



Ingeniería. Revista de la Universidad de  
Costa Rica

ISSN: 1409-2441

marcela.quiros@ucr.ac.cr

Universidad de Costa Rica  
Costa Rica

Torres Contreras, Francisco; Molina Córdoba, Manuel. E.  
Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de bAGAZO, con pretratamiento  
alcalino

Ingeniería. Revista de la Universidad de Costa Rica, vol. 22, núm. 2, julio-diciembre,  
2012, pp. 29-44

Universidad de Costa Rica  
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44170527003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO, CON PRETRATAMIENTO ALCALINO

*Francisco Torres Contreras  
Manuel E. Molina Córdoba*

### Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar a nivel de laboratorio el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa del bagazo de la caña de azúcar a glucosa, utilizando una celulasa y una celobiasa, a partir de un pretratamiento alcalino.

Se pretrata bagazo con hidróxido de sodio a 121 °C durante 90 minutos, agregando 10 mL de una solución al 2 % (p/v) de hidróxido por gramo de bagazo seco. Se evalúa el rendimiento de la hidrólisis enzimática, manteniendo fijos el pH y la temperatura, y variando la concentración de enzima y bagazo, y el tamaño de partícula. Se utilizó dos tamaños de partícula: de 1,41 a 3,36 mm y de 0,71 a 1,00 mm. Se empleó concentraciones de enzima de 3 FPU/g y 8 FPU/g, y concentraciones de bagazo de 8 g/L y 12 g/L. La temperatura se mantuvo en 50 °C, y el pH a 4,8. Se mide la concentración de glucosa, azúcares reductores y pentosas.

Los mayores rendimientos obtenidos son 70,2 % de glucosa, y 83,6 % de azúcares reductores. Estos se obtienen a una concentración de enzima de 8 FPU/g, una concentración de bagazo de 8 g/L, y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm. Al incrementar la concentración de enzima a 20 FPU/g, y manteniendo la concentración de bagazo de 8 g/L, y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm, se obtiene un rendimiento de glucosa de 91,7 %.

Al hidrolizar enzimáticamente un lote de bagazo, con una concentración de enzima de 15 FPU/g, una concentración de bagazo de 8 g/L, y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm, durante 52 horas, y fermentarlo a 32 °C por 30 horas, se obtiene una concentración de etanol de 3,72 % (m/m), para una productividad de 1,24 g/L h.

**Palabras clave:** Hidrólisis enzimática, pretratamiento alcalino, celulasas, bagazo de caña.

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the laboratory's performance of the hydrolysis of bagasse using a cellulase and a cellobiase, from alkaline pretreatment of bagasse from sugar cane.

The bagasse was pretreated with sodium hydroxide at 121 °C for 90 minutes, adding 10 mL of a 2 % solution (w/v) of hydroxide per gram of dry bagasse. The performance of the enzymatic hydrolysis was evaluated, while fixed pH and temperature, and varying the concentration of enzyme and bagasse, and the particle size. The particle sizes used are 1,41 to 3,36 mm and 0,71 to 1,00 mm. The concentration of enzyme used are 3 FPU/g and 8 FPU/g. Bagasse concentrations employed are 8 g/L and 12 g/L. The temperature is maintained at 50 °C, and pH at 4,8. The concentration of glucose, reducing sugars and pentoses, are measured.

The highest yields were 70,2 % of glucose, 83,6 % of reducing sugars, and 37,7 % of pentoses. The highest yield of glucose and reducing sugars were obtained at a concentration of enzyme of 8 FPU/g, a concentration of bagasse of 8 g/L, and a particle size of 1,41 to 3,36 mm. By increasing the concentration of enzyme at 20 FPU/g, and maintaining the concentration of bagasse at 8 g/L, and a particle size of 1,41 to 3,36 mm, the glucose yield goes up to 91,7%.

Enzymatic hydrolysis of a lot of bagasse, with an enzyme concentration of 15 FPU/g, a concentration of bagasse of 8 g/L, and a particle size of 1,41 to 3,36 mm, during 52 hours, and fermented at 32 °C for 30 hours, carried out a concentration of ethanol of 3,72 % (w/w), for a yield of 1,24 g/L h.

**Keywords:** Enzymatic hidrolisis, alkali pretreatment, celulasas, sugar cane bagasse.

**Recibido:** 23 de enero del 2012 • **Aprobado:** 2 de octubre del 2012

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente demanda de combustibles y a la búsqueda de un mejor medio ambiente, se ha recurrido a obtener nuevas fuentes de energía. La energía renovable surge como una posible solución a los requerimientos energéticos de nuestra sociedad.

Una prometedora tecnología para la conversión de la biomasa en etanol es la conversión enzimática de celulosa en glucosa soluble. La celulosa es el compuesto biológico más abundante en el planeta y es sumamente resistente a la degradación. La biomasa está compuesta básicamente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico, obtenido en las centrales azucareras como desecho, representando el 25% del total de la caña de azúcar procesada; constituye el residuo fibroso que queda de la caña después de ser exprimida y de pasar por el proceso de extracción (Ferrer, Páez, Arenas, Chandler, Marmol y Sandoval, 2000).

Antes de pretratar la biomasa conviene fraccionarla o pulverizarla. La pulverización además de reducir el tamaño, cambia la cristalinidad de los materiales celulósicos y aumenta el área superficial y la densidad aparente. También es posible separar parte de la lignina de los carbohidratos, lo que facilita la degradación de celulosa para los microorganismos (Cen y Xia, 1999).

El tratamiento previo de los materiales lignocelulósicos antes de su utilización es una etapa necesaria en la conversión de biomasa a etanol. El objetivo del pretratamiento de la biomasa es hacer a los materiales más accesibles a la hidrólisis química o enzimática, y así lograr que la generación de productos sea más eficiente (Gong, Cao, Du y Tsao, 1999).

Una vez extraída la celulosa, es posible proceder a hidrolizarla. La degradación enzimática de la celulosa a glucosa es llevada a cabo por celulasas. Estas enzimas son producidas por muchos microorganismos como bacterias y hongos, por algunas plantas y algunos animales invertebrados. Una de las especies productoras de celulasas más conocida es la *Trichoderma sp* (Finch y Roberts, 1985).

