

**OBTENCIÓN DE ETANOL POR LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL  
HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

**NATALIE ALEXANDRA AMEZQUITA FONSECA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
BUCARAMANGA**

**2007**

**OBTENCIÓN DE ETANOL POR LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL  
HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

**NATALIE ALEXANDRA AMEZQUITA FONSECA**

**Trabajo presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**Director**

**Ph D. RUBENS MACIEL FILHO**

**Lector**

**Ph D. VIATCHESLAV KAFAROV**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
BUCARAMANGA**

**2007**

*A Dios por ser mi fortaleza y mi guía, por llevarme de la mano en  
cada una de las metas que me he propuesto.*

*A mis padres Marcos Venicio y Consuelo, porque sin su apoyo, comprensión e  
incondicional amor no hubiera podido  
conseguir este logro, que no es mío, sino de ellos en realidad.*

*Porque les debo todo lo que soy.*

*LOS AMO.*

*A mis hermanos Sara, David y Alejandra, porque son la motivación  
mas grande para salir adelante y porque el recuerdo  
de su alegría y cariño fueron mi fortaleza  
para soportar la distancia.*

## AGRADECIMIENTOS

No hay palabras que puedan describir mi profundo agradecimiento hacia mis padres, quienes durante todos estos años confiaron en mí; comprendiendo mis ideales y el tiempo que no estuve con ellos. Gracias por tratar de proporcionarme siempre lo mejor, por escucharme y darme siempre fuerza y serenidad.

A mi novio, Sergio Celis, gracias por haber estado a mi lado desde el primer día que inicio este sueño, por ser mi fortaleza y mi compañía a pesar de la distancia, por sortear a mi lado las cosas buenas y malas de la vida, por enseñarme a amar y permitirme ser tan feliz como soy ahora. Gracias por creer en mí.

A la UNICAMP por confiar en mi desempeño y darme todos los medios para realizar este proyecto, especialmente al profesor, Dr. Rubens Maciel Filho y a la profesora Dra. Aline Carvalho da Costa por la oportunidad de crecer personal e intelectualmente, y por sus valiosas orientaciones y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A mi “Alma Mater” Universidad Industrial de Santander, gracias por todos estos años de formación intelectual y personal, y por darme la oportunidad de acceder a esta experiencia.

Al Dr. Alvaro Ramírez García, y al Dr. Viatcheslav Kafarov gracias por su confianza y ayuda.

A Laura Garzón F, Sarita Rabelo, Rafael Andrade y Elmer Copa R, quienes desde el inicio de este proyecto tuvieron la disposición de ayudarme, y me dieron no solo conocimientos sino también una gran amistad.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2.REVISION BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. BIOETANOL.....	3
2.2. BIOMASA LIGNOCELULOSICA.....	3
2.2.1. Fuentes de biomasa .....	3
2.2.2. Composición y estructura .....	4
2.2.2.1. Celulosa.....	4
2.2.2.2. Hemicelulosa.....	4
2.2.2.3 Lignina .....	4
2.3. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	5
2.3.1.Hidrólisis Enzimática.....	5
2.3.1.1. Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica .....	6
2.3.1.1.1Pretratamientos Químicos. ....	6
2.3.1.1.1.1. <i>Pretratamiento con Álcalis</i> .....	6
2.3.1.1.1.2. <i>Pretratamientos Oxidativos Alcalinos</i> .....	7
2.3.2.Fermentación a Etanol.....	7
2.3.2.1. Procesos en dos etapas. SFH.....	8
2.3.2.2. Proceso Discontinuo.....	9
2.3.2.2.1.Balance de masa.....	9

<b>3.MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
3.1. MATERIA PRIMA .....	10
3.2. EQUIPOS .....	10
3.3. ENZIMAS .....	10
3.4. MEDIOS DE CULTIVO.....	10
3.5. MICROORGANISMO .....	10
3.6. DETERMINACIONES ANALITICAS.....	11
3.6.1.Determinacion de los Azúcares reductores Totales. ART.....	11
3.6.2.Determinacion de la concentración de Glucosa.....	11
3.6.3.Determinacion de la actividad de la Celulasa.....	11
3.6.4.Determinacion de la actividad de la $\beta$ -Glucosidasa.....	12
3.6.5.Determinacion de masa seca.....	12
3.6.6.Determinacion de la concentración de Etanol, glicerol, Glucosa y Xilosa....	12
3.7. PRETRATAMIENTO .....	12
3.7.1. Pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno. $H_2O_2$ .....	13
3.7.2. Pretratamiento con Hidróxido de Calcio. $Ca(OH)_2$ .....	13
3.8. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	13
3.9. EVAPORACIÓN .....	14
3.10. ESTERILIZACIÓN .....	14
3.11 FERMENTACIÓN.....	14
3.11.1. Preparación del inóculo .....	14
3.11.2. Conducción de los ensayos.....	15
3.12. DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD .....	15
3.13. AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS. ....	15

<b>4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>16</b>
4.1.PRETRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. $H_2O_2$ . .....	16
4.2. PRETRATAMIENTO CON CAL. $Ca(OH)_2$ . .....	16
4.3. HIDRÓLISIS DEL BAGAZO DE CAÑA PRETRATADO.....	17
4.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE LOS HIDROLIZADOS PRETRATADOS.....	20
4.4.1. Ensayos de fermentación .....	22
4.4.1.1. Fermentación con Hidrolizado Pretratado con $H_2O_2$ .....	22
4.4.1.2. Fermentación con Hidrolizado pretratado con $Ca(OH)_2$ .....	23
4.4.1.3. Fermentación de Glucosa Pura- Referencia.....	24
4.4.1.4. Comparación de los perfiles .....	25
4.5. PRODUCTIVIDAD Y RENDIMIENTO.....	27
4.6. AJUSTE DE LOS PARAMETROS Y MODELAMIENTO CINÉTICO.....	30
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>6. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de la vía metabólica de obtención del etanol.....7
- Figura 2.** Vías de conversión a etanol .....8
- Figura 3.** Foto del bagazo de caña de azúcar, antes y después del pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno alcalino..... 16
- Figura 4.** Foto del bagazo de caña de azúcar, antes y después del pretratamiento con Hidróxido de Calcio..... 17
- Figura 5.** Perfiles de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña, con diferentes pretratamientos y sin pretratamiento.(A)-Producción de ART por gramo de biomasa pretratada. (B)-Hidrólisis del pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno ECIBRA (C).Producción de ART y Glucosa por gramo de biomasa pretratada..... 18
- Figura 6.** Perfiles de la fermentación por *S. cerevisiae*, del hidrolizado enzimático del bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno. (A) Ensayo 1, Perfil de consumo de Azúcares. (B) Ensayo 1, perfiles fermentativos. (C) Ensayo 2. perfiles fermentativos. Símbolos usados: ART (✱); Xilosa (◆); Glucosa (▲); Etanol (◆) y biomasa (■). .....22
- Figura 7.** Perfiles de la fermentación por *S. cerevisiae*, del hidrolizado enzimático del bagazo de caña pretratado con Hidroxido de Calcio. (A) Ensayo 1, Perfil de consumo de Azúcares. (B) Ensayo 1. Perfiles fermentativos. (C) Ensayo 2. Perfiles fermentativos. Símbolos usados: ART (✱); Xilosa (◆); Glucosa (▲); Etanol (◆) y biomasa (■).....23

<b>Figura 8.</b>	Perfiles de la fermentación de referencia con glucosa Pura. (A) Ensayo 1, (B) Ensayo 2. Símbolos usados: Glucosa (▲); Etanol (◆) y biomasa (■).....	24
<b>Figura 9.</b>	Perfiles de la fermentación alcohólica del hidrolizado enzimático del bagazo de caña, pretratado con Peróxido, Cal y referencia. (A) Consumo de Glucosa, (B) Producción de Etanol, (C) Producción de Glicerol, (D) Biomasa. Símbolos usados: Pre-Hidrolizado con Cal (▲); Pre-Hidrolizado con Peróxido (◆) y Referencia (■). .....	25
<b>Figura 10.</b>	Modelamiento cinético del proceso discontinuo de la fermentación de hidrolizados enzimáticos pretratados con Peróxido de Hidrógeno. (A)Consumo de sustrato. (B) Producción de biomasa. (C) Producción de Etanol. Simulación (QN—)Datos experimentales. S (▲) ; X(■) y P (◆).....	32
<b>Figura 11.</b>	Modelamiento cinético del proceso discontinuo de la fermentación de hidrolizados enzimáticos pretratados con Hidoxido de Calcio. (A)Consumo de sustrato. (B) Producción de biomasa. (C) Producción de Etanol. Simulación (QN—); Datos experimentales. S (▲) , X(■) y P (◆). .....	32
<b>Figura 12.</b>	Gráfico de la concentración de la enzima celulasa en cada dilución en función de la concentración de glucosa liberada por 0.5 ml de enzima. ....	39
<b>Figura 13.</b>	Gráfica de la concentración de la encima en función de la absorbancia.....	41

<b>Figura 14.</b>	Reacción de azúcares reductores en el ácido 3,5-dinitro-salicílico .....	43
<b>Figura 15.</b>	Curva patrón de glucosa (azúcar reductor).....	44
<b>Figura 16.</b>	Esquema de las etapas de preparación del inóculo para fermentación.....	47
<b>Figura 17.</b>	Foto en detalle del equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia. Varian modelo 9010, utilizado en los análisis.....	49

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Datos iniciales de los ensayos de fermentación.....	21
<b>Tabla 2.</b>	Parámetros fermentativos observados durante la fermentación discontinua de los hidrolizados enzimáticos.....	28
<b>Tabla 3.</b>	Resultados de los parámetros cinéticos optimizados por el método Quasi-Newton.....	31
<b>Tabla 4.</b>	Valores de absorbancia y concentración de ART liberados por cada dilución de enzima.....	38
<b>Tabla 5.</b>	Valores de absorbancia y concentración de ART liberados por cada dilución de enzima.....	41
<b>Tabla 6.</b>	Absorbancia de la solución de glucosa después de la reacción con el método DNS para construcción de la curva patrón.....	44
<b>Tabla 7.</b>	Composición del medio MLB de activación para el cultivo de <i>S. Cerevisiae</i> .....	45
<b>Tabla 8.</b>	Composición del medio liquido para el crecimiento del inóculo.....	46
<b>Tabla 9.</b>	Composición del medio semi-sólido para el crecimiento del inóculo.....	46
<b>Tabla 10.</b>	Masa de ART liberada por gramo de biomasa.....	54
<b>Tabla 11.</b>	Masa de Glucosa liberada por gramo de biomasa.....	55

<b>Tabla 12.</b> Concentración en g/l de Azúcares Reductores Totales (ART), glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno-Test.....	56
<b>Tabla 13.</b> Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno ENSAYO1 .....	57
<b>Tabla 14.</b> Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno-ENSAYO 2.....	58
<b>Tabla 15.</b> Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno. ENSAYO 3.....	58
<b>Tabla 16.</b> Concentración en g/l de Azúcares Reductores Totales (ART), glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Hidróxido de Calcio. Ensayo 1.....	59
<b>Tabla 17.</b> Concentración en g/l de azúcares Reductores totales (ART), glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Hidróxido de Calcio. Ensayo. 2.....	60

<b>Tabla 18.</b> Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación Referencia hecha con Glucosa pura- ENSAYO 1.....	61
<b>Tabla 19.</b> Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación de Referencia hecha con Glucosa pura. ENSAYO 2.....	62

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS.....</b>	<b>46</b>
A.1. Actividad de la <i>celulasa</i> .....	46
A.2. Actividad de la $\beta$ - <i>Glucosidasa</i> .....	49
<b>ANEXO B. MÉTODO DNS.....</b>	<b>52</b>
B.1 Construcción de la curva patrón para el método DNS.....	52
<b>ANEXO C. INÓCULO PARA LA FERMENTACION.....</b>	<b>54</b>
C.1 Composición de los medios de cultivo.....	54
C.1.1 Medio liquido basal (MLB). ....	54
C.1.2. Medio Liquido.....	54
C.1.3. Medio Semi-Solido.....	55
C.2 Preparación del inóculo .....	56
<b>ANEXO D. DETERMINACIÓN DE ETANOL, GLICEROL, GLUCOSA Y XILOSA.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO E. EQUIPOS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO F. AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO G. DATOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>62</b>
G.1. Hidrólisis enzimática.....	62
G.2 . Fermentacion del Hidrolizado pretratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
G.3 . Fermentacion del Hidrolizado pretratado con Ca (OH) <sub>2</sub> .....	67
G.4 . Fermentacion de Referencia- Glucosa.....	70

## NOMENCLATURA

t	Tiempo (h)
S	Concentración de substrato en el reactor (g/l)
X	Concentración de biomasa (g/l)
P	Concentración de producto (g/l)
$X_{\max}$	Concentración de biomasa cuando el crecimiento celular cesa (g/l)
$P_{\max}$	Concentración de producto cuando el crecimiento cesa (g/l)
$Y_{p/s}$	Rendimiento en etanol (g/g)
$Y_{p/s}^R$	Rendimiento en etanol basado en la referencia (g/g)
$Y_{x/s}$	Rendimiento en biomasa (g/g)
$Q^P$	Productividad volumétrica (g/l.h)
$r_p$	Tasa cinética de formación de producto (g/[l.h])
$r_s$	Tasa cinética de consumo de substrato (g/[l.h])
$r_x$	Tasa cinética de crecimiento microbiano (g/[l.h])
$K_s$	Constante de saturación (g/l)
m	Parámetro para descripción de la inhibición celular
n	Parámetro para inhibición por producto
$K_i$	Constante de inhibición por el substrato (g/l)
ART	Azúcares Reductores Totales (g/l)
$R_T$	Rendimiento con respecto al teórico
$R_R$	Rendimiento con respecto a la referencia

### Letras Griegas

$\mu$	Velocidad específica de crecimiento celular ( $h^{-1}$ )
$\mu_{\max}$	velocidad máxima de crecimiento celular ( $h^{-1}$ )

## RESUMEN

**TITULO:** OBTENCIÓN DE ETANOL POR LA FERMENTACION ALCOHÓLICA DEL HIDROLIZADO ENZIMATICO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR\*

**AUTOR:** Natalie Alexandra Amézquita Fonseca†

**PALABRAS CLAVE:** *Bagazo de caña de Azúcar; pretratamiento, Hidrolisis enzimática, Fermentación, Etanol.*

### DESCRIPCIÓN

Los avances en la biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la utilización económica de residuos agroindustriales como el Bagazo de caña de azúcar, el cual es un subproducto de la industria azucarera.

Este trabajo muestra los resultados de la investigación en la producción de etanol a partir de la glucosa presente en los hidrolizados hemicelulosicos del bagazo de caña de azúcar utilizando *Saccharomyces Cerevisiae*.

El bagazo de caña de azúcar fue sometido a procesos de pretratamiento con Hidróxido de Calcio (0.4 g Cal/ g de Biomasa, 70°C, 150 rpm, 36h) y con Peróxido de Hidrógeno (7.335% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, v/v; pH 11.5; 25°C, 1h) antes de su hidrólisis enzimática (50°C, pH 4.8, 100rpm, 48 a 72h) utilizando concentraciones de Celulasa de 3.42 FPU/g de biomasa seca y de  $\beta$ -glucosidasa 1.01 CBU/g de biomasa seca. Los hidrolizados fueron concentrados a vacío para obtener una concentración de glucosa alrededor de los 15 g/l. El proceso de fermentación de los hidrolizados (pH 5.0 a 34°C) fue realizado en frascos erlenmeyer de 500 ml a 200rpm durante 18 h. El acompañamiento analítico se hizo a través de análisis de glucosa, xilosa, glicerol y etanol por medio de cromatografía líquida HPLC, y de masa seca por gravimetría.

El estudio cinético permitió observar la producción de etanol y el comportamiento de la *Saccharomyces Cerevisiae* durante la fermentación de este tipo de hidrolizados. El rendimiento de etanol y las inhibiciones se cuantificaron con base en una fermentación de referencia con glucosa pura, obteniéndose un rendimiento de 90.7% en pre-hidrolizados con Cal, y de 88.1% en pre-hidrolizados con Peróxido de Hidrógeno. Posteriormente los datos experimentales fueron ajustados a un modelo matemático desarrollado en FORTRAN 6.6 que describió satisfactoriamente el proceso fermentativo en las condiciones establecidas.

