilización del licor hidrolizado de la hidrólisis enzimática.

La búsqueda de nuevas formulaciones para la fermentación de etanol ha sido pertinente desde hace años, de ahí que se han obtenido resultados favorables en las formulaciones de mezclas de miel, jugo de los filtros y vinaza en la obtención de etanol¹². Precisamente, motivado por lo novedoso del tema en estudio, uno de los posibles usos del licor hidrolizado, puede ser en la formulación de mezclas azucaradas para la obtención de etanol, de ahí que explorar las posibilidades de estas formulaciones brindará, un sustrato azucarado al proceso, lo cual favorecerá en un menor consumo de miel y agua, y una reducción de miel por concepto de compra en tiempo de no zafra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la hidrólisis enzimática

Según estudios anteriores¹, se obtuvo un sólido residual pretratado con buenos resultados de digestibilidad, siguiendo la propuesta de reconversión en la etapa de hidrólisis ácida del bagazo, tal y como se observa en la tabla 1, obteniendo mayor por ciento de celulosa y menor por ciento de ceniza.

Tabla 1 Comparación de los sólidos residuales con la modificación en la tecnología y la tradicional.

Índice	% (m/m) tecnología instalada	% (m/m) propuesta modificación
Humedad	55-60	55
Xilano residual	2,0	2,51
Celulosa	6,2	33,47
Lignina	30-34	17,9
Cenizas	9	2,5

A partir del mejor punto experimental obtenido de la hidrólisis ácida del bagazo producto de la reconversión¹, se procede a la etapa de hidrólisis enzimática del sólido pretratado.

La hidrólisis enzimática se realizó en un reactor de 6 L, considerando las mejores condiciones obtenidas

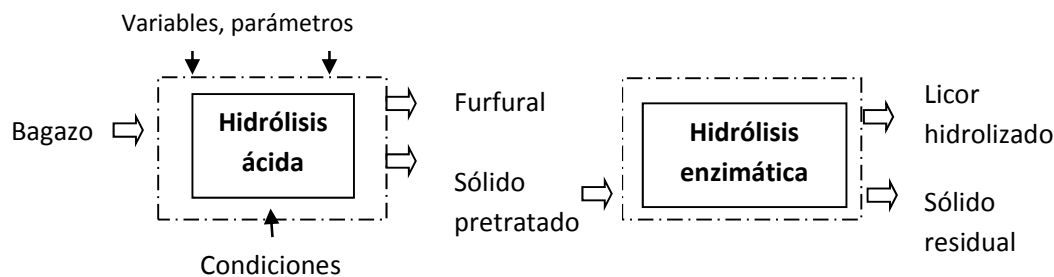


Figura 1. Esquema general de las etapas de pretratamiento del bagazo².

Precisamente, el trabajo en aras de continuar con el estudio de los productos obtenidos en el pretratamiento del bagazo, tiene como objetivo evaluar las posibilidades de utilización del licor hidrolizado del bagazo en la formulación de mezclas de sustratos azucarados para la fermentación y obtención de etanol.

a nivel de laboratorio en la etapa de hidrólisis enzimática^{3,4}, las cuales son:

- solución buffer de ácido acético y acetato de sodio de pH= 4,8.
- enzima celulasa con una actividad enzimática de 64,3 UPF (unidades de papel de filtro).
- 30 UPF/g y 2,5% de adición de tensoactivo comercial.

Se prepara para una muestra de 600 g de sólido pretratado con un 10 % de sólido, bajo un sistema de agitación de 175 rpm, durante 24 horas. Se utiliza para la evaluación del método balanza analítica Denver, estufa Biender, una centrífuga Eppendorf5417R a 15000 rpm, y un HPLC LY9100 con las siguientes especificaciones de trabajo: detector, IR; columna, CARBOsep CHO-682; volumen de inyección, 20µL; fase móvil, agua; flujo, 0,4 ml/min; presión, 350 psi; temperatura del horno, 80oC; tiempo de corrida, 30 min. Se realizan tres réplicas al experimento.

Tabla 2. Resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática

Exptos	Conv gluc/celi	Cgluc (g/L)	Rend ggluc/gbagi
1	0,35	12,66	15,02
2	0,30	12,76	15,30
3	0,32	12,05	14,86
4	0,34	12,49	15,06

Legenda: Conv gluc/celi: conversión de glucosa/celulosa inicial; Cgluc: concentración de glucosa en g/L; Rend ggluc/gbagi: rendimiento de gramos de glucosa/gramos de bagazo inicial.