La conversión de celulosa a polímeros de azúcar o a su monómero mediante hidrólisis es significativamente más compleja que la hidrólisis de almidón, esto porque en la celulosa los monómeros están unidos por enlaces  $\beta$  1-4:

La reacción puede ser catalizada por ácido o por enzimas. Las enzimas celulósicas son capaces de catalizar la reacción con rendimientos cercanos al 100 % a 50 °C (Huber, Iborra y Corma, 2006).

La hidrólisis de celulosa, es catalizada por un grupo básicamente de tres enzimas:

- endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, que ataca los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos).
- exo- $\beta$ -1,4-glucanasa, también llamadas celobiohidrolasas, que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula.
- $\beta$ -glucosidasa, o celobiasa, que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (Mosier, Hall, Ladisch y Ladisch, 1999).

Los sistemas celulolíticos poseen enzimas de los tres grupos. El sistema celulolítico de los hongos filamentosos *Trichoderma reesei* contiene dos celobiohidrolasas, cuatro endoglucanasas, y una  $\beta$ -glucosidasa.

Dada la importancia para Costa Rica, el sustituir parcialmente la gasolina por bioetanol y utilizar fuentes que no compitan con los requerimientos de alimentación de la población como el maíz, yuca y otros, es importante evaluar a nivel de laboratorio el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa utilizando una celulasas y una celobiasa, a glucosa a partir del pretratamiento alcalino del bagazo de la caña de azúcar.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Sustrato

La materia prima es bagazo de caña morada o barbados (*Saccharum sp*). El bagazo se obtuvo de la zona de Tucurrique, Cartago.

### 2.2 Enzimas

Se utilizan las enzimas comerciales Celluclast® obtenida de una cepa seleccionada del hongo *Trichoderma reesei* y la enzima Novozyme 188. La Celluclast® tiene como objetivo romper el material celulósico para la producción de azúcares fermentables.

Los principales productos de reacción de la hidrólisis de material celulósico con Celluclast® son celobiosa y glucosa. La celobiosa no es un azúcar fermentable. Por lo tanto, para obtener una conversión máxima a azúcar fermentable, se debe utilizar una celobiasa como Novozyme 188.

## 2.3 Equipo experimental

- **Pretratamiento:** Todas las pruebas se realizan en una autoclave Tomin®, a una temperatura de 121 °C durante 90 minutos, utilizando una solución de hidróxido de sodio al 2%.
- **Hidrólisis enzimática del bagazo:** Cada ensayo se realiza a un volumen de 300 mL, utilizando erlenmeyers de 500 mL y se colocan en una incubadora que cuenta con agitación y temperatura controlada.

## 2.4 Métodos de análisis

- **Glucosa:** Para cuantificar la concentración de glucosa se utiliza el método espectrofotométrico de Trinder, las lecturas se realizan en un Spectronic 20 a una longitud de onda de 500 nm (Tico Lab SA, 2002).
- **Azúcares reductores:** Se utiliza el método espectrofotométrico de Nelson Somogyi (Southgate, 1976). Las mediciones se realizan en un Spectronic 20 a una longitud de onda de 500 nm.
- **Pentosas:** La concentración de pentosas se determina mediante el método espectrofotométrico de Bial modificado por Horecker (Colowick y Kaplan, 1957). Las absorbancias de las muestras son leídas en un Spectronic 20 a una longitud de onda de 670 nm.
- **Actividad de las celulasas:** Esta se mide en términos de una unidad estándar denominada FPU por sus siglas en inglés (Filter Paper Unit). Una unidad FPU se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 2 mg de glucosa en 0,5 mL de buffer de citrato a partir de 50 mg de papel de filtro Whatman N° 1, en un tiempo 60 minutos, a un pH de 4,8 y una temperatura de 50 °C, según el ensayo descrito por Adney y Baker (1996).

## 2.5 Pretratamiento del bagazo

Se seleccionan los métodos alcalinos que utilizan hidróxido de sodio e hidróxido de calcio. Además, se pretrata el bagazo con agua caliente para efecto de comparación. En cada pretratamiento se mantienen las mismas condiciones de concentración y temperatura. Estos se llevan a cabo a 121 °C durante 90 minutos, agregando 10 mL de una solución al 2 % (p/v) del hidróxido por gramo de bagazo seco. Para el agua, se agregan 10 mL de agua por gramo de bagazo seco.

Para seleccionar el método alcalino de pretratamiento, se hidroliza enzimáticamente bagazo durante 52 horas, fijando la temperatura en 50 °C, la concentración de bagazo a 12,5 g/L, la concentración de enzima a 3,2 FPU/g, y el pH a 4,8. El método de pretratamiento seleccionado será aquel con el cual se obtenga el mayor rendimiento de glucosa.

## 2.6 Hidrólisis del bagazo

Seleccionado el método de pretratamiento, se procede a evaluar el rendimiento de la hidrólisis enzimática de bagazo, manteniendo el pH a 4,8 y la temperatura a 50 °C, y se varía la concentración de enzima, bagazo y el tamaño de partícula. El tiempo de reacción se mantiene en 52 h, previamente a las 28 h se toma una muestra y se analiza. Las corridas experimentales se distribuyen en un diseño factorial 2<sup>3</sup>.

Las concentraciones de enzima utilizadas son de 3 FPU/g y 8 FPU/g. Las concentraciones de bagazo empleadas son de 8 g/L y 12 g/L y para los tamaños de partícula se utilizan en los ámbitos de 1,41 a 3,36 mm y de 0,71 a 1,00 mm respectivamente. La variable de repuesta es el rendimiento de la hidrólisis, ésta se expresa respecto a la glucosa. Además se miden los azúcares reductores y las pentosas formadas.

## 2.7 Efecto de la concentración de enzima

Con las mejores condiciones obtenidas de la etapa de hidrólisis, se evalúa el efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de la hidrólisis enzimática manteniendo fijos la concentración de bagazo y tamaño de partículas.