---

\* Trabajo de Grado

† Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Dir. Rubéns Maciel Filho

## ABSTRACT

**TITLE:** OBTAINING ETHANOL FROM ALCOHOLIC FERMENTATION OF THE HYDROLYZED ENZYMATIC FROM THE SUGAR CANE BAGASSE\*

**AUTOR:** Natalie Alexandra Amézquita Fonseca†

**KEY WORDS:** *Sugar cane bagasse, Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, Fermentation, Ethanol*

### DESCRIPTION:

Advances in industrial biotechnology offer potential opportunities for the economic use of agro-industrial residues such as sugar cane Bagasse, which is a byproduct of the sugar industry.

This work shows the results of research in ethanol production from glucose present in hydrolysates of sugarcane bagasse using *Saccharomyces Cerevisiae*.

The sugar cane offal underwent treatment processes by using calcium hydroxid (0.4 gm Cal / gm biomass, 70grades, 150 rpm, 36h) and by using hydrogen peroxide (7.335% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, v/v; pH 11.5; 25°C, 1h) before its enzymatic hydrolysis (50 grades, pH 4.8, 100 rpm, 48 to 72h) by using *celulasa* concentrations with 3.42 FPU/g dried biomass and with  $\beta$ - *glucosidasa* 1.01 CBU/g dried biomass. The hydrolyzed were concentrated in vacuum to obtain a glucose concentration around of 15 gm/L. The fermentation process of the hydrolysates (pH 5.0 at 34 °C) were carried out in 500ml Erlenmeyer flasks, 200 rpm for 18 h. The analytic attendance was done through glucose, xilosa, glycerol, and ethanol analysis by means of liquid chromatography, HPCL, and mass dry gravimetric.

The kinetic study allows for observing ethanol production and the behavior of *Saccharomyces Cerevisiae* during the fermentation of such hydrolysates. The yield of ethanol and inhibitions were quantified based on the reference fermentation with pure glucose, obtaining a 90.7% in pre-hydrolysates with Cal, and 88.1% in hydrogen peroxide hydrolyzates. Subsequently, experimental data were adjusted to a mathematical model developed in FORTRAN 6.6 that successfully described the fermentative process in the established conditions.

---

\* Degree Work.

† Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Ph. D Rubens Maciel Filho

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tecnologías para el tratamiento de materiales lignocelulósicos ha sido visto con buenos ojos desde el punto de vista económico al considerarse su utilización como sustrato en procesos para la producción de etanol. Un residuo lignocelulósico que tiene un potencial muy grande para su bioconversión es el bagazo de la caña de azúcar, un residuo de la industria del azúcar y de las destilerías autónomas productoras de combustible. El bagazo de caña como sustrato para la bioconversión presenta las ventajas de contener un alto porcentaje de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), además de ser un sustrato barato, con un abastecimiento constante dentro de la fábrica de azúcar.

Los tres componentes que están en mayor proporción en la biomasa lignocelulósica, como el bagazo de caña, son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La celulosa y la hemicelulosa no son directamente viables para su bioconversión, porque tienen una fuerte protección de la lignina. Para aumentar la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica, ésta es tratada física, química o biológicamente. La biomasa pretratada es hidrolizada enzimáticamente a azúcares productos de la celulosa y hemicelulosa. Los azúcares resultantes son fermentados a etanol por medio de fermentación alcohólica utilizando levaduras. (**Pessoa et al.**, 1997).

La conducción de la fermentación del licor con azúcares reductores obtenidos después de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos es una etapa crítica para que un proceso de obtención de etanol asegure una conversión mínima de

estos azúcares y sea compatible con un costo de producción factible, sobre una visión técnico- económica. Debe ser tenido en cuenta el consumo energético asociado a las condiciones de fermentación y el rendimiento del etanol obtenido en el vino final. Teniendo en cuenta la necesidad de realizar procesos de pretratamiento del bagazo sin los cuales la hidrólisis se torna inviable, independientemente de que esta sea catalizada por ácidos o por enzimas, habrá la formación de una serie de compuestos secundarios de estos pretratamientos, que inhiben fuertemente la actividad fermentativa de los microorganismos. (Rosell., 2006)

El gran desafío de la producción económicamente viable del bioetanol a partir de una biomasa lignocelulósica consiste en determinar la mejor forma de disponibilizar la glucosa a partir de la hidrólisis de la celulosa en términos del costo global, rendimiento glucósido y fermentabilidad del hidrolizado.

El objetivo básico de este trabajo fue avalar y comparar la fermentabilidad con *Saccharomyces Cerevisiae* del hidrolizado enzimático obtenido tras el pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno Alcalino y con Hidróxido de Calcio sobre el bagazo de caña de azúcar. Los parámetros operacionales para la producción del hidrolizado fueron definidos en otras investigaciones en las cuales los resultados se consideraron satisfactorios.

## **2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.BIOETANOL**

Uno de los biocombustibles más importantes es el etanol, el cual puede ser utilizado como oxigenante para la gasolina, elevando su contenido en O<sub>2</sub>, lo que permite una mayor combustión de la misma disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente.

En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios para desarrollar la producción a gran escala de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. Para mejorar la competitividad del bioetanol frente a los combustibles derivados del Petróleo se deben reducir los costes de producción, y para ello se necesita reducir el precio de las materias primas, ya que estas suponen alrededor del 60% del coste final del etanol. El etanol se obtiene a partir de la caña de azúcar en países tropicales como Brasil, Colombia e India. En algunos países europeos como Francia se utilizan melazas de remolacha azucarera. La materia prima principal para la producción de etanol en los Estados Unidos es el almidón. Los recursos renovables se pueden ver como una opción para ponerle límite al consumo de recursos no renovables, por consiguiente la biomasa lignocelulósica es vista como un recurso atractivo para los suministros en el futuro de etanol.

### **2.2. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA**

#### **2.2.1. Fuentes de biomasa**

El bioetanol se produce a partir de materiales con biomasa celulósica, abarcando este término toda la materia orgánica de origen vegetal, incluyendo también los

materiales procedentes de su transformación natural o artificial. (**Fernández et al.**, 1995). La biomasa puede provenir de varios tipos de cultivos:

- *Residuos forestales*
- *Cultivos y residuos agrícolas*
- *Cultivos Energéticos*
- *Otras fuentes de biomasa*

### **2.2.2.Composición y estructura**

Los principales componentes de los residuos lignocelulósicos son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, además de otros componentes que no hacen parte de la pared celular. En el bagazo de caña la celulosa representa el 50%, la hemicelulosa el 25% y la lignina el 25 % restante. (**Pandey et al.**, 2000).

#### **2.2.2.1. Celulosa**

Es el componente mayoritario de las paredes celulares de la generalidad de plantas, es un polímero lineal de  $\beta$ -D-Glucosa, que tiene una parte amorfa y una parte cristalina. El número de azúcares de cadena (grado de polimerización G.P), varía en los diferentes materiales celulósicos.

#### **2.2.2.2.Hemicelulosa.**

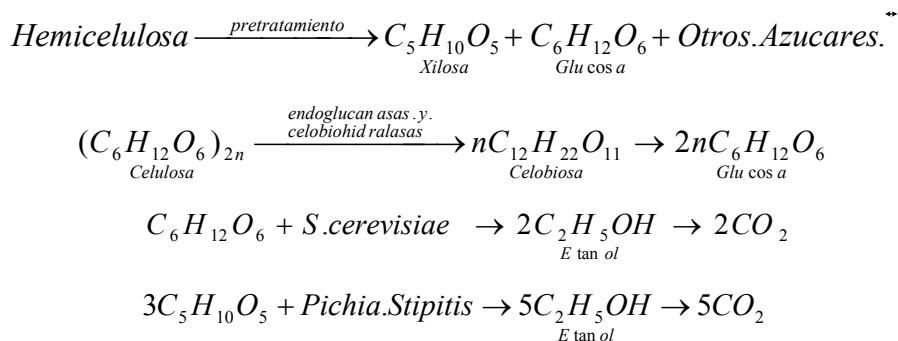
La hemicelulosa está constituida por polímeros de unidades de anhidro azúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa.

#### **2.2.2.3.Lignina**

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada.

## 2.3. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de celulosa y lignina entrelazada por cadenas de hemicelulosa. El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o incluso se puede descomponer. En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en Etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno a varios azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado. Este complejo proceso puede ser representado por las reacciones:



### 2.3.1. Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Las enzimas presentan elevada especificidad en relación al sustrato y

su utilización reduce la obtención de subproductos indeseables en la reacción, disminuyendo así los costos de separación de los productos, y los problemas de tratamiento de efluente.

### **2.3.1.1. Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica**

Los objetivos fundamentales del pretratamiento van encaminados a reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis.

Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (**Sun et al.**, 2001). Los pretratamientos químicos actualmente han recibido mucha atención por ser simples y limpios que los otros. Por lo tanto en el presente trabajo se va a hacer énfasis en los pretratamientos químicos, utilizando pretratamientos Oxidativos y Alcalinos.

#### **2.3.1.1.1. Pretratamientos Químicos.**

Entre los pretratamientos químicos se encuentran los tratamientos con álcalis, con agentes oxidantes, con agua caliente, oxidación húmeda, ozono, ácidos, y órgano solventes. Dentro de los diferentes tipos de pretratamientos químicos se va a destacar el pretratamiento con álcalis y el pretratamiento oxidativo para el proceso del trabajo.

##### **2.3.1.1.1.1 Pretratamiento con Álcalis**

El principal efecto del pretratamiento consiste en la remoción de la lignina de la biomasa, promoviendo mayor reactividad de la fibra. El álcali (generalmente soda o Cal) tiende a causar una degradación de la fibra de la biomasa, de modo que la cristalinidad de la celulosa decrece, mientras ocurre un incremento de la superficie específica de contacto y de la porosidad de la misma. Se evidencia una ruptura de las ligaciones lignina-carbohidrato, además de la fragmentación de la

estructura de la lignina. La efectividad de esta clase de pretratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar.

### 2.3.1.1.2. Pretratamientos Oxidativos Alcalinos.

Los pretratamientos oxidativos han sido usados para disolver los componentes de la matriz lignocelulósica y acelerar la hidrólisis enzimática y la biodegradación. El método utiliza  $H_2O_2$  como oxidante (“Wet Alkaline Peroxide Oxidation”) y tratamiento tiene la ventaja de generar muy pocos productos de degradación como el furfural e HMF ( *Klinke et al.*, 2002).

### 2.3.2. Fermentación a Etanol

Se puede conseguir la producción de etanol por vía destilatoria, por vía sintética y por vía fermentativa. La vía fermentativa es la más importante para obtener alcohol etílico. La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico, en el cual, por medio de 12 reacciones (Figura 1), el substrato es metabolizado a alcohol etílico, gas carbónico y glicerol, sobre la acción de las levaduras. (*Basso et al.* 2001).

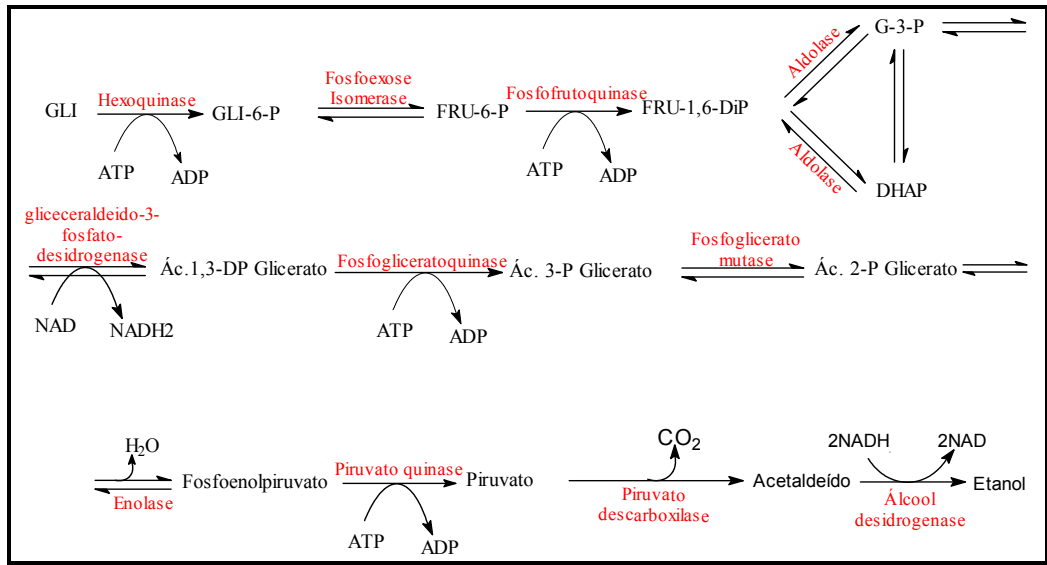


Figura 1– Esquema de la vía metabólica de obtención del etanol.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un aerobio facultativo. Tiene varias ventajas para la producción de etanol de materiales lignocelulósicos. Es un productor eficiente de etanol de glucosa, no necesita oxigenación, tiene pH bajo óptimo y una tolerancia relativamente alta para etanol y supresores. Los procesos conversión de celulosa en etanol pueden dividirse en dos grandes grupos que se muestran en la Figura 2:

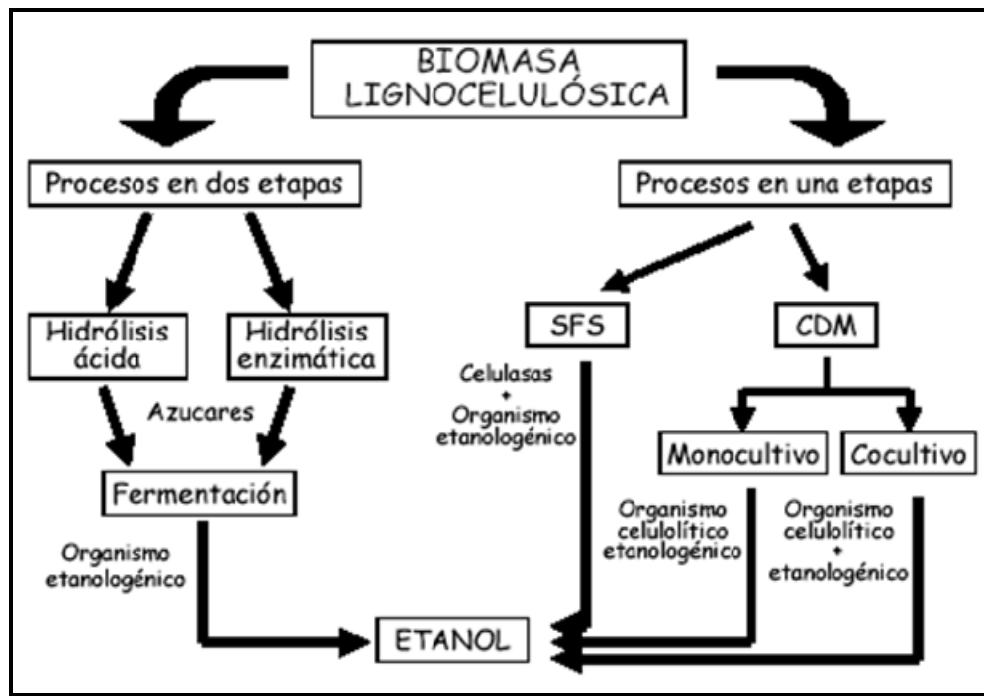


Figura 2. Vías de conversión a etanol. (Oliva.J.M. 2003).

### 2.3.2.1. Procesos en dos etapas. SFH.

En los procesos en dos etapas la hidrólisis (ácida o enzimática) y fermentación se realizan por separado (SFH). La glucosa obtenida en el reactor de la hidrolisis pasa a otro reactor, donde se realiza la fermentación mediante la acción de los microorganismos. La ventaja de este proceso es que, al estar separadas la etapa

de hidrólisis y de fermentación, ambas pueden realizarse en sus condiciones óptimas. La etapa de hidrólisis se realiza a la temperatura óptima del enzima (en torno a los 50 °C), mientras que la de fermentación se realiza a la temperatura óptima del microorganismo productor de etanol. (Oliva., 2003).