En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos de las hidrolisis enzimática, en cuanto a la conversión de glucosa por celulosa de inicial, la concentración de glucosa final en la solución, así como el rendimiento en gramos de glucosa por bagazo inicial de la muestra pretratada.

Como resultado se obtiene una concentración promedio de glucosa en el hidrolizado de 12,49 g/L, y un rendimiento de glucosa de 15,06 g de glucosa/100g de bagazo inicial en el orden de lo obtenido³ (13,68 g/L y rendimiento de glucosa de 16,48 %) para una etapa de pretratamiento ácida y posterior hidrólisis enzimática.

Diseño de experimentos de las mezclas de sustratos azucarados

Para las fermentaciones alcohólicas a nivel de laboratorio, a partir de las diferentes mezclas de sustratos azucarados se fijaron las mismas condiciones de trabajo de una planta de etanol, partiendo del prefermento preparado en la fábrica. Las condiciones del inóculo obtenidas por el laboratorio de análisis, en el momento del estudio fueron de:

- Concentración=7,83 °Bx
- Temperatura=34 °C
- pH= 4,5
- Cuento celular: 288x10⁶ células/mL

- Gemación: 20 %; Viabilidad: 99 %
- Levadura: Saccharomyces cerevisiae

Se prepararon fermentaciones de 50 ml cada una, con un 10 % de inóculo y tres réplicas para cada punto de mezcla, para un tiempo de fermentación de 24 horas.

Los nutrientes añadidos fueron: urea: 3 g/L; sulfato de amonio: 3 g/L y fosfato de amonio: 3 g/L.

Los sustratos azucarados utilizados fueron: miel final (**MIEL**), jugo de los filtros (**JF**) e hidrolizado de bagazo (**HID**). Las condiciones experimentales tomadas en el momento del estudio para cada sustrato azucarado se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Condiciones experimentales de cada sustrato azucarado.

Características/Muestras	MIEL	JF	HID
°Bx	81,20	13	5
Densidad (g/mL)	1,497	1,06432	1,01795
pH	5,2	5,7	4,8
ART (g/L)	640,96	11,0	12,49

Para la preparación de las mezclas se fijaron las condiciones finales para una concentración de 120 g/L. (16°Bx, equivalente).

Para cada punto del diseño se determinaron los balances de masa para la adición de los sustratos azucarados con el objetivo de ahorrar miel y agua. El primer punto del diseño es con la mezcla tradicional de miel y agua. En los puntos restantes se utiliza para la dilución, el jugo de los filtros y el licor hidrolizado, así como se ajusta el balance para la reducción de miel. En el caso de los puntos de mezcla del licor hidrolizado de bagazo fue necesario la adición de miel para completar la base inicial de azúcares requeridos en la mezcla (**HIDM**).

Para el estudio de mezclas de sustratos azucarados se realiza un diseño de mezclas enrejado simplex con Centroides, con variable respuesta % alcohólico (ALC) alcohol en volumen por 100. La determinación de la concentración de etanol g/L se realizó en una columna de HPLC LY9100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la evaluación del diseño de experimentos de mezclas se utiliza el Statgraphics 4.1. A continuación, en la tabla 4 se muestran los resultados. Como se puede observar, para todos los puntos de mezclas se obtienen resultados de por cientos alcohólicos, en el orden de los obtenidos para fermentaciones (4-6,5 % alcohólico)^{12,13,14}.

Tabla 4 Resultados del diseño de mezclas de sustratos azucarados.

Puntos	MIEL X ₁	JF X ₂	HIDM X ₃	C (g/L)	%ALC Y ₁
1	1	0	0	42,74	5,38
2	0	1	0	35,28	4,39
3	0	0	1	34,36	4,31
4	0,5	0,5	0	37,66	4,68
5	0,5	0	0,5	38,19	4,78
6	0	0,5	0,5	40,08	5,06
7	0,33	0,33	0,33	42,04	5,29