## 2.8 Fermentación

Se le agrega 0,25 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,5 g/L de fosfato de sodio, 3 g/L de nitrato de amonio, 0,5 g/L de extracto de levadura y 1,5 mg/L de tiamina al caldo producido en la hidrólisis enzimática; el pH se ajusta a 4,5. Para producir la fermentación se agrega *S. cereviceae*, cepa utilizada en panificación. La fermentación se realiza a 32 °C durante 30 horas. Concluido el tiempo de reacción, se toma una muestra de 50 mL, y se coloca esta muestra en un balón de 100 mL y se afora con agua destilada. Se destila la mezcla hasta obtener 50 mL de destilado, y se lee el índice de refracción para determinar la concentración de etanol producida.

## 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 3.1 Selección del método de pretratamiento

Para seleccionar el método alcalino de pretratamiento, se hidroliza enzimáticamente bagazo durante 52 horas. Las condiciones de la hidrólisis se mantienen fijas para cada pretratamiento, manteniendo la temperatura en 50 °C, la concentración de bagazo a 12,5 g/L, la concentración de enzima a 3,2 FPU/g, y el pH en 4,8.

Se organizan los ensayos en un diseño de dos bloques y tres tratamientos, en donde se varían los métodos de pretratamiento escogidos y el tamaño de partícula del bagazo. El material se pretrata ya sea con hidróxido de sodio, hidróxido de calcio o agua. Se utilizan tamaños de partícula en los ámbitos de 1,41 a 3,36 mm y de 0,71 a 1,00 mm.

En el Cuadro 1, se muestran los rendimientos de glucosa y azúcares reductores. El rendimiento se calcula como la razón de la concentración de glucosa o azúcares reductores respecto a la concentración de material celulósico pretratado en base seca.

Se obtiene un rendimiento de glucosa de 16 % al pretratar el bagazo con agua durante 90 minutos a 121 °C. Sreenath, Koegel, Moldes, Jeffries y Straub (1999) reportan un rendimiento de 48 % al pretratar alfalfa con agua a 220 °C por 2 minutos.

Al pretratar el bagazo con hidróxido de calcio, bajo las mismas condiciones, se alcanza un rendimiento de 22 %, utilizando una concentración de enzima de 3,2 FPU/g en la etapa de hidrólisis. Kim (2004) reporta un rendimiento de 93,2 % al pretratar cañas y hojas de maíz con hidróxido de calcio por cuatro semanas, utilizando en la etapa de hidrólisis una concentración de enzima de 15 FPU/g. Zhu (2005) reporta un rendimiento de 60 % al pretratar cañas y hojas de maíz con hidróxido de calcio por 2 horas a 100 °C, y utilizando 72 horas en la hidrólisis, con una concentración de enzima de 5 FPU/g.

**Cuadro 1.** Rendimiento de glucosa y azúcares reductores según el tipo de pretratamiento

Tipo de pretratamiento	Rendimiento de glucosa (%)	Rendimiento de azúcares reductores (%)
Agua	16,75	25,89
Hidróxido de calcio	21,33	41,17
Hidróxido de sodio	41,43	58,83

Fuente: Elaboración propia, 2012.

El mayor rendimiento de glucosa fue de 42 % al tratar el bagazo. Silverstein, Chen, Sharma-Shivappa, Boyette y Osborne (2007) reportan un rendimiento de glucosa de 60,8 % al pretratar tallos de algodón con hidróxido de sodio al 2 % (p/v) durante 90 minutos a 121 °C, y su posterior hidrólisis utilizando una concentración de enzima de 40 FPU/g durante 72 horas. Mussatto, Fernández, Milagresa y Roberto (2007), reportan un rendimiento de 91,8 % al pretratar cereal con álcali diluido utilizando una concentración de enzima de 45 FPU/g durante 96 horas.

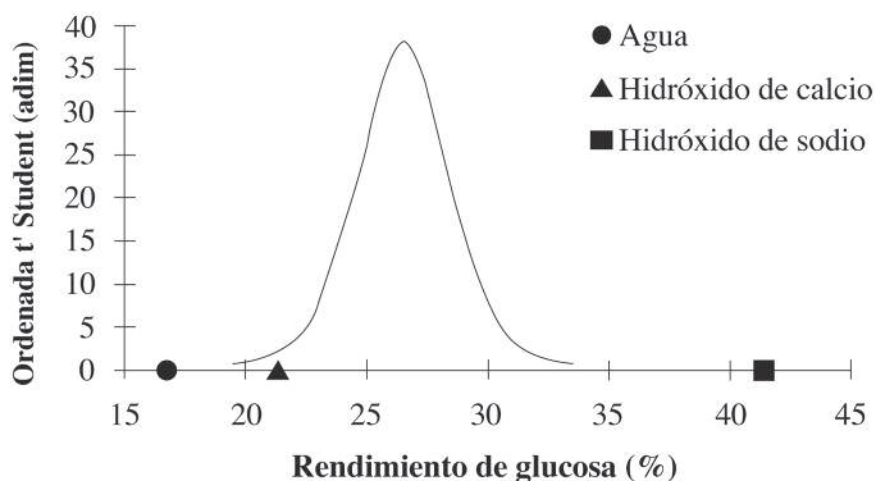
En la Figura 1, se presenta una gráfica de distribución *t*-student, se aprecia como los rendimientos respecto a la glucosa se encuentran entre valores de 16 y 42 %. El rendimiento de glucosa al pretratar el bagazo con hidróxido de sodio aumenta sustancialmente respecto a los otros dos métodos. El rendimiento obtenido al pretratar el material con agua es el menor de los tres procedimientos, seguido por el calcio. El rendimiento alcanzado utilizando hidróxido de sodio como pretratamiento (42 %) es aproximadamente el doble del obtenido al emplear hidróxido de calcio.

En el Cuadro 2, se presenta el análisis de varianza para el rendimiento de glucosa, éste

muestra como el tipo de pretratamiento afecta significativamente el rendimiento de glucosa, no hay un efecto significativo para la interacción entre el tamaño de partícula y el tipo de pretratamiento. El efecto tamaño de partícula no afecta el rendimiento de glucosa, aunque se encuentra cerca del límite de decisión.