### 2.3.2.2. Procesos discontinuos

Este tipo de proceso presenta serias desventajas, como el tiempo para llenar, vaciar y esterilizar el equipo, pero también tiene flexibilidad por el hecho de que el mismo equipo puede estar disponible para la producción de diferentes productos de acuerdo a la necesidad. En la investigación este tipo de procesos es muy útil para el cálculo de la cinética del proceso sin embargo la alta concentración de sustrato en el inicio de la fermentación puede causar la inhibición del crecimiento del microorganismo, llevando a bajos valores de rendimiento y productividad.

### 2.3.2.3. Balance de masa

En el reactor discontinuo, se considera que nada es adicionado al mismo durante la fermentación, excepto antiespumantes, controladores de pH y otros. Concentraciones de nutrientes, células y producto varían a lo largo del tiempo y crecimiento microbiano.

Para un proceso discontinuo, las ecuaciones que describen el balance de masa para concentración de biomasa, sustrato, y etanol son:

$$\frac{dX}{dt} = r_x$$

(Ec.1)

$$\frac{dS}{dt} = -r_s$$

(Ec.2)

$$\frac{dP}{dt} = r_p$$

(Ec.3)

Donde X es la concentración de masa celular (g/l), S es la concentración de sustrato (g/l) y P es la concentración de etanol (g/l).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIA PRIMA**

El material lignocelulósico utilizado fue *BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR* el cual se obtuvo de una misma cosecha y fue suministrado por la industria São Luiz – Dedini S/A agroindustria de la hacienda São Luiz – Sector A, de la zona rural de la ciudad de Pirassununga, Estado de São Paulo (Brasil). El bagazo no paso por ningún proceso mecánico después de almacenado, se utilizo con el tamaño natural que sale de la industria.

#### **3.2. EQUIPOS**

Los equipos utilizados en el trabajos se presentan en el anexo E.

#### **3.3.ENZIMAS.**

Fueron utilizadas las enzimas *Celulasa* de *Tricoderma Reesei* (celluclast) y  $\beta$ -*Glucosidasa* de *Asperguillus Níger* (Novozime-188). La actividad enzimática de cada enzima fue determinada experimentalmente como se muestra en el Anexo A.

#### **3.4.MEDIOS DE CULTIVO.**

Los medios de cultivos utilizados para el mantenimiento y crecimiento del microorganismo se presentan en el Anexo C1.

#### **3.5.MICROORGANISMO.**

El microorganismo utilizado para la fermentación del hidrolizado fue *Sacchamomyces cerevisiae* cultivado en el Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería de Alimentos, LEBFEA de la UNICAMP, y obtenido de una planta industrial.

### **3.6.DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

#### **3.6.1. Determinación de los Azúcares Reductores Totales. ART**

Las concentraciones de ART fueron determinadas de acuerdo al método de ácido Dinitrosalicílico (DNS) descrito por **Miller** (1959). La descripción del método y el procedimiento para la cuantificación de ART se puede observar en el Anexo B.

#### **3.6.2. Determinación de la concentración de Glucosa**

Su determinación fue hecha por vía enzimática utilizando el método Glucosa GOD-PAP, descrito por **Henry** (1974). El método se basa en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa-oxidasa (GOD) y peroxidasa resultando en Peróxido de Hidrógeno, el cual es subsecuentemente usado en la generación de la coloración rosada por la peroxidasa (PAP). La concentración de glucosa presente fue determinada a través de la lectura de absorbancia a 540nm, la absorbancia de la muestra es comparada con una curva patrón construida con concentraciones conocidas de glucosa.

En el procedimiento con el auxilio de una pipeta automática se transfieren 10µL de muestra a un tubo de ensayo. Se adicionan 1.0 ml de reactivo y se lleva a baño termostático por 10 min a 37°C, en seguida se agregan 3 ml de agua destilada a cada muestra y se realizan las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 540nm de longitud de onda.

#### **3.6.3. Determinación de la Actividad de la *Celulasa***

La actividad de la enzima celulasa fue determinada como actividad de filtro de papel (FPA) y expresada en unidades de filtro de papel (FPU – Filter Paper Units) por volumen de enzima original, como es recomendado por la IUPAC (**Ghose et al.** 1987). El procedimiento y los resultados de la actividad de esta enzima se presentan en forma resumida en el Anexo A1.

#### 3.6.4. Determinación de la Actividad de la $\beta$ -Glucosidasa

Para la  $\beta$ -glucosidasa, la medida de la actividad fue determinada a través de una solución de celobiosa y expresada en unidades de celobiosa (CBU) por volumen de enzima original, como es recomendado por la IUPAC (Wood *et al.*, 1988). El procedimiento y los resultados de la actividad de esta enzima se presentan en forma resumida en el Anexo A2.

#### 3.6.5. Determinación de masa seca

La concentración de biomasa en el transcurso de la fermentación fue determinada por medio de muestras de 8 ml de medio fermentado que fueron retiradas periódicamente, luego centrifugadas por 15 min a 3300rpm y el precipitado de estas lavado 3 veces con agua destilada y transferido a tubos de ensayo previamente tarados a la misma temperatura de secado de las muestras (70 C) en una estufa con circulación de aire, hasta que el peso fue constante. La masa celular se encontró de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Biomassa} \left( \frac{\text{g}}{\text{l}} \right) = \left( \frac{(\text{Tubo con biomasa} - \text{Tubo Seco}) \text{g}}{\text{volumen} \cdot \text{Centrifuga} \text{ do.}(l)} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

#### 3.6.6. Determinación de la Concentración de Etanol, Glicerol, Glucosa y Xilosa.

Las concentraciones de etanol, glucosa, xilosa y glicerol fueron determinadas por sistema de cromatografía líquida (HPLC) marca Varian. El procedimiento se puede que se siguió se puede observar en el Anexo D.

### 3.7. PRETRATAMIENTO

Muestras de 4.0 g de bagazo de caña seco fueron tratadas con 100 ml de una solución determinada por el tipo de pretratamiento, inmediatamente después se llevaron las muestras a una incubadora con agitación de 150 rpm, en las

condiciones de temperatura respectivas. Después del tiempo de pretratamiento pertinente, se descarto el líquido reaccional, se lavaron los residuos sólidos con agua destilada y se centrifugaron hasta que toda la coloración desapareciera. Las muestras fueron secadas en estufa a 110° C, pesadas y almacenadas en el refrigerador para la posterior hidrólisis.

### **3.7.1.Pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Se partió de las condiciones óptimas encontradas por investigadores del Laboratorio de Ingeniería de procesos fermentativos y enzimáticos, LEPFE/UNICAMP, para el pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno sobre el bagazo de caña in-natura, que fueron 25° C de temperatura, concentración de peróxido de 7.355% (v/v) con pH de 11.5 y 1 h de tiempo reaccional. (Rabelo, 2007) El pH de la solución de Peróxido de Hidrógeno fue ajustado a 11,5 con Hidróxido de Sodio y Acido clorhídrico. En el proceso de lavado son necesarias por lo menos 12 lavadas de los residuos después del pretratamiento.

### **3.7.2.Pretratamiento con Hidróxido de Calcio. Ca(OH)<sub>2</sub>**

Se partió de las condiciones que dieron los mejores resultados en estudios de Pretratamiento con Hidróxido de Calcio sobre el bagazo de caña in-natura llevados a cabo por investigadores del Laboratorio de Ingeniería de procesos fermentativos y enzimáticos, LEPFE/UNICAMP. Estas condiciones fueron 70° C de temperatura, 0.4 g de Cal/ g de biomasa seca y 36 h de tiempo reaccional (Rabelo., 2007). Estas condiciones no son las óptimas ya que para optimizar esta clase de pretratamiento se necesita manejar temperaturas por encima de los 70° C y los equipos no alcanzan esta temperatura.

## **3.8.HIDROLISIS ENZIMÁTICA**

A muestras de 1.0 g de bagazo pretratado seco se le agregaron 300 ml de agua destilada en erlenmeyes de 500 ml y se les ajusto el pH a 4.8 con Hidróxido de Sodio y Acido clorhídrico. Luego a cada uno se le adiciono 1,0 ml de

$\beta$ -glucosidasa (1.01 CBU/g de biomasa seca pretratada) y enseguida 1 ml de Celulasa (3.42 FPU/g biomasa seca pretratada). Los erlenmeyer fueron sellados y luego llevados al shaker a temperatura de 50° C y 100rpm.

Durante la hidrólisis fueron recolectadas muestras de 2 ml, en períodos de tiempo predeterminados, así 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h con el fin de determinar el perfil de la hidrólisis midiendo la masa de ART y Glucosa liberadas en función del tiempo. La hidrólisis de bagazo pretratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue culminada a las 48 h, sin embargo la hidrólisis con bagazo pretratado con Ca(OH)<sub>2</sub> fue terminada a las 72 h de acuerdo a los resultados de trabajos anteriores con estos pretratamientos (Rabelo. S. C ., 2007).

### **3.9.EVAPORACIÓN**

El proceso de evaporación se realizó en un Roto-evaporador marca *Fisatom*. Se concentro la fracción líquida obtenida tras la hidrólisis enzimática hasta obtener la concentración de glucosa deseada.

### **3.10.ESTERILIZACIÓN**

La esterilización del medio así como del reactor fue realizada por medio de vapor saturado a 121 ° C por 20 minutos en autoclave marca PHOENIX. La cámara de flujo laminar en la que se realizo el primer repique de *Sacchamomyces cerevisiae* tuvo sus superficies esterilizadas con alcohol etílico 70° GL y radiación ultravioleta por 30 minutos, antes de manipulación de material en la misma.

### **3.11. FERMENTACIÓN**

#### **3.11.1. Preparación del inóculo**

La composición de los medios y el procedimiento que se siguió para la preparación de inóculo se encuentran especificados en el Anexo C2.

### 3.11.2. Conducción de los ensayos

Erlenmeyes con 500 ml de medio fueron esterilizados en autoclave de acuerdo al ítem 3.10, luego a cada uno se le adiciono 50ml de inóculo (10% del medio) obtenido como se describe en el Anexo C2. Posteriormente los erlenmeyers fueron incubados en Shaker a 200rpm y 34° C por 18 h. Muestras de 8ml fueron retiradas asépticamente para determinaciones periódicas de Glucosa, Xilosa, Etanol, Glicerol y biomasa.

### 3.12. DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD.

Se calcularon dos rendimientos, uno con respecto al teórico, y otro con respecto a las fermentaciones de referencia así:

- *Rendimiento con respecto al teórico  $R_T$* :  $(Y_{P/S}/0.51)*100$
- *Rendimiento con respecto a la referencia  $R_R$* :  $(Y_{P/S}/Y_{P/S}^R)*100$
- *La productividad volumétrica ( $Q_p$ )*= Máxima concentración de etanol producido dividido en el tiempo que adquirió tal concentración. (g/ l\*h).
- *El rendimiento en etanol ( $Y_{P/S}$ )* = Concentración máxima de etanol producido dividido en la concentración de azúcar inicialmente presente en el medio. (g/g)
- *El rendimiento en biomasa ( $Y_{X/S}$ )* = Producción de biomasa (final – inicial) dividido por la concentración inicial de glucosa. (g/g)

Donde  $Y_{P/S}^R$  el rendimiento en etanol de la referencia.

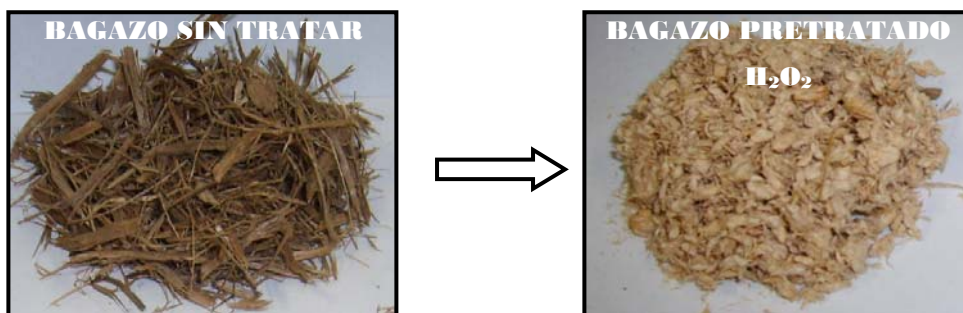
### 3.13. AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Los parámetros cinéticos fueron ajustados a un modelo que se desarrollo a partir de una rutina de ajuste hecha en el software COMPAQ VISUAL FORTRAN versión 6.6 por investigadores del Laboratorio de optimización y control avanzado LOPCA/UNICAMP, aplicando el algoritmo Quasi-Newton de optimización (Rivera *et al.*, 2007). El proceso que se siguió y las ecuaciones utilizadas para este cálculo se encuentra descrito en el Anexo F.

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 4.1. PRETRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. $H_2O_2$

En el pretratamiento alcalino de 4 g de bagazo de caña seco, fueron obtenidos 2.05g (aproximadamente el 52%) de bagazo seco y deslignificado, El resultado después de seco es una pulpa casi blanca. En la fotografía de la *Figura 3* se ve notablemente la diferencia entre el bagazo pretratado y sin pretratar.



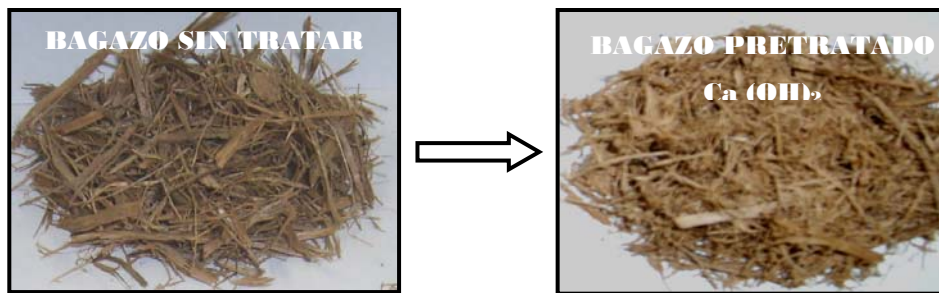
*Figura 3. Foto del bagazo de caña de azúcar, antes y después del pretratamiento con Peróxido de Hidrógeno alcalino.*

Durante el proyecto, se trabajó con Peróxido de Hidrógeno MERCK, sin embargo se hicieron varios pretratamientos con un Peróxido de Hidrógeno comercial marca ECIBRA, con el objetivo de comparar el comportamiento de éste reactivo dentro del proceso de deslignificación y si era posible reducir costos. Los resultados de este reactivo se muestran en el apartado 4.3.

### 4.2. PRETRATAMIENTO CON CAL. $Ca(OH)_2$

En el pretratamiento con  $Ca(OH)_2$  de aproximadamente 4.0 g de bagazo de caña, fueron obtenidos 2.73 g de bagazo seco y deslignificado (aproximadamente 69%), la cual es una cantidad significativamente mayor a la del otro pretratamiento. El proceso de lavado es uno de los pasos más difíciles dentro de esta clase de pretratamiento, ya que la fibra del bagazo no cambia significativamente, su color

es prácticamente igual, lo que hace difícil de diferenciar el bagazo que ya fue sometido al proceso y el que no, por lo que es necesario lavarlo por lo menos 17 veces como se puede observar en la Figura 4.