A continuación en la tabla 5, se muestran los modelos de ajuste que describen el comportamiento y la influencia de la variable dependiente % Alc (Y1) con las variables de mezclas de los diferentes sustratos. Se obtienen mejores ajustes para un modelo cubico especial, para un R² de 99,90 %, un R²ajustado de 99,83 %, un error estándar estadístico en el orden de 0,0163 y un Durbin Watson estadístico de 1,913. El modelo de ajuste es el siguiente:

$$Y_1 = 5,35333 * X_1 + 4,36 * X_2 + 4,30667 * X_3 - 0,813333 * X_1 * X_2 - 0,306667 * X_1 * X_3 + 2,82667 * X_2 * X_3 + 10,7202 * X_1 * X_2 * X_3$$

Tabla 5. Resultados del Modelo Completo

Modelo	ES	R-Cuadrada	R-Cuadrada Ajd.
Lineal	0,34856	37,84	22,30
Cuadrático	0,15023	90,62	85,57
Cúbico Especial	0,0163299	99,90	99,83

Partiendo del modelo cubico especial, se procede a la optimización del modelo, maximizando la variable de salida Y1. En la figura 1 se observan los diferentes contornos que realiza el software hasta llegar a la región del óptimo, identificando como el punto óptimo del diseño de mezcla, el cual responde a la mezcla de los tres componentes, con las siguientes composiciones: X₁: 0,299, X₂: 0,342 y X₃: 0,358, para un %alcohólico de 5,26. Es importante aclarar, que para los efectos reales, la región del óptimo es considerada como la región de trabajo para una primera aproximación de los resultados obtenidos con estas formulaciones.

En la figura 2 y 3 se muestra, la superficie de respuesta estimada, así como los contornos de la superficie de respuesta, respectivamente. En la práctica industrial se trabaja en la región cercana al óptimo. Las mezclas dependerán de los balances de masa y de las variaciones de las concentraciones de los sustratos y los inóculos.

La utilización de las mezclas de diferentes sustratos favorece el proceso de fermentación, si se tiene en cuenta que se aprovechan los jugos de los filtros y el licor hidrolizado para la dilución de las mieles, además de aportar azúcares a la mezcla a fermentar. Al realizar los balances de masa en cada punto experimental, se obtiene el por ciento que representa en ahorro en

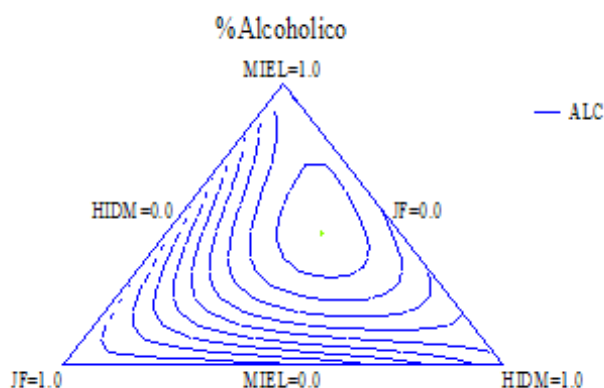


Figura 1. Contornos del óptimo de la mezcla.

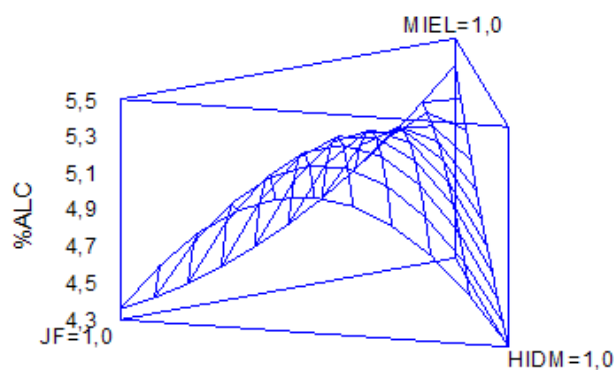


Figura 2. Superficie de respuesta estimada.

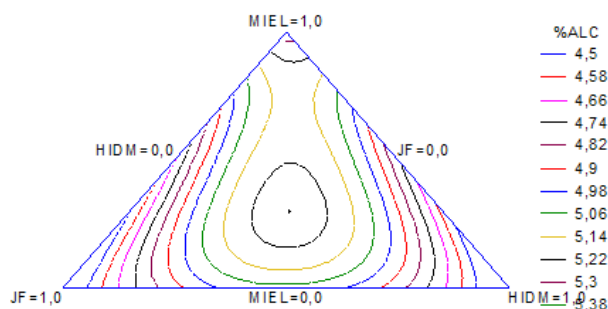


Figura 3. Contornos de la superficie de respuesta estimada

miel y en agua para cada punto con respecto al punto origen de miel + agua, tal y como se representa en la tabla 6, lo cual resulta interesante al lograr disminuciones de estas materias primas que inciden en los costos de producción del proceso.