En la Figura 2, se muestra como el rendimiento de azúcares reductores al pretratar el bagazo con hidróxido de sodio de 60 % es mayor respecto a los otros dos métodos. Se observa el mismo comportamiento presentado por el rendimiento de glucosa, es decir, con el agua se obtiene el menor rendimiento de azúcares reductores, seguido del hidróxido de calcio. Los rendimientos aumentaron con el tiempo a valores entre 25 y 60 %.

El análisis de varianza para el rendimiento de azúcares reductores que se presenta en el Cuadro 3, muestra como el tamaño de partícula no afecta el rendimiento de azúcares reductores y el tipo de pretratamiento afecta estadísticamente el rendimiento de azúcares reductores. La interacción entre el tamaño de partícula y el tipo de pretratamiento es estadísticamente significativa.



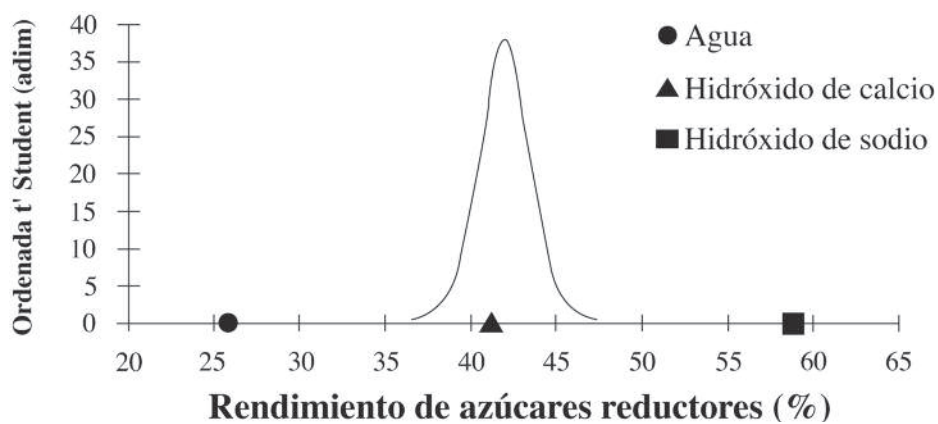
**Figura 1.** Distribución *t* para el rendimiento de glucosa.

Fuente: Elaboración propia, 2012.

**Cuadro 2.** Análisis de varianza para el rendimiento de glucosa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	F <sub>0,05</sub>	F <sub>0,01</sub>
Tamaño de partícula	270,86	1	270,86	13,24	5,99	13,74
Pretratamientos	1378,45	2	689,23	33,70	5,14	10,93
Interacción	15,96	2	7,98	0,39	5,14	10,92
Dentro del grupo	122,72	6	20,45			
Total	1788,00	11				

Fuente: Elaboración propia, 2012.

**Figura 2.** Distribución t para el rendimiento de azúcares reductores.

Fuente: Elaboración propia, 2012.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza para el rendimiento de azúcares reductores

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	F <sub>0,05</sub>	F <sub>0,01</sub>
Tamaño de partícula	12,65	1	12,65	1,03	5,98	13,74
Pretratamientos	2172,73	2	1086,37	88,54	5,14	10,92
Interacción	374,20	2	187,09	15,25	5,14	10,92
Dentro del grupo	73,62	6	12,27			
Total	2633,20	11				

Fuente: Elaboración propia, 2012.

En síntesis, el método de pretratamiento que utiliza hidróxido de sodio es el que presenta los mayores rendimientos de glucosa y azúcares reductores, razón por la que este método de pretratamiento se utiliza en las siguientes etapas experimentales.

### 3.2 Análisis de la hidrólisis enzimática

Seleccionado el método de pretratamiento, se procede a evaluar el rendimiento de la hidrólisis enzimática, manteniendo fijos el pH y la temperatura, y variando la concentración de enzima, la concentración de bagazo y el tamaño de partícula. Se utilizan tamaños de partícula de 1,41 a 3,36 mm y de 0,71 a 1,00 mm. Se tratan 15 gramos de bagazo de cada tamaño de partícula con 150 mL de hidróxido de sodio al 2 % (p/v), a 121 °C durante 90 minutos.

La hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada se realiza durante 52 horas, manteniendo la temperatura a 50 °C, la agitación a 70 rev/min, y el pH a 4,8. Se utiliza una carga enzimática

de 3 FPU/g y 8 FPU/g. Las concentraciones de bagazo empleadas son de 8 g/L y 12 g/L.

Los rendimientos de glucosa, azúcares reductores y pentosas obtenidos en cada experimento se muestran en el Cuadro 4. El mayor rendimiento de glucosa (70 %) y el mayor rendimiento de azúcares reductores se obtienen en el Experimento 6. El mayor rendimiento de pentosas se alcanza en el Experimento 5, con un 38 %.

En el Cuadro 5, se muestran los valores de los efectos e interacciones obtenidos a partir de la evaluación del rendimiento de glucosa. Se encuentra que el efecto del tamaño de partícula es significativo, mientras que el efecto de la concentración de enzima y la interacción entre la concentración de bagazo y el tamaño de partícula caen dentro del ámbito de no significancia, aunque se encuentran cerca del límite.

En la Figura 3, se muestra el gráfico de calificación normal para el rendimiento de glucosa, en la cual se aprecia como el tamaño de partícula ( $E_3$ ) se desvía respecto a la linealidad, mientras que la concentración de enzima ( $E_1$ ) y la interacción entre la concentración de bagazo y el tamaño



**Cuadro 4.** Rendimientos de glucosa, azúcares reductores y pentosas

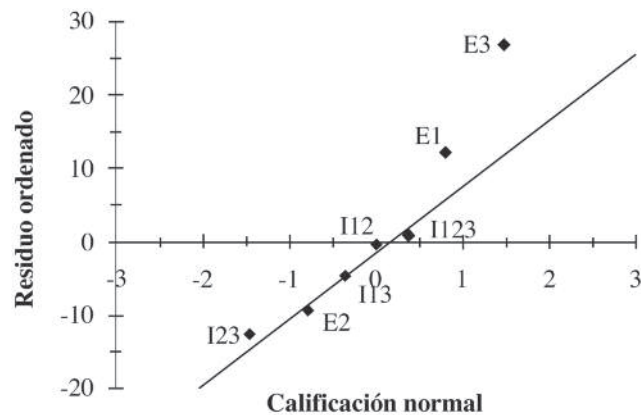
Experimento	Rendimiento de glucosa (%)	Rendimiento de azúcares reductores (%)	Rendimiento de pentosas (%)
1	18,26	33,36	9,27
2	36,11	49,05	17,46
3	22,52	28,82	20,83
4	38,32	51,79	26,34
5	63,04	73,94	37,74
6	70,23	83,63	32,96
7	40,73	47,29	30,05
8	48,72	52,24	26,48

Fuente: Elaboración propia, 2012.