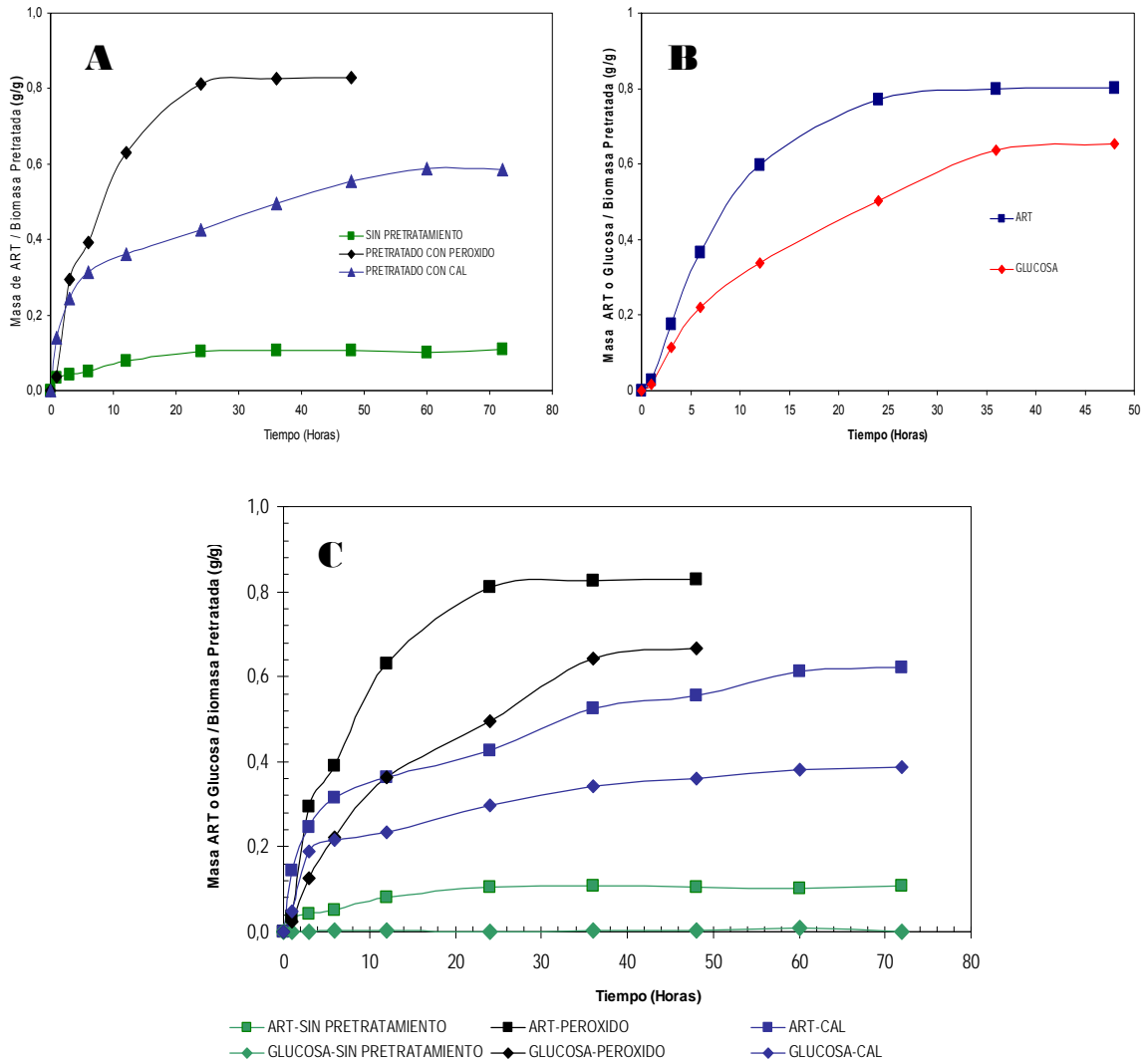
**Figura 4.** Foto del bagazo de caña de azúcar, antes y después del pretratamiento con Hidróxido de Calcio.

#### **4.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE CAÑA PRETRATADO**

Se llevo a cabo la hidrólisis enzimática con dos clases de bagazo pretratado, uno con  $H_2O_2$  y otro con  $Ca(OH)_2$ , este material pretratado fue hidrolizado de acuerdo a las condiciones óptimas de temperatura y pH de la enzima, como se explico en el procedimiento descrito en el Ítem 3.8. Para este paso del proceso se utilizaron concentraciones de *celulasa* y  $\beta$ -*glucosidasa* bajas, 3,42 FPU/g de biomasa seca y 1,01 CBU/g de biomasa seca, respectivamente. La construcción de la curva de patrón utilizada en el método DNS para cuantificación de ART, siguió el procedimiento descrito en el Anexo B.

La actividad de las enzimas se encontró de acuerdo al procedimiento descrito en el ítem 3.6.3 y 3.6.4, y sus resultados se pueden ver en el Anexo A. De acuerdo a estos resultados la actividad de la enzima *Celulasa* fue de 11.19 FPU/ml de enzima bruta, y la de la enzima *B-Glucosidasa* fue determinada como 308,37 FPU/mL de enzima bruta.

En el transcurso de la hidrólisis fueron recolectadas muestras periódicamente con las cuales se hizo el cálculo de ART y de GLUCOSA de acuerdo a la metodología descrita en los apartados 3.6.1 y 3.6.2, y con estos datos se graficaron los perfiles promedio de las hidrólisis que se ven en la Figura 5.



**Figura 5.** Perfiles promedio de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña, con diferentes pretratamientos y sin pretratamiento. (A)-Producción de ART por gramo de biomasa pretratada. (B) Producción de ART y Glucosa por gramo de biomasa pretratada con Peróxido de Hidrógeno ECIBRA (C).Producción de ART y Glucosa por gramo de biomasa. Pretratada con Peróxido MERCK, Pretratada con Cal y sin pretratamiento.

Los resultados mostrados en la Figura 5 y en las tablas 10 y 11, indican que el bagazo pretratado con el Peróxido de Hidrógeno es más susceptible al ataque enzimático que el bagazo obtenido en el proceso realizado con Hidróxido de Calcio, y así mismo se muestra que el bagazo sin pretratamiento prácticamente no se hidroliza, ya que tanto la celulosa como la hemicelulosa, se encuentran protegidas al ataque enzimático, esta protección es debida principalmente a la asociación de estos polisacáridos con la lignina, que actúa como una barrera envolviéndolos, lo que confirma la necesidad de algún tipo de pretratamiento antes de la hidrólisis para aumentar la conversión en azúcares reductores.

Es importante resaltar que en este estudio el proceso con Cal tuvo un tiempo más largo tanto de pretratamiento como de hidrólisis, y además unas condiciones que todavía no son óptimas lo que hace que los resultados todavía no sean los mejores para la comparación de este paso del proceso.

En los resultados de las lecturas de glucosa y xilosa en HPLC que se muestran en la Tablas 10 y 11 del Anexo G1, así como en la diferencia entre los ART y la glucosa mostrada en la Figura 5C, se observa que la fracción hidrolizada con material pretratado con Peróxido presento muy bajo contenido de xilosa (menos de la mitad) en comparación con el contenido de xilosa presente en el otro hidrolizado, sin embargo en ambos casos el contenido de pentosas es inferior al de hexosas. Esto se debe probablemente a que el pretratamiento con Peróxido retira no solo la lignina, sino también buena parte de la hemicelulosa, mientras que el pretratamiento con Cal retira la lignina y mantiene la hemicelulosa que luego es hidrolizada por las enzimas. ( **Holtzapple et al.**, 1997).

En la Figura 5B y en la Tablas 10 y 11 se puede observar el perfil de la hidrólisis del bagazo pretratado con Peróxido de Hidrógeno comercial marca ECIBRA, se nota que este reactivo funciona prácticamente igual al Peróxido analítico Merck, siendo ésto de gran importancia en la reducción de costos globales del proceso.

#### **4.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE LOS HIDROLIZADOS PRETRATADOS**

Es de gran importancia investigar la fermentabilidad de los hidrolizados enzimáticos obtenidos tras la aplicación de pretratamientos ya que algunos inhibidores biológicos de la fermentación, como fenoles y furfurales, pueden ser producidos o desprendidos en el hidrolizado durante el pretratamiento. En el presente trabajo se va a determinar si el licor del hidrolizado enzimático pretratado con Cal y con Peróxido de Hidrógeno alcalino es fermentable o no.

Vale la pena resaltar que el hecho de que no se tomen las condiciones óptimas del pretratamiento con Cal no influye en el análisis de la fermentación de los dos hidrolizados pretratados (principal objetivo de este trabajo), ya que para éste paso del proceso se parte de concentraciones de sustrato similares.

##### **4.4.1. Ensayos de fermentación.**

Inicialmente se hizo un test de fermentación con material pretratado con Peróxido para establecer el tiempo de fermentación, recolectando muestras periódicamente hasta que se verifico el agotamiento de la fuente de carbohidratos indicado por la disminución en la concentración de azúcares reductores, los cuales se cuantificaron con la Prueba de DNS descrita en el Ítem 3.6.1. El tiempo total de fermentación fueron 18 horas, sin embargo a partir de la 8 hora, el valor de ART fue prácticamente constante, lo cual indica que para esta hora el sustrato (glucosa) ya había sido consumido totalmente. Los resultados de este Test se pueden ver en la Tabla 12, y en la figura 6A .

Como referencia para establecer la existencia de inhibidores dentro de los hidrolizados, se hicieron dos fermentaciones con glucosa pura, partiendo de concentraciones iniciales similares a las de los hidrolizados y siguiendo las mismas condiciones de fermentación, sus resultados se pueden observar en la

Figura 8 y en las tablas 18 y 19. Para el estudio de la fermentabilidad de los hidrolizados así como de ajuste de los parámetros cinéticos se hicieron ensayos, con las condiciones especificadas en la Tabla 1.

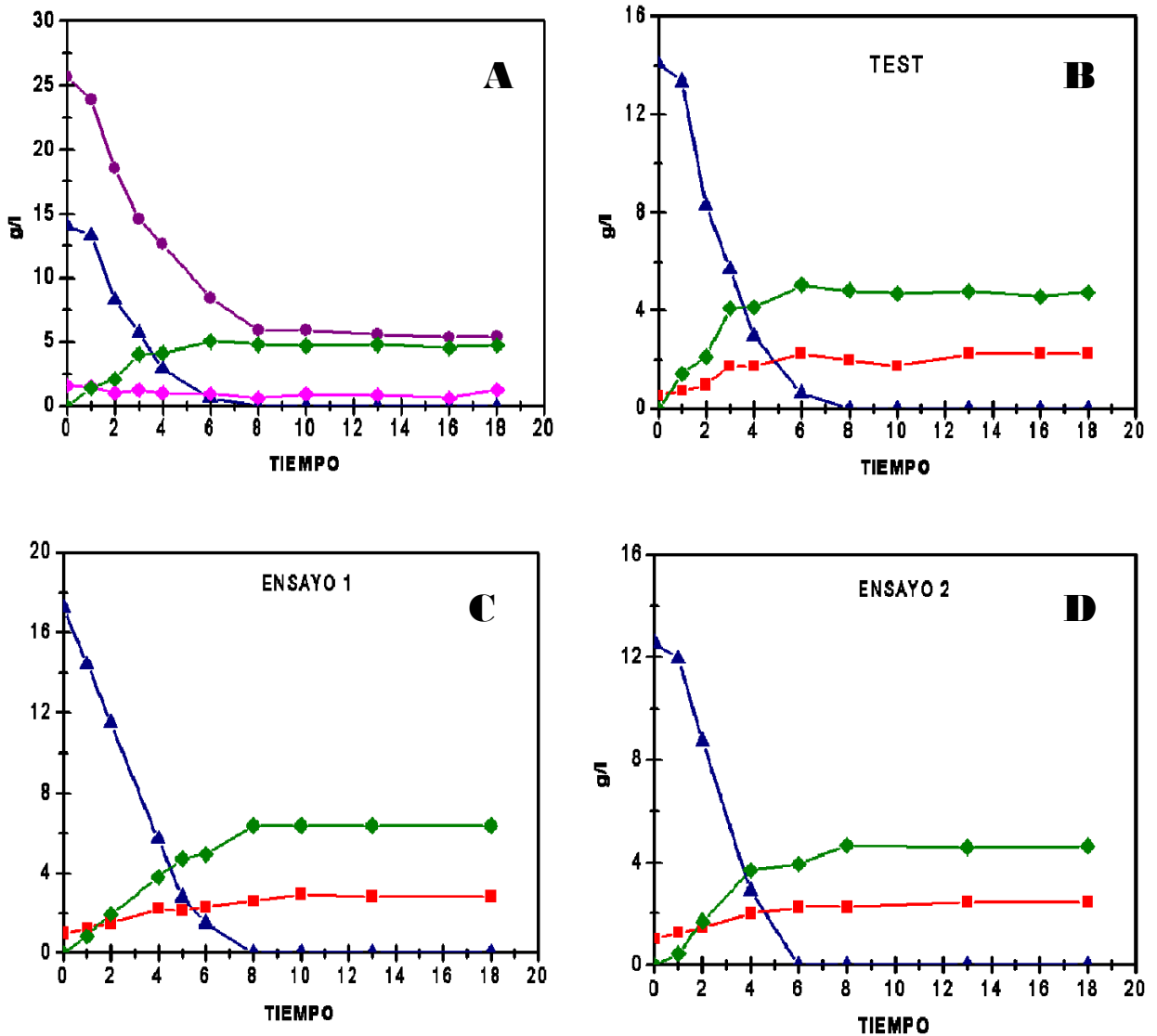
**Tabla 1.** Datos iniciales de los ensayos de fermentación.

<b>Medio</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Nombre</b>	<b>Glucosa. Inicial.(g/l)</b>
H. Enzimático	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Test	18.688
H. Enzimático	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ensayo 1	20.704
H. Enzimático	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ensayo 2	14.596
H. Enzimático	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ensayo 3	17.568
H. Enzimático	Ca (OH) <sub>2</sub>	Ensayo 1	14.476
H. Enzimático	Ca (OH) <sub>2</sub>	Ensayo 2	17.672
Referencia	-----	Ensayo 1	16.996
Referencia	-----	Ensayo 2	15.418

Al ensayo 3 con Peróxido se le retiro muestra solamente inicial y final, para comprobar como se ve en los resultados presentados en la tabla 15 del Anexo G, que el retiro de muestras de 8ml no afectaba el rendimiento del proceso.

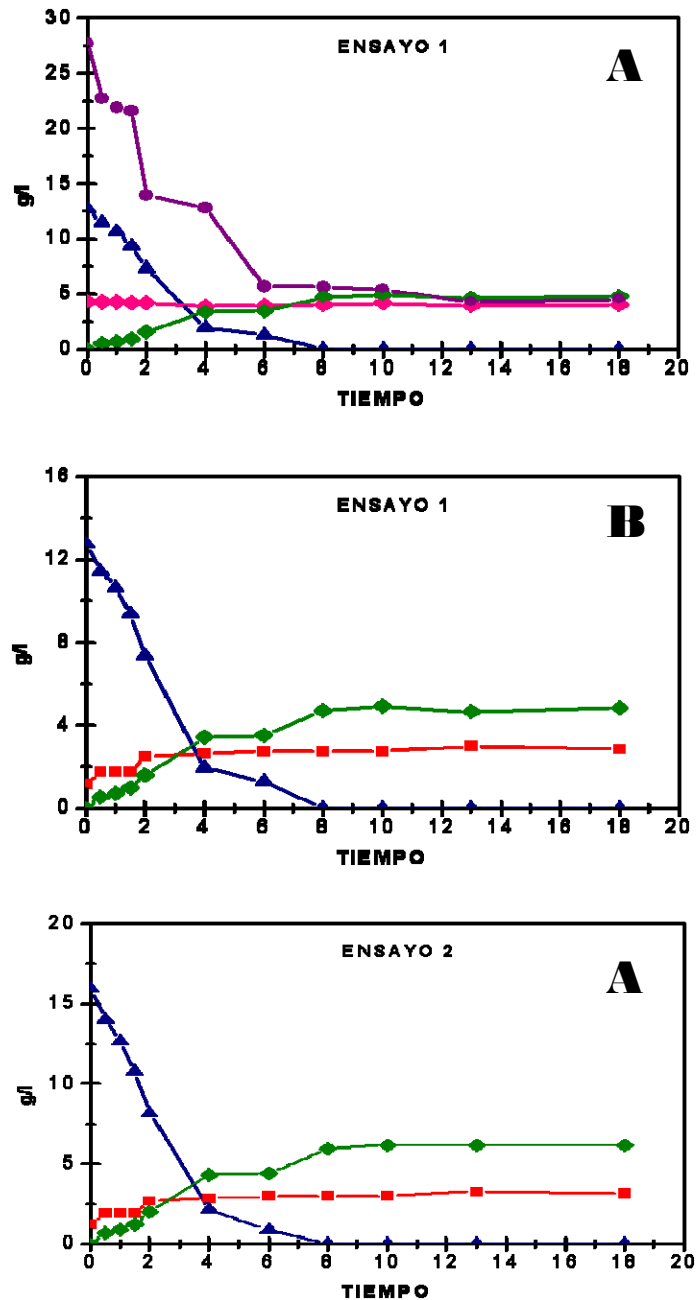
A continuación en las Figuras 6, 7 y 8 se muestran los perfiles de la fermentación de los hidrolizados pretratados con Peróxido de Hidrógeno, con Cal y de referencia respectivamente. Los resultados experimentales de las lecturas de Glucosa, Xilosa, Glicerol y Etanol leídos en el HPLC así como los de Biomasa, de los ensayos de fermentación con los diferentes hidrolizados se pueden ver en el Anexo G2, G3 y G4. Posteriormente en la figura 9 se muestran en una misma grafica cada perfil (glucosa, etanol, glicerol y biomasa en función del tiempo) obtenido con los tres medios de fermentación; con el fin de ver claramente las diferencias presentes en el proceso de fermentación alcohólica de cada uno.