Tabla 6 Por ciento que representan en ahorro de miel y agua.

No.	Puntos	%Ahorro Miel	%Ahorro H ₂ O
1	MIEL	-	-
2	JF	100	100
3	HIDM	26,74	92,19
4	MIEL+JF	77,68	78,91
5	JF+HIDM	26,74	92,19
6	MIEL+HIDM	50,00	49,30
7	MIEL+HIDM+JF	67,00	22,73

El estudio preliminar de estas mezclas de sustratos resulta novedoso para la utilización del licor hidrolizado obtenido del fraccionamiento e hidrólisis enzimática del bagazo. Es importante señalar, que el punto óptimo obtenido solo debe considerarse para una aproximación en el estudio hacia la región del óptimo y una valoración de las posibilidades y potencialidades de mezclas de estos sustratos.

CONCLUSIONES

De los estudios preliminares de utilización del licor hidrolizado de bagazo en la fermentación de mezclas de sustratos azucarados, con mieles y jugos de los filtros, se obtienen resultados satisfactorios. La incorporación del licor hidrolizado brindará un sustrato azucarado al proceso, lo cual favorecerá en un menor consumo de miel y agua, y una reducción de miel por concepto de compra en tiempo de no zafra. Las condiciones de estas mezclas deberán analizarse de manera independiente y dependerán, no solo de los resultados tecnológicos, sino también del análisis de factibilidad económica y su aplicación en cada instalación industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Morales-Zamora, M.; Espino-Leal, I.; Mesa-Garriga, L.; Acosta-Martínez, D.; González-Suárez, E.; Castro-Galiano E. Evaluación de residuales de la hidrólisis ácida del bagazo como productos de alto valor añadido. *Afinidad*. **2011**, 68, 455-460.
- Morales-Zamora, M.; González-Suárez, E.; Mesa-Garriga, L.; Avances en la obtención de tableros de fibras a partir de mezclas de residuales lignocelulósicos de bagazo. *Afinidad*. **2016**, 73, 205-209.
- Mesa, L.; Morales, M.; González, E.; Cara, C.; Romero, I.; Castro, E.; Mussato S. Restructuring the processes for furfural and xylose production from sugarcane bagasse in a biorefinery concept for ethanol production. *Chem. Eng. Process*. **2014**, 85, 196-202.
- Mesa, L.; González, E.; Ruiz, E.; Romero, I.; Cara, C.; Felissia, F.; Castro, E. Preliminary evaluation of organosolv pretreatment of sugar cane bagasse

- for glucose production. Application of 2³ experimental design. *Appl. Energy* **2012**, 87, 109-114.
- Gálvez, L.O. La producción diversificada de la agroindustria de la caña de azúcar. Manual de los derivados de la caña de azúcar (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba. 2000, pp. 3-17.
 - Hernández, M.T.; Mesa, L.; González, E.; Jover, J. (2005) Bioetanol. En: Combustibles Alternativos. Cámara del libro de Argentina. 2005, ISBN: 987-1076-77-0.
 - Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biore-source Technology*. **2002**, 83, 1-11.
 - Banerjee, R.; Pandey, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: A technological perspective. *Int. Sugar J.* **2002**, 104, 64-68.
 - Lavarack, B.P.; Griffin, G.J.; Rodman, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products, *Biomass Bioenergy*. **2002**, 23, 367 – 380
 - Martin, C.; Galbe, M.; Wahlbom, F.; Han-Haderhal, B.; Jonson, L. Ethanol production from enzymatic hydrolyzate of sugar cane bagasse using recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 31, 274-282.
 - Galbe M, Zacchi G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 618-628
 - Fabelo, J. Estudio de la etapa e fermentación alcohólica utilizando mezclas de diferentes sustratos. Tesis para la obtención del Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas (PhD), 1999.
 - Raghav, R.; Sivaraman, H.; Gonhale, D.V.; Seetarama, R. Ethanol fermentation of cane Molasses by Highly Flocculent yeast. *Biotechnol. Lett.* **1989**, 11, 739-744
 - Van Walsum, G.P.; Allen, S.G.; Spencer, M.J.; Laser, M.S.; Antal, M.J.; Lynd, L.R. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* **1996**, 57/58, 157-170.