**Cuadro 5.** Análisis estadístico para el rendimiento de glucosa

Significado	Estimado
Promedio, rendimiento de glucosa, $\mu$	42,24
Efecto 1, concentración de enzima, E1	12,21
Efecto 2, concentración de bagazo, E2	-9,34
Interacción 1-2, I12	-0,31
Efecto 3, tamaño de partícula, E3	26,88
Interacción 1-3, I13	-4,62
Interacción 2-3, I23	-12,57
Interacción 1-2-3, I123	0,71
Intervalo de no significancia estadística, 95 % de confianza	[-14,85, 14,85]

Fuente: Elaboración propia, 2012.



**Figura 3.** Calificación normal de los efectos e interacciones sobre el rendimiento de glucosa.

de partícula ( $I_{23}$ ), presentan cierta desviación respecto a la linealidad, en especial la concentración de enzima. Lo anterior confirma lo establecido por el intervalo de no significancia.

Los datos del rendimiento de azúcares reductores presentado en el Cuadro 4, permiten obtener los valores de los efectos e interacciones que se muestran en el Cuadro 6, y el gráfico de calificación normal que se muestra en la Figura 4.

El efecto del tamaño de partícula es estadísticamente significativo, mientras que el efecto de la concentración de enzima y la interacción entre la concentración de bagazo y el tamaño de partícula, caen dentro del ámbito de no significancia. Es decir, se presenta un comportamiento similar entre los efectos e interacciones para los rendimientos de glucosa y azúcares reductores a un tiempo de reacción de 52 horas.

**Cuadro 6.** Análisis estadístico para el rendimiento de azúcares reductores

Significado	Estimado
Promedio, rendimiento de glucosa, $\mu$	51,53
Efecto 1, concentración de enzima, E1	15,29
Efecto 2, concentración de bagazo, E2	-13,00
Interacción 1-2, I12	-1,33
Efecto 3, tamaño de partícula, E3	25,48
Interacción 1-3, I13	-7,97
Interacción 2-3, I23	-16,02
Interacción 1-2-3, I123	-1,04
Intervalo de no significancia estadística, 95 % de confianza	[-18,29, 18,29]

Fuente: Elaboración propia, 2012.

De igual manera, este comportamiento se verifica en la Figura 4, en la cual se observa que el tamaño de partícula (E3) es significativo, mientras que la concentración de enzima (E1) y la interacción entre la concentración de bagazo y el tamaño de partícula ( $I_{23}$ ), presentan cierta desviación respecto a la linealidad.

Puesto que el tamaño de partícula es estadísticamente significativo, se obtiene mayores rendimientos de glucosa, azúcares reductores y pentosas al utilizar el tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm. No se encontró significancia estadística de la concentración de enzima para un tiempo de reacción de 52 horas, pero es evidente su efecto en el rendimiento de glucosa. Esto se muestra en la Figura 5 y Figura 6, en las cuales se nota un aumento de al menos 15 % en el rendimiento de glucosa, al aumentar la concentración de enzima de 3 FPU/g a 8 FPU/g, para el caso de un tamaño de partícula de 0,71 a 1,00 mm, tanto para el caso de una cantidad de 8 g/L o 12 g/L de bagazo.

Según Ilanes (1994) entre mayor sea la concentración de las enzimas, más rápido se lleva a cabo el proceso. De manera que, la concentración de glucosa es mayor al aumentar la cantidad de enzima en un periodo de tiempo. Sin embargo, según Tolan y Foody (1999), para la mayoría de materiales celulósicos, existe un límite superior para el grado de conversión.

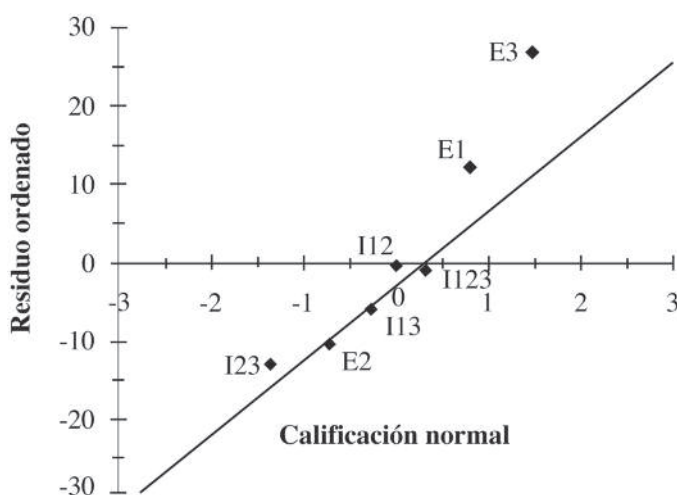
En este punto, la accesibilidad de la enzima a celulosa restante es limitada, ya sea por su estructura de poros o la presencia de componentes no celulósicos.

Estadísticamente, la concentración de bagazo no presenta un efecto significativo, sin embargo se encuentra que éste contribuye a mejorar los rendimientos. En las Figura 7 y Figura 8, se aprecia como la concentración de bagazo afecta los rendimientos de glucosa y azúcares reductores, siendo la concentración de 8 g/L con la que se obtienen mejores resultados.