#### 4.4.1.1. Fermentación con Hidrolizado Pretratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**Figura 6.** Perfiles de la fermentación por *S. Cerevisiae*, del hidrolizado enzimático del bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno. (A) Test., Perfil de consumo de Azúcares (ART, glucosa, xilosa) y producción de etanol. (B) Test., perfiles fermentativos. (C) Ensayo 1. Perfiles fermentativos. (D) Ensayo 2. Perfiles fermentativos. Símbolos usados Símbolos usados: ART (●); Xilosa (◆); Glucosa (▲); Etanol (◆) y biomasa (■)

#### 4.4.1.2. Fermentación con Hidrolizado pretratado con Ca (OH)<sub>2</sub>



**Figura 7.** Perfiles de la fermentación por *S. cerevisiae*, del hidrolizado enzimático del bagazo de caña pretratado con Hidróxido de Calcio. (A) Ensayo 1, Perfil de consumo de Azúcares. (B) Ensayo 1. Perfiles fermentativos. (C) Ensayo 2. Perfiles fermentativos. Símbolos usados: ART (●); Xilosa (◆); Glucosa (▲); Etanol (◆) y biomasa (■)

#### 4.4.1.3. Fermentación de Glucosa Pura- Referencia

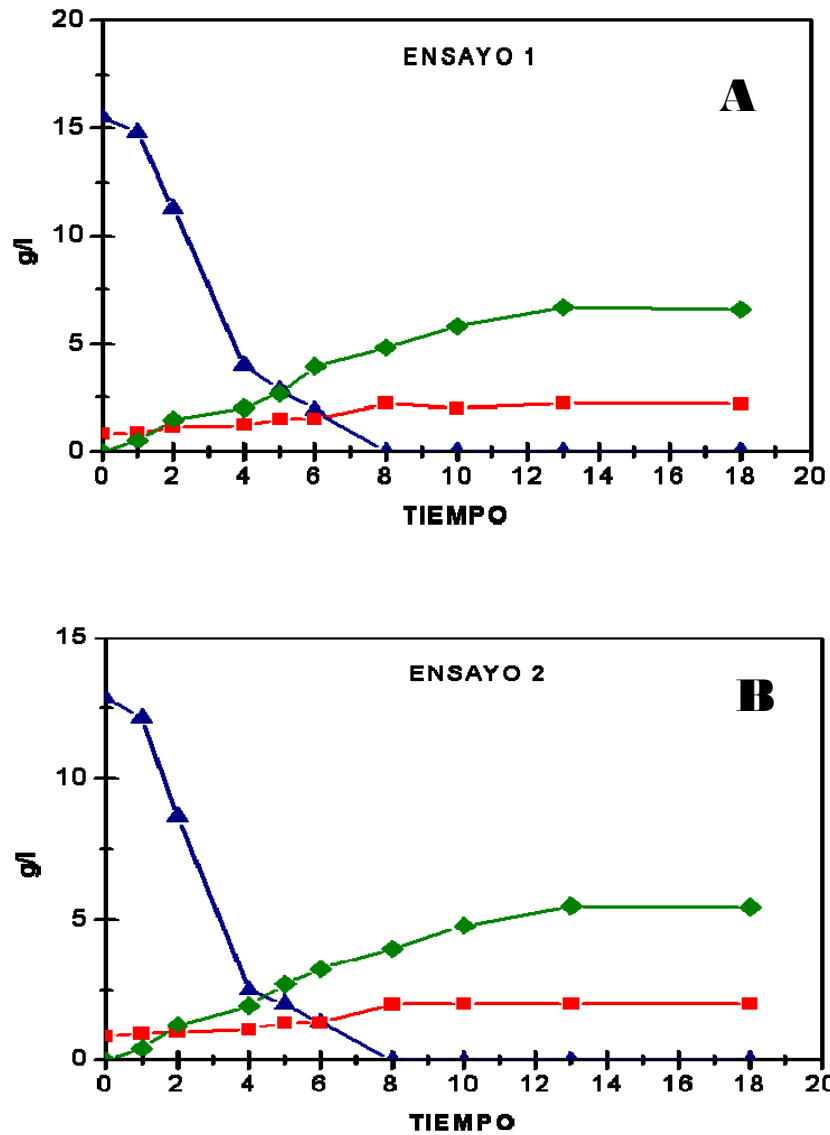
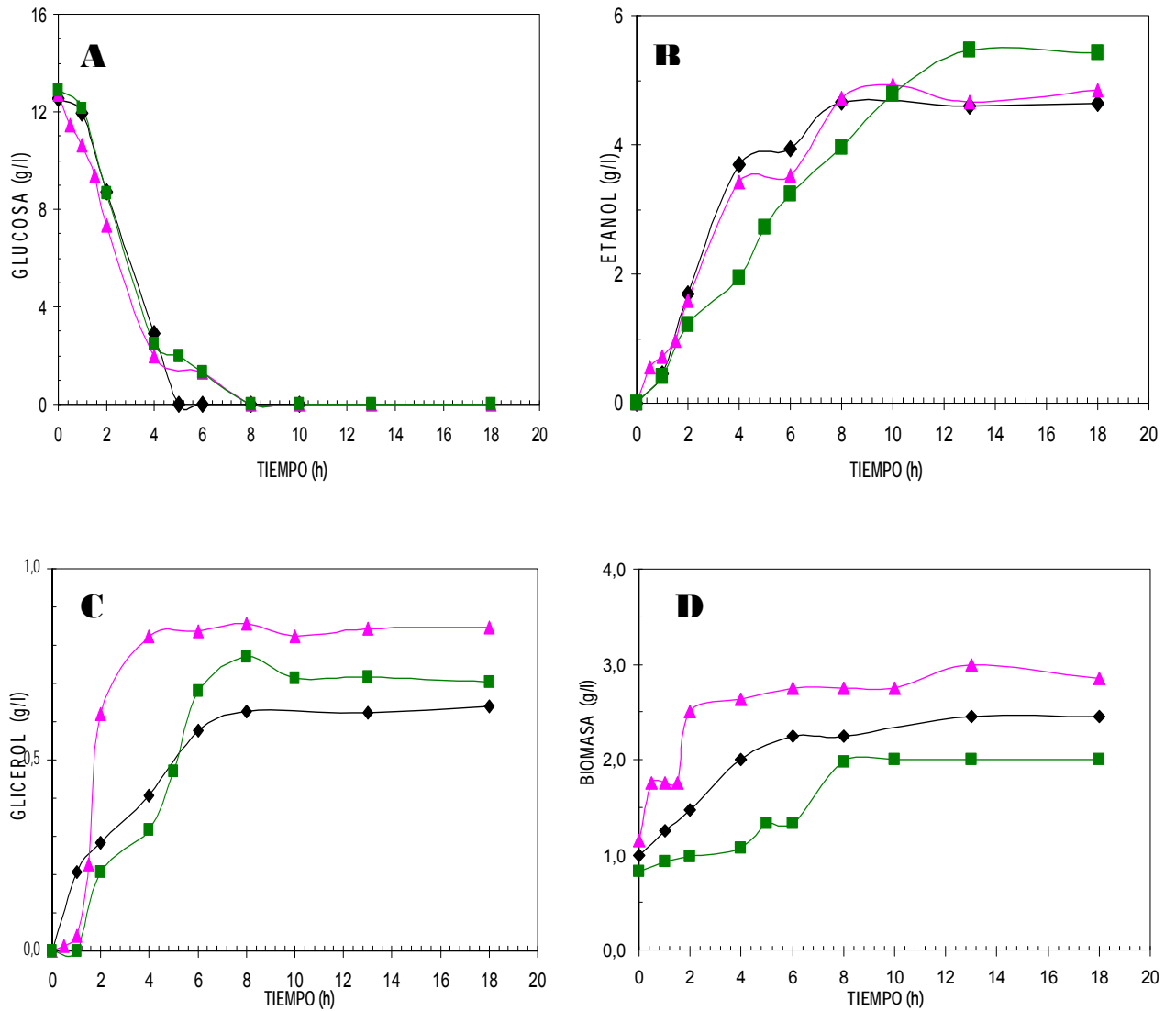


Figura 8. Perfiles de la fermentación de referencia con glucosa Pura.

(A) Ensayo 1, (B) Ensayo 2. Símbolos usados:

Glucosa ( $\blacktriangle$ ); Etanol ( $\blacklozenge$ ) y biomasa ( $\blacksquare$ )

#### 4.4.1.4. Comparación de los perfiles



**Figura 9.** Perfiles de la fermentación alcohólica del hidrolizado enzimático del bagazo de caña, pretratado con Peróxido, Cal y referencia. (A) Consumo de Glucosa, (B) Producción de Etanol, (C) Producción de Glicerol, (D) Biomasa. Símbolos usados: Pre-Hidrolizado con Cal ( $\blacktriangle$ ); Pre-Hidrolizado con Peróxido ( $\blacklozenge$ ) y Referencia ( $\blacksquare$ ).

En la Figura 9 se muestra que para los tres casos, al inicio hay un consumo rápido de glucosa, que coincide con la parte en donde se da un gran crecimiento de microorganismos y donde la producción de alcohol es muy pequeña. También se observa que la levadura presenta un consumo rápido de substrato en las primeras cuatro horas, independientemente de la concentración inicial de cada ensayo. La formación de etanol en los hidrolizados pretratados tuvo un comportamiento similar, y crece exponencialmente a partir de la 1 h, alcanzando la producción máxima de etanol a las 8 horas para pretratados con Peróxido y a las 10 horas para pretratados con Cal, mientras en la fermentación de referencia la producción de etanol fue más alta y empezó desde la primera media hora hasta alcanzar su producción máxima de etanol a las 13 h. El consumo de glucosa a lo largo de la fermentación fue igual para el hidrolizado pretratado con Cal y para la referencia (10h), mientras que en el hidrolizado pretratado con Peróxido la glucosa tuvo un consumo más rápido, de 8 horas.

En los procesos fermentativos convencionales existe una fase en donde se presenta primero la adaptación de la levadura, luego un fase de crecimiento exponencial y posteriormente una fase estacionaria en la que se alcanza una máxima concentración de microorganismos. En la figura 9D se ve que en todas las fermentaciones la levadura no presentó una fase inicial de adaptación o retraso "lag", lo cual indica que la presencia de sustancias tóxicas es muy baja y que las células tenían actividad completa. La producción de etanol por levaduras depende en gran parte de las condiciones experimentales.

En las Figuras 6A y 7A, se muestra que el consumo de ART durante la fermentación, tiene un comportamiento similar al de la glucosa, independientemente del medio. Al final de la fermentación se observa que para hidrolizado pretratado con Peróxido un 5.440 g/l, equivalente al 18.3% del total de los azúcares reductores no fueron consumidos, mientras que en la fermentación con Hidrolizado pretratado con Cal un 4.506 es decir el 14.86%, no fue consumido,

esto se debe a que dentro de los azúcares reductores se encuentran pentosas y otros azúcares que son de difícil asimilación para la levadura, tales como Xilosa y Arabinosa, que no son fermentables por la *Sacchamomyces cerevisiae*, esto se confirma en el comportamiento de la xilosa (figuras 6A y 7A) dado por su cuantificación en HPLC, en donde también se observó que la arabinosa (no cuantificada) era otro de los azúcares constantes durante todo el proceso, La glucosa y la Xilosa representan aproximadamente el 85% del total de los azúcares reductores presentes en los hidrolizados hemicelulosicos de bagazo de caña. (**Pessoa. et al.**, 1997).

El glicerol es el producto secundario de la fermentación (**Lima et al.**, 2001). Analizando el perfil de la producción de glicerol y comparándolo con el perfil de la producción de etanol a través de las figuras 9B y 9C, puede ser observado que ambos tienen el mismo comportamiento y se ve la vinculación de la producción de glicerol con el crecimiento celular.

#### **4.5. PRODUCTIVIDAD Y RENDIMIENTO**

La tabla 2 muestra los datos de Rendimiento y productividad obtenidos de acuerdo con el ítem 3.12, con los resultados de los diferentes pre-hidrolizados. Estos parámetros cinéticos sirven para facilitar el diseño de un sistema de fermentación a una mayor escala siguiendo las mismas condiciones de operación

**Tabla 2.** Parámetros fermentativos observados durante la fermentación discontinua del los hidrolizados enzimáticos.

Nombre	G <sub>in.</sub> (g/l)	EtOH <sup>max</sup> (g/l)	Biomasa (g/l)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Q <sub>p</sub> (g/l*h)	R <sub>T</sub> %	R <sub>R</sub> %
<b>Test-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	14.076	5.052	1.6800	0.36	0.12	0.63	70.6	83.7
<b>Ensayo 1-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	17.260	6.386	1.943	0.37	0.11	0.80	72.5	86.0
<b>Ensayo 2-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	12.568	4.652	1.450	0.37	0.12	0.58	72.5	88.1
<b>Ensayo 1-Ca(OH)<sub>2</sub></b>	12.736	4.924	1.850	0.38	0.14	0.49	74.5	90.5
<b>Ensayo 1-Ca(OH)<sub>2</sub></b>	15.932	6.189	2.030	0.39	0.13	0.61	76.5	90.7
<b>Referencia -1</b>	15.512	6.728	1.430	0.43	0.09	0.52	84.3	-----
<b>Referencia -2.</b>	12.870	5.464	1.170	0.42	0.09	0.42	82.3	-----

En la Tabla 2, se puede ver que los ensayos de fermentación de los pre-hidrolizados con Cal dieron un rendimiento global de producción de etanol Y<sub>p/s</sub> y un R<sub>R</sub> ligeramente mayor al rendimiento de los pre-hidrolizado con peróxido, independiente de la concentración inicial de glucosa. También se puede ver que la mayor producción de masa celular Y<sub>x/s</sub> fue para el hidrolizado pretratado con Cal, seguido del pretratado con Peróxido y la menor producción de Masa celular se dio en la fermentación con glucosa pura.

El rendimiento que se obtuvo en general fue muy bueno, si se tiene en cuenta que solo se está fermentando la glucosa y se compara con resultados de investigaciones anteriores como la que hizo Carlos Martín en la universidad de Matanzas en Cuba sobre la fermentación a etanol del hidrolizado enzimático del bagazo de caña pretratado con Oxidación Húmeda a un pH de 10 y Explosión a vapor utilizando la levadura *S. Cerevisiae*, obteniendo un rendimiento de 0.2 g etanol/g azúcar para el pre-hidrolizado con Explosión a vapor y de 0.25g etanol/g para el hidrolizado con Oxidación Húmeda. (Martín et al. 2006).

**Badal C.** (2002) realizó estudios de fermentabilidad sobre hidrolizados enzimáticos de paja de trigo pretratados con Peróxido de Hidrógeno y fermentados con *Escherichia coli*, que es una levadura capaz de fermentar múltiples azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) a etanol, y obtuvo un rendimiento 0.41g etanol/ g azúcar en SFH.

El hecho de que todos los hidrolizados pretratados presenten un rendimiento alcohólico más bajo que el obtenido con la referencia de Glucosa Pura, sugiere la presencia de inhibidores como derivados por la lignina, productos de degradación de los azúcares y de la hemicelulosa, como por ejemplo furfural, e hidroximetilfurfural (HMF).

En el pretratamiento con Cal se emplean altas temperaturas, lo que hace que los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degraden originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). A su vez, estos dos compuestos se pueden degradar a otros productos. El furfural puede degradarse a ácido fórmico o bien polimerizarse (**Dunlop et al.**, 1948). El HMF origina cantidades equimoleculares de ácidos fórmico y levulínico (**Ulbricht et al.** 1984). Además de estos dos ácidos alifáticos (fórmico y levulínico), se origina ácido acético procedente de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa. La composición de la fracción obtenida tras el pretratamiento depende del tipo de biomasa que se esté tratando.

En el pretratamiento con Peróxido no se trabaja con altas temperaturas por lo que se cree que la inhibición que se origina en la fermentación se debe que durante el pretratamiento, una parte de la lignina también se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Se trata de un grupo de compuestos muy

heterogéneo que se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros y polímeros con una gran variedad de sustituyentes (**Larsson et al.** 2000). Entre ellos se encuentran ácidos, aldehídos y alcoholes aromáticos. Los fenoles originados en el pretratamiento varían según el tipo de biomasa, ya que existe una gran diferenciación de la lignina atendiendo al grupo taxonómico al que pertenezca la especie vegetal.

Las dos clases de hidrolizados antes de someterlos al proceso de fermentación pasaron por el proceso de evaporación, lo cual elimina los compuestos volátiles como el furfural, ácido acético y ácido fórmico, Pero compuestos como el ácido levulínico, el hidroximetilfurfural y los compuestos fenólicos no son eliminados. Por lo que se presume que éstos compuestos son los causantes de la diferencia en el rendimiento alcohólico de los hidrolizados con respecto a la referencia. Estos compuestos es posible detectarlos por medio de un análisis en HPLC, sin embargo en el presente estudio no se tenían las condiciones necesarias para cuantificar estos posibles inhibidores.

#### **4.6. AJUSTE DE PARÁMETROS Y MODELAMIENTO MATEMÁTICO.**

Después de un análisis de los datos experimentales, se realizó el modelamiento matemático del proceso fermentativo, calculando los siguientes parámetros:  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_{px}$ ,  $Y_x$ . Los parámetros  $K_s$  (g.l)= 6,  $K_i$  (g.l) = 84,  $n=1$ ,  $m_p=0.1$  y  $m_x=0.2$ , fueron los mismos utilizados en trabajos anteriores por **Tosseto**, 2002 y **Andrieta**, 2004 para glucosa como único sustrato de fermentación a 34° C.

En el Anexo G están las tablas que contienen los resultados experimentales obtenidos en cada fermentación, los cuales fueron utilizados como base para el cálculo de los parámetros fermentativos.

Las Figuras 10 y 11, representan el modelamiento cinético del proceso discontinuo para la fermentación de hidrolizado lignocelulósico en las condiciones

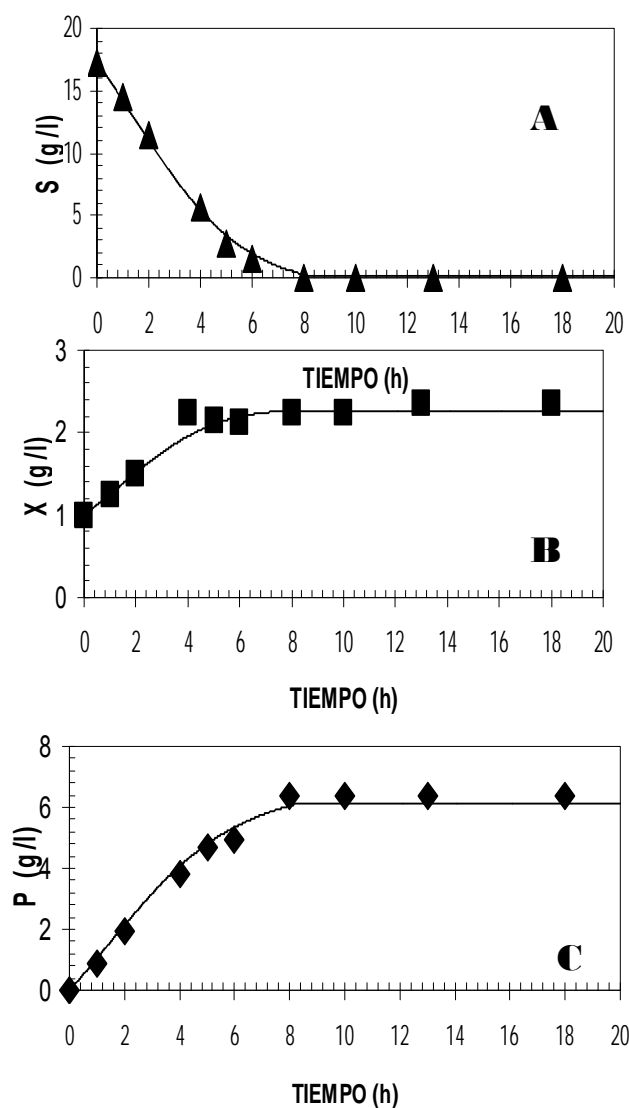
establecidas. El modelo matemático computado consiste en el sistema de ecuaciones 1, 2, 3, 9,10 y 11 y sigue el procedimiento que se presenta en el Anexo F. El ajuste de los parámetros por el método Quasi-Newton y posterior simulación, permite representar bien los datos experimentales para Sustrato (glucosa), biomasa y Producto (etanol). Los mejores resultados fueron los que minimizaron la función objetivo, representada por la Ecuación 12. La Tabla 3 muestra los valores de los parámetros cinéticos obtenidos con el modelo propuesto, utilizando las diferentes clases de hidrolizado testadas.

**Tabla 3.** Resultados de los parámetros cinéticos optimizados por el método Quasi-Newton.

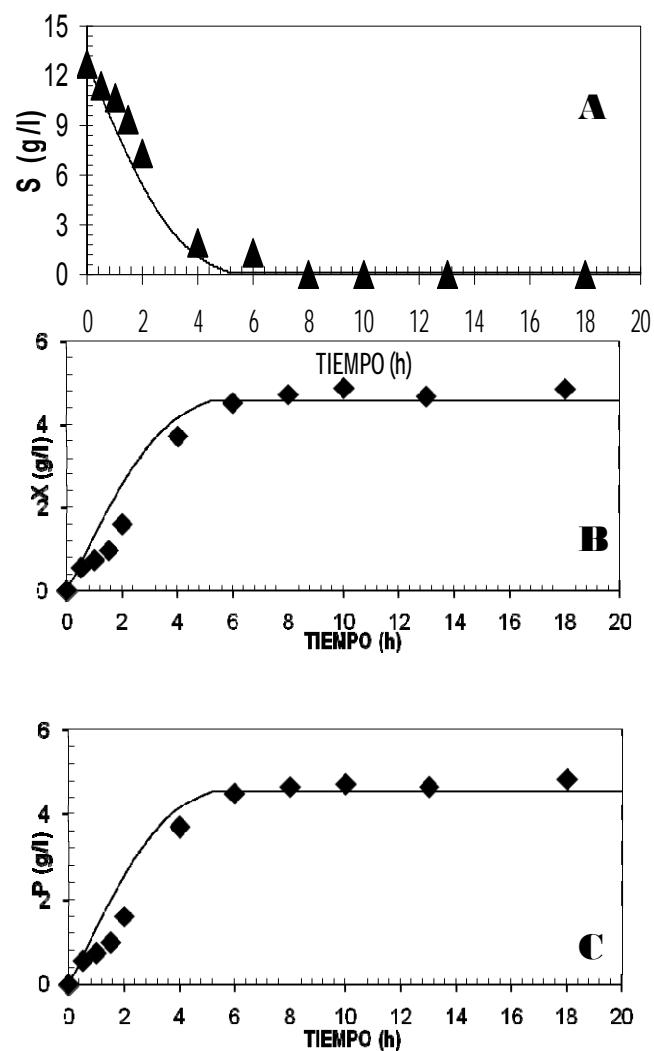
Parámetros	Test	En.1	En.2	En.1	En.2	En.1	En.2
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ca(OH) <sub>2</sub>	Ca(OH) <sub>2</sub>	Ref.	Ref.
$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0.45	0.38	0.37	0.45	0.43	0.30	0.31
$P_{\max.} (\text{g/L})$	8.25	8.15	8.25	8.250	8.23	8.28	8.01
$Y_{\text{px}}$	3.75	3.61	3.53	3.75	3.65	3.75	3.75
$Y_x$	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09

Las figuras 10 y 11 muestran los mejores ajustes obtenidos para cada clase de hidrolizado así como para la referencia, donde los valores calculados para cada modelo ajustado son comparados a los datos experimentales obtenidos.

Se observa que los perfiles de consumo de sustrato, producción de etanol y células presentaron ajustes bastante satisfactorios a los datos experimentales, lo cual indica que el modelo propuesto puede ser utilizado para describir procesos fermentativos que utilicen glucosa como sustrato y como levadura *S. cerevisiae* hidrolizados lignocelulósicos pretratados a las mismas condiciones de los ensayos experimentales.



**Figura 10.** Modelamiento cinético del proceso discontinuo de la fermentación de hidrolizados enzimáticos pretratados con Peróxido de Hidrógeno. (A) Consumo de sustrato. (B) Producción de biomasa. (C) Producción de Etanol. Simulación (QN—) Datos experimentales: S (▲), X (■) y P (◆)



**Figura 11.** Modelamiento cinético del proceso discontinuo de la fermentación de hidrolizados enzimáticos pretratados con Hidróxido de Calcio. (A) Consumo de sustrato. (B) Producción de biomasa. (C) Producción de Etanol. Simulación (QN—) Datos experimentales: S (▲), X (■) y P (◆).

## 5.CONCLUSIONES

La evaluación de la fermentabilidad con *S.Cerevisiae* de los hidrolizados enzimáticos con diferentes pretratamientos, indicó, que en los dos casos con Peróxido de Hidrógeno Alcalino y con Hidróxido de Calcio, es posible fermentar a etanol obteniendo rendimientos de 88.1 y 90%, respectivamente.

El proceso de producción del hidrolizado fue adecuado para la aplicación como sustrato en la fermentación etanólica, teniendo en cuenta que hubo formación inferior de subproductos inhibidores durante los pretratamientos en comparación a una fermentación de referencia de glucosa pura en las mismas condiciones.

Se comprobó que el uso de reactivos comerciales como el peróxido de Hidrógeno en el proceso de pretratamiento, no afecta la deslignificación del bagazo, ni produce sustancias que afecten las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación etanólica, reduciendo así costos del proceso.

Fue demostrado que la susceptibilidad de la celulosa para la hidrólisis enzimática fue superior en bagazo pretratado con Peróxido de Hidrógeno alcalino que para el proceso con Hidróxido de Calcio. Viéndose esto reflejado en la producción de azúcares fermentables.

Se ajustaron los datos experimentales a un modelo matemático desarrollado en FORTRAN 6.6 que describió satisfactoriamente el proceso, y que puede ser utilizado para describir fermentaciones que utilicen glucosa como sustrato y como levadura *S. cerevisiae* en hidrolizados lignocelulósicos pretratados en las mismas condiciones a las de los ensayos experimentales.

## 6.RECOMENDACIONES

Aunque estos resultados son importantes para demostrar las implicaciones de métodos diferentes de pretratamiento en la convertibilidad enzimática de celulosa y en la fermentabilidad de los prehidrolizados, un estudio de con una configuración de proceso con hidrólisis y fermentación simultanea SSF, teniendo en cuenta una proporción superior de bagazo, sería de gran interés para la aplicación del industrial.

La fermentación de las pentosas a etanol continúa siendo una barrera tecnológica difícil de superar. Es importante estudiar el rendimiento del proceso utilizando levaduras que también fermenten la xilosa, ya que es uno de los componentes mayoritarios del hidrolizado.

Es de gran importancia optimizar el pretratamiento con Hidróxido de Calcio, contando con equipos que proporcionen altas temperaturas.

## 7.BIBLIOGRAFÍA

ANDRIETTA, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica em escala industrial. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1994. 178p.

ATALA, D.I.P. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização do processo. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2000. 135p.

BALLESTEROS I. (2000) Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS). Tesis doctoral. Universidad de Alcalá de Henares.

BASSO, L. C.; ALVES, D.M.G; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. Processos de produção de álcool. Piracicaba: ESALQ-USP. 1996. Cap. 4, p 38-85.

CARDONA, C, SANCHEZ O, (2005). Producción Biotecnológica de alcohol carburante, obtención a partir de diferentes materias primas. V. *Interciencia*, 30: 671-678.

CHANG, V. S., HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84, 5–37, 2000.

DUNLOP A. (1948) Furfural formation and behaviour. *Ind. Eng. Chem.* 40: 204-209.

FAN, L. T., LEE, Y. H, GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* 23, 157-187, 1982.

FERNÁNDEZ J. (1995) La biomasa como fuente de energía y productos no alimentarios. En: *La biomasa como fuente de energía y productos para la agricultura y la industria*. Serie ponencias. Editorial CIEMAT. Madrid.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl Chem*, 59:257-268, 1987

HENRY, R. J., CANNON, D. C., WINKELMAN, J. *Clinical chemistry principles and techniques*, 2 ed. Harper and Row Publishers Inc. N.Y. p. 1288, 1974.

HOLTZAPPLE MT, ROSS MK, CHANG NS, CHANG VS, ADELSON SK, BRAZEL C. 1997. Biomass conversion to mixed alcohol fuels using the MixAlco process. In: *Fuels and Chemicals from Biomass*, Editors: Saha BC and Woodward J., pp. 130-142, ACS Symp. Ser. 666. American Chemical Society, Washington DC.

KLINKE H. B., AHRING B. K., SCHMIDT A. S., & THOMSEN A. B. (2002) Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Biores. Technol.* 82: 15-26.

LARSSON S. (2000). Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral. Lund. Suecia.

LIMA U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In. LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001. p.1-43.

MARTÍN C, MARCET M AND THOMSEN AB, (2002). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 274–282

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n°3, 426-428, 1959.

OLIVA, J. M. (2003).efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de Biomasa de chopo sobre *kluuveromyces marxianus*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias biológicas

PANDEY, A.; SOCOOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, 69-80, 2000.

PESSOA JR., A., MANCILHA, I.M. & SATO, S. 1997 Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 14, 291±297.

RABELO, S.C. (2007) Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol combustível. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, .Dissertação (Mestrado).

Rivera, E.C., Costa, A.C., Andrade, R.R., Atala, D.I.P., Maugeri Filho, F., Maciel Filho, R. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature dependent kinetics of biotechnological processes. *Biochemical Engineering Journal*, 36: 157-166, 2007.

ROSELL, C.E.V. (2006).Fermentação do hidrolisado “III Workshop tecnológico sobre hidrólise para produção de etanol”, sessão 3.

SUN Y. & CHENG J. (2001) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11.

TOSETTO, G.S. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2002. 81p.

ULBRICHT R. J., SHARON J., & THOMAS J. (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4: 843-853.

## ANEXO A- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

### A.1. Actividad de la *celulasa*

Para la determinación de la actividad de la enzima **Celulasa**, inicialmente se preparo una solución 1:20, es decir una concentración de 0.05 de enzima. A partir de esta solución se efectuaron 5 diluciones más en tampón citrato 0,05 mol/L, pH 4,8.

Se utilizan 5 diluciones diferentes para la determinación de la actividad. Primero se adicionan a 5 tubos de ensayo 1.0 ml de tampón citrato 0,05 mol/L, pH 4,8, a cada uno se le agrega 50 mg de filtro de papel, y son llevados a baño termostático a 50°C. Después se adicionan 0.5 ml de la enzima previamente diluida incubados por 60 minutos. Después de este tiempo se sacan los tubos y se les agrega 1.5 ml del reactivo DNS y se lleva a 95 °C por 5 minutos y luego se transfieren a un baño de hielo. Al final, se adicionan 10,5 mL de estabilizante se espera a que la pulpa se sedimente para leer el color formado en el espectrofotómetro.

Después de las lecturas de las absorbancia, fue trazada una curva donde se relaciona la dilución de la enzima con la concentración de glucosa liberada por 0.5 mL de enzima y se determina la actividad de la enzima teniendo en cuenta que la unidad FPU se basa en la liberación de exactamente 2,0 mg de glucosa siendo esto equivalente a 2,0/0,18016  $\mu$ mol de 50 mg de filtro de papel por 0,5 mL de enzima diluida en 60 minutos de reacción.