Se alcanzan rendimientos de pentosa de hasta 38 % (Cuadro 4) para el bagazo, esto se debe a la presencia de parénquima en el bagazo luego del lavado. El parénquima contiene hemicelulosa, la cual está compuesta por pentosas, entre ellas xilosa.

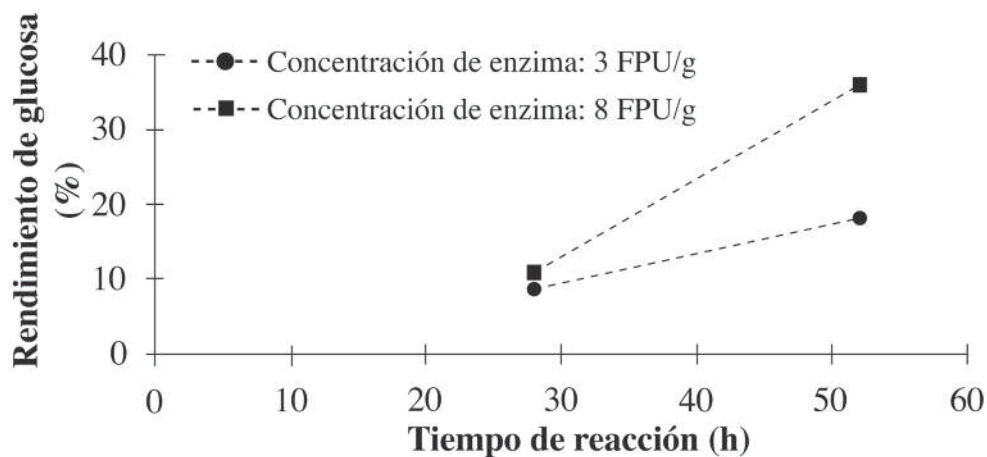
En la Figura 9, se muestran dos microfotografías del bagazo, antes y después del pretratamiento. Se aprecia como antes del pretratamiento las fibras están rodeadas por parénquima, y luego del pretratamiento es posible distinguir los haces de fibras, aún cuando hay parénquima en el bagazo.

El parénquima que queda en el bagazo pretratado se va liberando al ir avanzando la hidrólisis enzimática, debido a que las enzimas rompen las paredes de celulosa de las fibras, de esta manera, el rendimiento de pentosas aumenta con el tiempo de reacción.



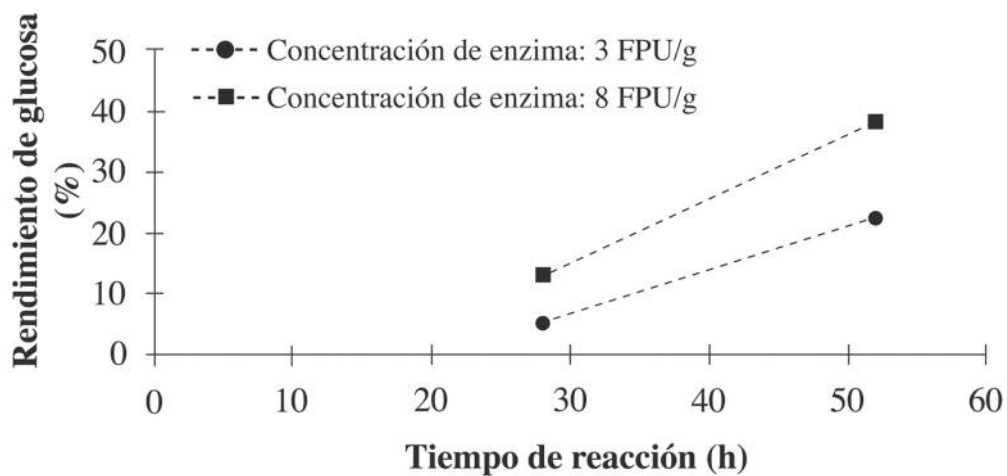
**Figura 4.** Calificación normal de los efectos e interacciones sobre el rendimiento de azúcares reductores.

Fuente: Elaboración propia, 2012.



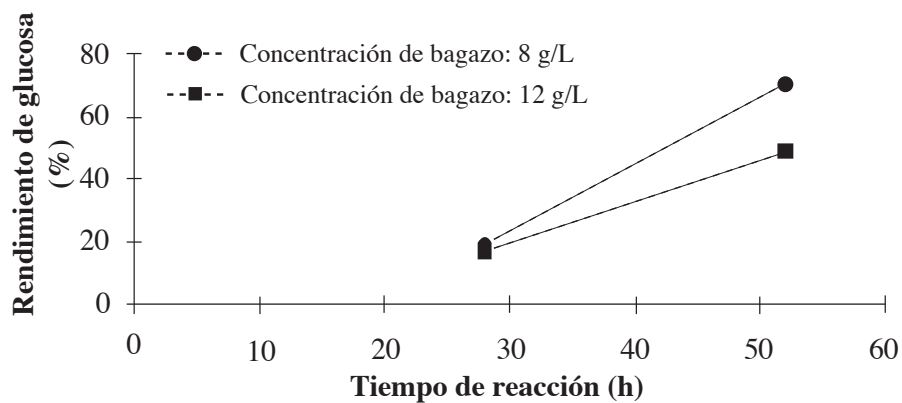
**Figura 5.** Rendimiento de glucosa a una concentración de bagazo de 8 g/L y un tamaño de partícula de 0,71 a 1,00 mm.

Fuente: Elaboración propia, 2012.



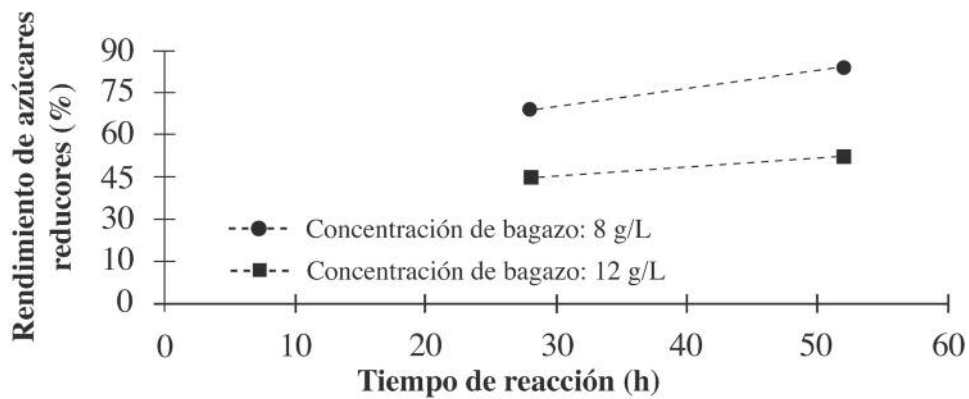
**Figura 6.** Rendimiento de glucosa a una concentración de bagazo de 12 g/L y un tamaño de partícula de 0,71 a 1,00 mm.