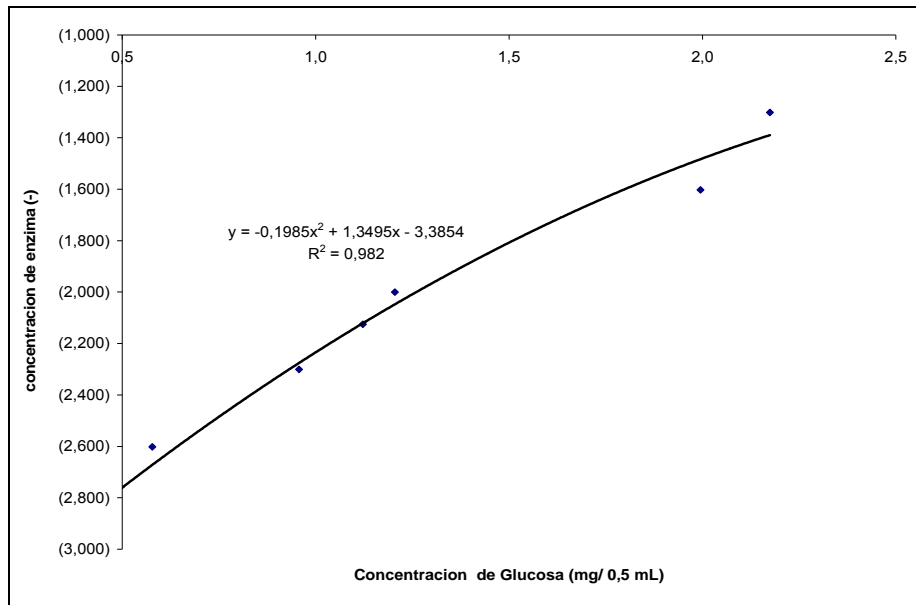
Se siguió el procedimiento descrito en el ítem 3.6.3 utilizando la curva patrón del método DNS (Anexo B1) para calcular la concentración de ART liberada por cada dilución de la enzima. En la tabla 4 se muestran las concentraciones de enzima con la concentración de ART por 0.5 ml de enzima.

**Tabla 4.** Valores de absorbancia y concentración de ART liberados por cada dilución de enzima.

Dilución	[enzima]	Log [enzima]	Abs. muestra	Abs Enzima	Abs substrato	Abs. Final	[ART] (mg/0,5ml)
20	0,050	-1,301	0,646	0,028	0.003	0,615	2,174
40	0,025	-1,602	0,565	0,004	0.003	0,558	1,994
100	0,010	-2,000	0,362	0.000	0.003	0,359	1,204
133,33	0,007	-2,124	0,335	0.000	0.003	0,332	1,121
200	0,005	-2,301	0,280	0.000	0.003	0,277	0,957
400	0,002	-2,602	0,156	0,001	0.003	0,152	0,578
800	0,001	-2,903	0,107	0,002	0.003	0,102	0,493

Se trazo una curva donde se relacionaron los logaritmos de las diferentes concentraciones de la enzima y la concentración de glucosa liberada por 0.5 ml de enzima. Como se muestra en la Figura 20.

Según **Ghose et al.** (1987), una unidad de la actividad de la enzima celulasa (FPU) se basa en la liberación de exactamente 2,0 mg de glucosa equivalente, es decir, 2,0/0,18016  $\mu$ mol de 50 mg de filtro de papel por 0,5 mL de enzima diluida en 60 minutos de reacción. Por lo tanto con la ecuación que mejor modelo la curva obtenida en la Figura 12, se determino la concentración de enzima necesaria para liberar 2.0 mg de glucosa.



**Figura 12.** Gráfico de la concentración de la enzima celulasa en cada dilución en función de la concentración de glucosa liberada por 0.5 ml de enzima.

La ecuación 5 (poli nómica de segundo grado) fue la que modelo mejor la curva obtenida:

$$y = -0,1985x^2 + 1,3495x - 3,3854 \quad \text{con } R^2 = 0,982 \quad (\text{Ec } 5)$$

$$[\text{Enzima}] = -0,1985 \cdot [2,0 \text{ mg glucosa}]^2 + 1,3495 \cdot [2,0 \text{ mg glucosa}] - 3,3854$$

$$[\text{Enzima}] = 0,033$$

Teniendo el valor de la disolución, se calculo la actividad enzimática de la celulasa, por medio de la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad de la Celulasa} = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 \times 0,033)} = 11,19 \text{ FPU/mL}$$

Por lo tanto la actividad de la *Celulasa* es de **11.19 FPU/mL** de enzima bruta.

## A.2. Actividad de la $\beta$ -Glucosidasa

Para la  $\beta$ -glucosidasa, la medida de la actividad fue determinada a través de una solución de celobiosa y expresada en unidades de celobiosa (CBU) por volumen de enzima original, como es recomendado por la IUPAC (**Wood y Bhat et al.** 1988).

Se utilizaron 4 diluciones de la enzima para la determinación de la actividad enzimática. A cada uno de los cuatro tubos de ensayo se le adiciono 1.0 ml de la enzima diluida en el tampón citrato 0.05 mol/l, pH 4.8 y luego fueron llevados al baño termostático a 50° C para equilibrar la temperatura. Después de 10 min., se adiciono 1,0 ml de solución de sustrato (solución de 15 mmol/L de celobiosa en tampón citrato) y la reacción fue incubada por 30 minutos. Al término de la reacción, los tubos fueron sumergidos en agua hirviendo por 5 min. y luego llevados a un baño de hielo. La determinación de la concentración de glucosa liberada por cada concentración de enzima fue determinada por el método de glucosa GOD-PAP como se describió en el ítem 3.6.2. Al final de cuantificar la glucosa se adicionó 0.2 ml de ácido sulfúrico 72% en cada tubo de ensayo para garantizar que la reacción haya terminado.

La ecuación 6 muestra el cálculo de la actividad

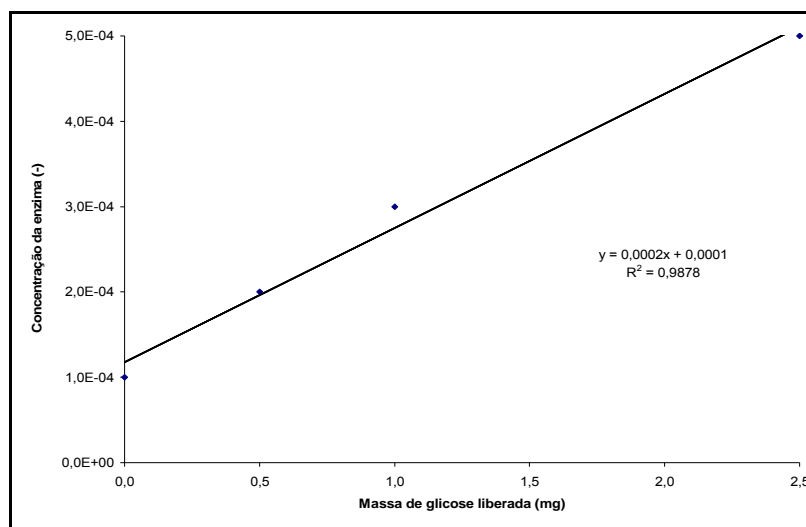
$$\begin{aligned} \text{CBU/mL} &= \frac{0,5}{0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot [\text{enzima diluída}]} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \\ \text{CBU/mL} &= \frac{0,0926}{[\text{enzima diluída}]} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 6})$$

Para la determinación de la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se partió de una solución de enzima con dilución de 1:1000, ósea, concentración de 0,001 de enzima. Con esta solución se efectuaron cuatro nuevas diluciones en tampón citrato 0,05 mol/L pH 4,8. Las concentraciones de las soluciones de  $\beta$ -glucosidasa son mostradas en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de las concentraciones de la enzima, con sus respectivas absorbancias.

enzima]	Absorbancia muestra	Absorbancia enzima	Absorbancia sustrato	Absorbancia final	Glucosa (mg)
0,00050	0,005	0,000	0,000	0,005	2,50
0,00030	0,006	0,003	0,001	0,002	1,00
0,00020	0,004	0,002	0,001	0,001	0,50
0,00010	0,003	0,003	0,000	0,000	0,00

Con las lecturas de la absorbancia se trazo la curva de la Figura 13, donde se relaciona la concentración de la enzima en cada concentración y la de la masa de glucosa liberada (mg) por 1.0 ml de enzima



**Figura 13:** Gráfica de la concentración de la enzima en función de la glucosa liberada por 1.0 ml de enzima.

Según **Wood y Bhat** (1988), una unidad de la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa (CBU) esta basado en la liberación de 1.0 mg de glucosa, es decir 0,5/0,18016  $\mu$ mol de celobiosa convertida por 1,0 ml de enzima diluida en 30 minutos de reacción. Por lo tanto con la ecuación de la recta obtenida en la Figura 15, se logro determinar la concentración de enzima necesaria para liberar exactamente 1,0 mg de glucosa:

$$\begin{aligned}
 [\text{enzima}] &= 0,0002 \cdot (\text{massa de glicose liberada}) + 0,0001 \\
 [\text{enzima}] &= 0,0002 \cdot 1,0 + 0,0001 && \text{(Ec.7)} \\
 [\text{enzima}] &= 0,0003
 \end{aligned}$$

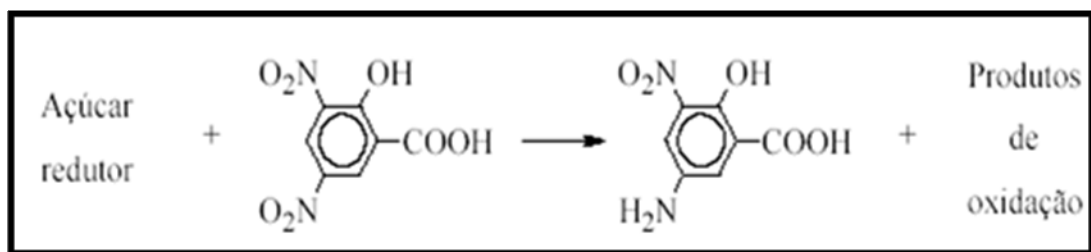
Con el valor de la dilución de la enzima, se puede calcular la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa a través de la Ecuación 8.

$$\text{Actividad de la } \beta\text{-glucosidasa} = \frac{0,5}{0,1816 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot 0,0003} = 308,37 \text{ CBU/mL} \quad \text{(Ec. 8)}$$

Por lo tanto el valor de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa es de **308,37 FPU/mL** de enzima bruta.

## ANEXO B. MÉTODO DNS

Según este método, el DNS (Figura 14) sufre la reducción de uno de sus grupos nitro al reaccionar con los carbohidratos, formando un compuesto rojizo que presenta una fuerte absorción en los 540nm.



**FIGURA 14.** Reacción de azúcares reductores en el ácido 3.5 dinitro-salicílico

Para el procedimiento fueron adicionados 0,5 ml de muestra y 0,5 ml de DNS en un tubo de ensayo. El medio reaccional permaneció en agua a 95°C por exactamente 5 minutos y enseguida fue enfriado en un baño de hielo y a cada tubo se le adicionaron 3,5 ml de una solución de tartarato de sodio y potasio para estabilizar el color. Se hace la lectura en el espectrofotómetro a 540nm. La cuantificación de ART fue obtenida a través de la curva de calibración obtenida como se explica en el apartado B1, de este Anexo, utilizando el azúcar reductor de interés (glucosa) como patrón. La curva de calibración se basó en soluciones patrón que fueron sometidas al mismo procedimiento de las muestras.

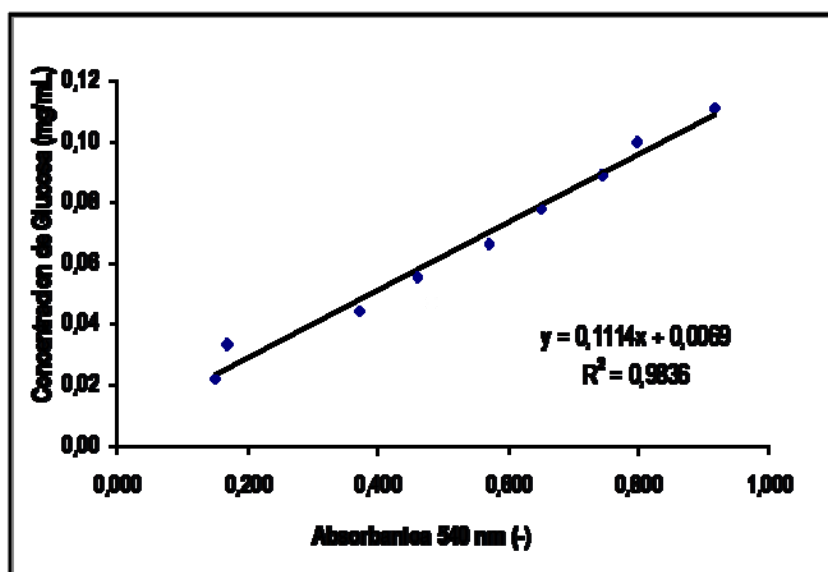
### B.1 Construcción de la curva patrón para el método DNS

Para la determinación de la concentración de ART (Azúcares Reductores Totales) por el método DNS, es necesario construir una curva patrón que relacione la concentración de glucosa con la absorbancia de la muestra en una longitud de onda de 540nm. En la Tabla 6, se muestra la concentración de las soluciones de glucosa y sus respectivas absorbancia después de aplicarles el método DNS

**Tabla 6.** Absorbancia de la solución de glucosa después de la reacción con el método DNS para construcción de la curva patrón.

[ART] (mg/mL)	Absorbancia
0,20	0,149
0,30	0,169
0,40	0,371
0,50	0,461
0,60	0,570
0,70	0,650
0,80	0,742
0,90	0,796
1,00	0,917

Con los datos mostrados en la tabla 6, se trazó la curva patrón que se ve en la Figura 16, la cual se utilizó en todos los cálculos de ART que se hicieron en el trabajo.



*Figura 15: Curva patrón de glucosa (azúcar reductor).*

## ANEXO C- INÓCULO PARA LA FERMENTACIÓN

### C.1. Composición de los medios de cultivo

#### C.1.1 Medio líquido basal (MLB).

El medio utilizado para activación del microorganismo presenta la composición mostrada en la tabla 7. Todos los componentes se pesan y se disuelven en agua destilada, y antes de ser utilizado pasan por esterilización en autoclave.

**Tabla 7.** Composición del medio **MLB** de activación para el cultivo de *S. cerevisiae*.

Compuesto	Concentración (Kg/m <sup>3</sup> )
Extracto de levadura	3
Extracto de malte	3
Peptona	5
Glucosa	10

#### C.1.2. Medio Líquido

El medio líquido de crecimiento para el inóculo tiene la composición que se presenta en la tabla 8. Todos los componentes se pesan y se disuelven en agua destilada, y antes de ser utilizados pasan por esterilización en autoclave durante 20 min.

**Tabla 8.** Composición del medio líquido para el crecimiento del inóculo.

Compuesto	Concentración (Kg/m <sup>3</sup> )
Sacarosa	20
Extracto de levadura	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
NH <sub>4</sub> Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,65

### C.1.3. Medio Semi-Sólido

Para la preparación del medio semi-sólido para la activación de la levadura se prepara un medio con la composición de la tabla 9. Todos los componentes se pesan y se disuelven en agua destilada caliente, y antes de ser utilizados pasan por esterilización en autoclave. Se inclina el tubo hasta que se solidifique con el fin de que cuando se haga el repique de la levadura, esta tenga mayor área de contacto con el medio.