Fuente: Elaboración propia, 2012.



**Figura 7.** Rendimiento de glucosa a una concentración de enzima de 8 FPU/g y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm.

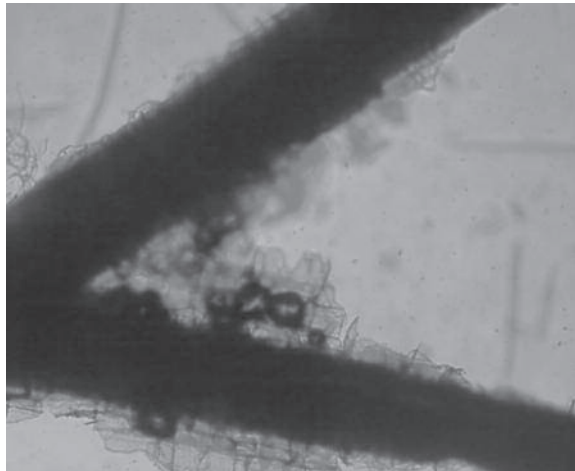
Fuente: Elaboración propia, 2012.



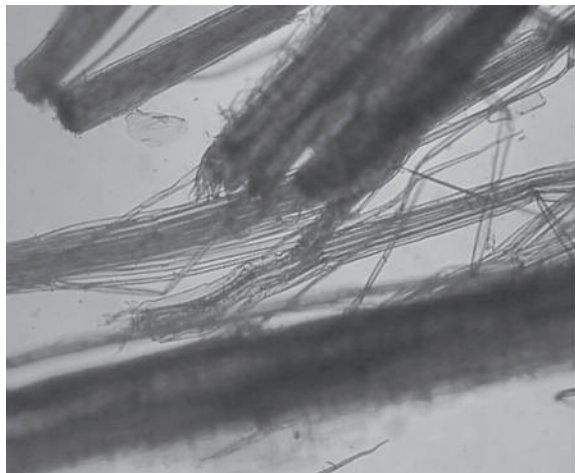
**Figura 8.** Rendimiento de azúcares reductores a una concentración de enzima de 8 FPU/g y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm.

Fuente: Elaboración propia, 2012.

a)



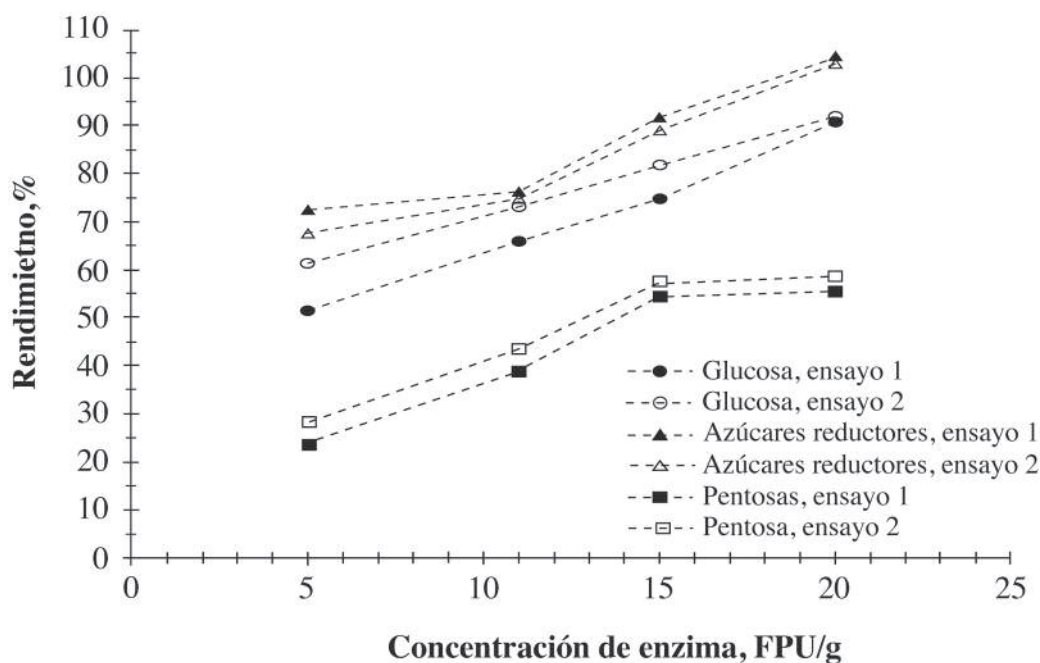
b)



**Figura 9.** Microfotografías de bagazo:

a) sin pretratar, b) pretratado.

Fuente: Elaboración propia, 2012.



**Figura 10.** Efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de la hidrólisis a un tiempo de reacción de 52 horas y a una concentración de bagazo de 8 g/L.

Fuente: Elaboración propia, 2012.

### 3.3 Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis

Fijando cada uno de los ensayos a una concentración de bagazo de 8 g/L, y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm, se evalúa el efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de la hidrólisis enzimática a un tiempo de reacción de 52 horas; se utiliza concentraciones de enzima de 5, 11, 15 y 20 FPU/g. Los resultados se muestran en la Figura 10.

En la Figura 10, se muestra como al incrementar la concentración de la enzima, el rendimiento de glucosa y de azúcares reductores aumenta. Para la concentración de enzima de 20 FPU/g, se obtiene un rendimiento 91,7 % de glucosa. Con esta concentración de enzima se alcanza el 100 % de rendimiento de azúcares reductores y, el rendimiento de pentosas se mantiene constante cerca de 55 %.

Estos resultados concuerdan con resultados reportados por Huber et al. (2006), en que las enzimas celulósicas son capaces de catalizar la

reacción con rendimientos cercanos al 100 % a 50 °C. Zhu (2005) reporta un rendimiento de 91,4 % al pretratar cañas y hojas de maíz con hidróxido de calcio por 2 horas a 100 °C, y su posterior hidrólisis enzimática durante 72 horas, utilizando una concentración de enzima de 60 FPU/g.

Como última etapa de este trabajo, un lote de bagazo con una concentración de bagazo de 8 g/L, un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm, y una concentración de enzima de 15 FPU/g, se hidroliza enzimáticamente durante un tiempo de reacción de 52 horas. El caldo producido en la hidrólisis enzimática se fermenta a 32 °C durante 30 horas. Concluido el tiempo de reacción, se destila la mezcla, obteniendo una concentración de etanol de 3,72 % (m/m). Así, la productividad obtenida para el bagazo de la caña de azúcar, es de 1,24 g/L h. Meléndez (2002) reporta una productividad de la fermentación a partir de yuca de 1,92 g/L h, mientras que González y Molina (2006) reportan una productividad de 2,72 g/L h a partir de papa.

#### 4. CONCLUSIONES

1. El mayor rendimiento de glucosa se obtiene al tratar el bagazo con hidróxido de sodio, seguido por el hidróxido de calcio y luego agua, con rendimientos de 51%, 29% y 26 % respectivamente. Los rendimientos de azúcares reductores son de 66 % para el hidróxido de sodio, 59 % para el hidróxido de calcio, y 31 % para el agua.
2. El tamaño de partícula (1,41 a 3,36 mm) aumenta el rendimiento de glucosa y azúcares reductores. Los mayores rendimientos fueron de 70,2 % de glucosa y 83,6 % de azúcares reductores, los cuales se obtuvieron a una concentración de enzima de 8 FPU/g, una concentración de bagazo de 8 g/L.
3. Al incrementar la concentración de enzima a 20 FPU/g y, manteniendo la concentración de bagazo de 8 g/L, un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm, se obtiene un rendimiento de glucosa de 91,7 %.
4. Al hidrolizar enzimáticamente un lote de bagazo, con una concentración de enzima de 15 FPU/g, una concentración de bagazo de 8 g/L, y un tamaño de partícula de 1,41 a 3,36 mm, durante 52 horas, al fermentarlo a 32 °C por 30 horas, se obtiene una concentración de etanol de 3,72 % (m/m), y una productividad de 1,24 g/L h.
5. El lavado constituye una etapa esencial después del pretratamiento para eliminar parénquima del material celulósico.
6. La reducción de pentosas es importante para evitar la posibilidad de inhibición de las enzimas.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Adney, B. & Baker, J. (1996). *Measurement of Cellulase Activities*. Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Cen, P. & Xia, L. (1999). Production of Cellulase by Solid-State Fermentation [Versión electrónica]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 68-92.
- Colowick, S. & Kaplan, N. (1957). *Methods in enzymology III: Preparation and assay of substrates*. Nueva York: Academic Press.
- Ferrer, J., Páez, G., Arenas de Moreno, L., Chandler, C., Mármol, Z. & Sandoval, L. (2002). Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar [Versión electrónica]. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 19, 23-33.
- Finch, P. & Roberts, J. (1985). Enzymatic degradation of cellulose. *Cellulose Chemistry and its applications*, 312-343.
- Gong, C., Cao, N., Du, J. & Tsao, G. (1999). Ethanol Production from Renewable Resources [Versión electrónica]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 207-241.
- González, J. & Molina, M. (2006). Estudios de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso de fermentación para la producción de alcohol a partir de papa. *Ingeniería*, 16(1), 29-39.
- Huber, G., Iborra, S. & Corma, A. (2006). Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering [Versión electrónica]. *Chemical Reviews*, 54(3), 1-55.
- Ilanes, A. (1994). *Biotecnología de enzimas*. Valparaíso: Ediciones Universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso.
- Kim, S. (2004). *Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Doctor en Ingeniería Química, Texas A&M University, Texas, Estados Unidos.
- Meléndez, I. (2002). *Estudio de la hidrólisis enzimática y el proceso fermentación para la producción de alcohol a partir de yuca, ñame y malanga*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Mosier, N., Hall, P., Ladisch, C. & Ladisch, M. (1999). Reaction Kinetics, Molecular Action, and Mechanisms of Cellulolytic Proteins [Versión electrónica]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 22-40.
- Mussatto, S., Fernandes, M., Milagres, A. & Roberto, I. (2007). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain [Versión electrónica]. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 124-129.
- Silverstein, R., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R., Boyette, M. & Osborne, J. (2007).



- A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks [Versión electrónica]. *Bioresource Technology*, 98(16), 3000-3011.
- Sreenath, H., Koegel, R., Moldes, A., Jeffries, T., & Straub, R. (1999). Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment. *Process Biochemistry*, 35, 33-41.
- Southgate, D. (1976). *Determination of Food Carbohydrates*. Londres: Applied Science Publications Ltd.
- Tico Lab S.A. (2002). *Determinación de Glucosa: Método de Trinder*. San José: Tico Lab S.A.
- Tolan, J. & Foody, B. (1999). Cellulase from Submerged Fermentation [Versión electrónica]. *Advances in Biochemical Engineering/Bio-technology*, 65, 41-67.
- Zhu, L. (2005). *Fundamental study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of*

*lignocellulosic biomass*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Doctor en Ingeniería Química, Texas A&M University, Texas, Estados Unidos.

## **SOBRE LOS AUTORES**

### **Francisco Torres Contreras**

Ingeniero Químico. Licenciado en Ingeniería Química. Funcionario de Recope. Estudiante de maestría en Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: franktico23@gmail.com

### **Manuel. E. Molina Córdoba**

Ingeniero Químico. Profesor de la Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica. Teléfono: (506) 2511-4620. Correo electrónico: manuel.e.molina@gmail.com