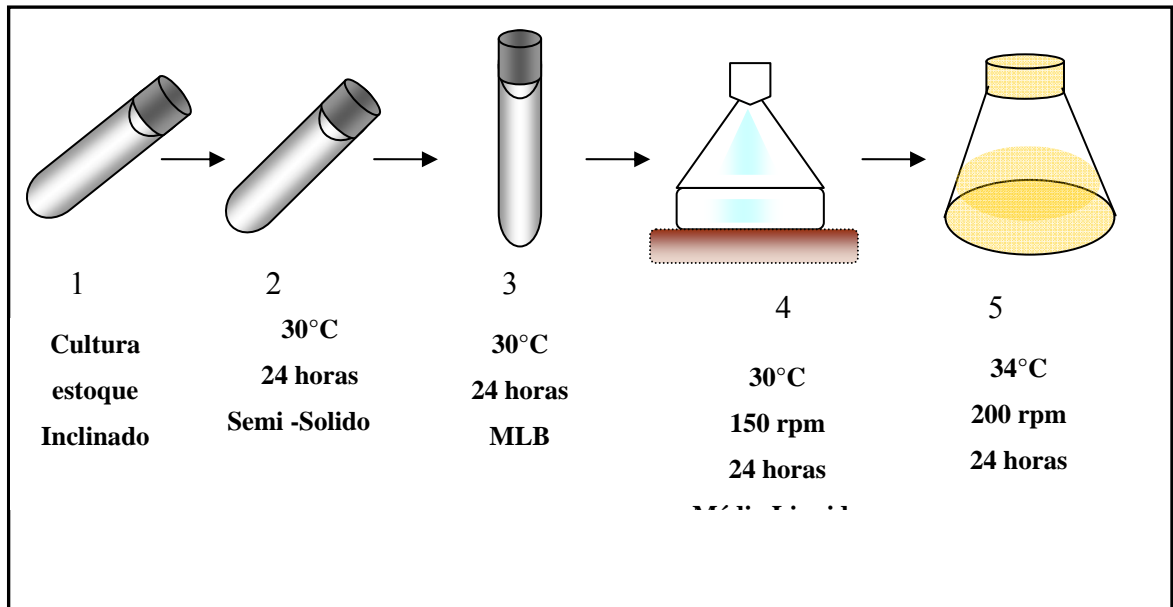
**Tabla 9.** Composición del medio semi- sólido para el crecimiento del inóculo.

Compuesto	Concentración (Kg/m <sup>3</sup> )
Sacarosa	20
Extracto de levadura	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
NH <sub>4</sub> Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,65
Agar-Agar	20

## C.2. Preparación del inóculo

Inicialmente se hace la activación de la *Saccharomyces cerevisiae* de la cultura estoque transfiriéndola para un tubo de ensayo que contiene 10 ml de el medio semi-sólido y se mantiene a 30° C por 24 horas en una incubadora. Después de este período, se transfiere la levadura del medio semisolido para dos tubos de ensayo que contienen 10 ml de MLB cada uno y se conservan a 30° C en una incubadora por 24 horas más. En la próxima etapa, se transfieren los dos medios semisolidos a 30 ml del Medio líquido contenido en un erlenmeyer de 250 ml y se sitúa en la incubadora a 30° por 24 horas más y con agitación de 150 rpm.

En la Figura 16 se muestra el esquema del procedimiento que se siguió en la preparación del inóculo para los estudios fermentación.



**Figura 16.** Esquema de las etapas de preparación del inóculo para la fermentación.

## **ANEXO D-DETERMINACIÓN DE ETANOL, GLICEROL, GLUCOSA Y XILOSA**

Las concentraciones de etanol, glucosa, xilosa y glicerol fueron determinadas por sistema de cromatografía líquida (HPLC) marca Varian. Las muestras recolectadas en el proceso de fermentación de todos los ensayos, fueron descongeladas y centrifugadas a 3300 rpm en temperatura ambiente por 15 minutos, se separó el sobrenadante para análisis de azúcares, glicerol y etanol y el precipitado para determinación de masa seca, como fue descrito en el ítem 3.6.5.

El sobrenadante resultante de la centrifugación del medio reaccional fue diluido 1:2, filtrado con membrana micro poro de éster de celulosa (diámetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y colocado en “vials” para inyección automática con el fin de analizar azúcares reductores, etanol e glicerol.

El cromatógrafo líquido modelo Varian 9010 (HPLC- “high performance liquid chromatography”), fue operado a través del uso de una fase móvil, siendo ésta una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con pH de 1,4; preparada con agua ultra-pura (Milli-Q). Para estabilización de la fase móvil se esperó aproximadamente 12 horas antes de la inyección de las muestras. La columna para separación de los componentes fue Aminex HPX 87-H (columna de exclusión iónica), mantenida en un horno con circulación de aire a temperatura controlada de 40 °C.

La preparación de la solución patrón fue hecha con una mezcla de glucosa, xilosa, glicerol y etanol, y la curva de calibración utilizada presentaba coeficiente de correlación cercano a 0.99, alcanzado a través del uso de un Diluidor de alta precisión. En la Figura 17 se ve una foto del equipo “HPLC” utilizado para la lectura de Etanol, Glicerol, Glucosa y Xilosa.



**Figura 18.** Foto en detalle del equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia. Varian modelo 9010, utilizado en los análisis.

- 1.Sistema de distribución de solvente.
- 2.Inyector automático de muestras tipo carrusel.
- 3.Columna cromatográfica con horno.
- 4.Sistema de lectura de absorbancia.
- 5.Detector de índice de refracción.
- 6.Computador con software Millenium para cuantificación

## ANEXO E. EQUIPOS

Los equipos utilizados en el presente trabajo fueron:

- Balanza analítica de marca Bel Engineering con precisión de  $\pm 0,001$  g.
- Balanza semianalítica de marca Marte con precisión de  $\pm 0,01$  g.
- Baño termostático modelo MA-184 de marca Marconi.
- Centrífuga microprocesada NT 810 de marca Nova técnica.
- Espectrofotómetro 600S de línea Fento
- Estufa de secado especial modelo MA-035/2 de marca Marconi, con circulación de aire.
- Incubadora refrigerada con agitación, modelo MA-832 de marca Marconi con precisión de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .
- Medidor de pH industrial MPI 2000 de marca MS Tecnopon
- Autoclave marca PHOENIX.
- Cromatógrafo líquido modelo Varian 9010 (HPLC- “high performance liquid chromatography”) con columna de separación HPX 87-H (columna de exclusión iónica).
- Roto-evaporador Fisatom

## ANEXO F- AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo que se desarrollo a partir de una rutina de ajuste desenvuelta en el software COMPAQ VISUAL FORTRAN versión 6.6 por investigadores del Laboratorio de Optimización y Control Avanzado LOPCA/UNICAMP, aplicando el algoritmo Quasi-Newton de optimización. A continuación se presenta una pequeña descripción de las ecuaciones que utiliza el modelo utilizado.

Para la fermentación con *S. cerevisiae*, se recurrió al modelo de **Ghose** (1979) Modificado, que fue utilizado por **Andrieta** y por **Tosetto** (2002), considerando como sustrato únicamente la glucosa, y el cual tiene presente el efecto del sustrato limitante ( $K_s$ ), la inhibición por el sustrato ( $K_i$ )y por el producto lineal ( $P_{max}$ ), y esta dado por la ecuación 9.

$$r_x = \mu_{max} \cdot \frac{G}{K_S + G + \frac{S^2}{K_i}} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \quad (\text{Ec.9})$$

Según **Bailey** (1986), en el caso de fermentación alcohólica en procesos discontinuos, la formación de producto acontece junto con el crecimiento microbiano. La mayor cantidad de producto se forma en la fase exponencial de crecimiento microbiano, ósea, la cinética para el producto está asociada al crecimiento.

La ecuación 10, de **Leudeking-Piret** (1959) presenta buen ajuste para amplios tipos de fermentaciones, ya que tiene en cuenta términos de contribución asociado o no al crecimiento.

$$r_p = Y_{px}r_x + m_p X \quad (\text{Ec.10})$$

La tasa de consumo de sustrato  $r_s$  esta dada por:

$$r_s = \left( \frac{r_x}{Y_x} \right) + m_x X \quad (\text{Ec.11})$$

Esta ecuación describe el consumo de azúcar durante la fermentación, que conduce al incremento de la masa celular y de etanol.  $Y_x$  y  $m_x$ , son el limite de producción celular (Kg./Kg.), y el parámetro de mantenimiento (Kg./[Kg\*h]), respectivamente.

El software Microcal Origin 6.0 fue utilizado para el ajuste de los datos experimentales a una expresión sigmoial (esta función fue escogida para el ajuste de los datos experimentales por ser simple y presentar un buen ajuste de los datos experimentales), de manera que la función obtenida y sus parámetros fueran utilizados en FORTRAN para la representación de los datos experimentales. Así, los valores obtenidos por el modelo cinético fueron comparados con los de la curva y minimizados a través del programa de optimización. Los parámetros cinéticos óptimos fueron los que por medio de la rutina encontraron un valor de la variable  $\theta$  que minimizara la función  $E(\theta)$ , representada por la Ecuación 12.

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[ \frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{\max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{\max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{\max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \varepsilon_n(\theta) \quad (\text{Ec. 12})$$

En la ecuación 12, los valores de  $X_{e_n}$ ,  $S_{e_n}$  y  $P_{e_n}$  son datos experimentales de concentración de biomasa, sustrato e producto.  $X_n$ ,  $S_n$  y  $P_n$ , son los valores de concentración calculados por el modelo. La variable  $np$  representa el número de muestras recolectadas en cada experimento, y los subíndices *max* corresponden a la mayor concentración experimental para cada variable,  $X$ ,  $S$  y  $P$

A partir de las ecuaciones anteriores y por medio de la rutina descrita, se trazaron los perfiles de concentraciones de sustrato, representado por la glucosa, biomasa y producto durante el tiempo de fermentación. Los parámetros optimizados y el modelo fueron aplicados para trazar los perfiles de la fermentación como función del tiempo.

## ANEXO G - DATOS EXPERIMENTALES

### G.1. Hidrolisis Enzimática

**Tabla 10.** Masa de ART liberada por gramo de biomasa pretratada en la Hidrólisis enzimática del Bagazo de caña .

TIEMPO (h)	Masa ART/Biomasa pretratado (g/g)			
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MERCK	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ECIBRA	Ca(OH) <sub>2</sub>	SIN PRETRATAMIENTO
0	0	0.000	0.000	0.000
1	0.036	0.029	0.145	0.033
3	0.294	0.175	0.245	0.041
6	0.391	0.367	0.314	0.051
12	0.631	0.598	0.364	0.080
24	0.811	0.771	0.426	0.105
36	0.825	0.798	0.526	0.107
48	0.828	0.801	0.555	0.106
60	-	-	0.612	0.102
72	-	-	0.623	0.109

**Tabla 11.** Masa de Glucosa liberada por gramo de biomasa pretratada en la Hidrólisis enzimática del Bagazo de caña .

TIEMPO (h)	Masa GLUCOSA / Biomasa pretratado (g/g)			
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MERCK	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ECIBRA	Ca(OH) <sub>2</sub>	SIN PRETRATAMIENTO
0	0.000	0,000	0,000	0,000
1	0.025	0,033	0,004	0,000
3	0.126	0,093	0,013	0,000
6	0.256	0,173	0,052	0,002
12	0.363	0,428	0,096	0,002
24	0.496	0,597	0,193	0,000
36	0.642	0,640	0,211	0,004
48	<b>0.668</b>	<b>0,659</b>	0,285	0,004
60	-	-	0,305	0,008
72	-	-	<b>0,346</b>	0,000

## G.2 .Fermentación con Hidrolizado pretratado con Peróxido de Hidrógeno.

**Tabla. 12.** Concentración en g/l de azúcares Reductores totales (ART), glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con **Peróxido de Hidrógeno- Test.**

<b>TIEMPO (h)</b>	<b>ART (g/l)</b>	<b>GLUCOSA (g/l)</b>	<b>XILOSA (g/l)</b>	<b>ETANOL (g/l)</b>	<b>GLICEROL (g/l)</b>	<b>BIOMASA (g/l)</b>
Sin Inóculo	29,642	18,668	1,632	0,000	0,000	0
0	25,726	14,076	1,596	0,000	0,032	0,57
1	23,930	13,344	1,504	1,420	0,140	0,75
2	18,526	8,284	1,048	2,136	0,188	1
3	14,650	5,712	1,316	4,084	0,416	1,75
4	12,640	2,952	1,040	4,152	0,588	1,75
6	8,460	0,642	0,952	5,052	0,784	2,25
8	5,920	0,000	0,644	4,820	0,776	2
10	5,940	0,000	0,948	4,712	0,788	1,75
13	5,592	0,000	0,896	4,802	0,752	2,25
16	5,360	0,000	0,652	4,588	0,728	2,25
18	5,440	0,000	1,308	4,768	0,624	2,25

**Tabla. 13.** Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno- ENSAYO 1.

<b>TIEMPO (h)</b>	<b>BIOMASA (g/l)</b>	<b>GLUCOSA (g/l)</b>	<b>ETANOL (g/l)</b>	<b>XILOSA (g/l)</b>	<b>GLICEROL (g/l)</b>
Sin inóculo	0.000	20.704	0.000	0,952	0
0	1,000	17,260	0,000	0,960	0
1	1,250	14,440	0,872	1,132	0,528
2	1,500	11,504	1,940	1,728	0,635
4	2,250	5,700	3,804	1,728	0,688
5	2,150	2,812	4,700	1,772	0,86
6	2,315	1,520	4,956	1,804	0,856
8	2,650	0,000	6.386	1,500	0,836
10	2,943	0,000	6,380	1,684	0,78
13	2,865	0,000	6.376	1,696	0,836
18	2,853	0,000	6,385	1,644	0,78

**Tabla. 14.** Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno- **ENSAYO 2.**

<b>TEMPO (h)</b>	<b>BIOMASA (g/l)</b>	<b>GLUCOSA (g/l)</b>	<b>ETANOL (g/l)</b>	<b>XILOSA (g/l)</b>	<b>GLICEROL (g/l)</b>
<b>0</b>	<b>0,000</b>	<b>14,596</b>	0,000	0,240	0
0	1,000	12,568	0,000	0,204	0
1	1,250	11,944	0,452	0,504	0,208
2	1,475	8,720	1,692	0,348	0,284
4	2,000	2,880	3,692	0,348	0,408
6	2,250	0,000	3,940	0,392	0,576
8	2,250	0,000	4,652	0,368	0,628
13	2,450	0,000	4,590	0,312	0,624
18	2,450	0,000	4,640	0,352	0,64

**Tabla. 15.** Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Peróxido de Hidrógeno. **ENSAYO 3**

<b>TIEMPO (h)</b>	<b>GLUCOSA (g/l)</b>	<b>XILOSA (g/l)</b>	<b>ETANOL (g/l)</b>	<b>GLICEROL (g/l)</b>	<b>BIOMASA (g/L)</b>
Sin Inóculo	17.204	0,952	0	0	0
0	15.868	0,941	0	0	0
18	0	0,932	5.653	0.724	2.230

### G.3.Fermentacion con Hidrolizado pretratado con Hidróxido de Calcio..

**Tabla. 16.** Concentración en g/l de azúcares Reductores totales (ART), glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Hidróxido de Calcio. **Ensayo 1.**

<b>TIEMPO (h)</b>	<b>ART (g/l)</b>	<b>GLUCOSA (g/l)</b>	<b>XILOSA (g/l)</b>	<b>ETANOL (g/l)</b>	<b>GLICEROL (g/l)</b>	<b>BIOMASA (g/l)</b>
Sin Inóculo	30,316	14,476	4,392	0,000	0,000	0,000
0	27,796	12,736	4,276	0,000	0,000	1,150
0.5	22,777	11,446	4,352	0,552	0,012	1,750
1	21,926	10,656	4,276	0,728	0,040	1,750
1.5	21,574	9,376	4,212	0,972	0,228	1,750
2	13,954	7,364	4,236	1,596	0,620	2,500
4	12,831	1,956	3,936	3,432	0,824	2,630
6	5,711	1,292	3,988	3,524	0,836	2,750
8	5,672	0,000	4,062	4,720	0,856	2,750
10	5,425	0,000	4,206	4,924	0,824	2,750
13	4,256	0,000	3,972	4,656	0,844	3,000
18	4,506	0,000	4,062	4,840	0,846	2,850

**Tabla. 17.** Concentración en g/l de azúcares Reductores totales (ART), glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña pretratado con Hidróxido de Calcio. **Ensayo 2.**

<b>TIEMPO (h)</b>	<b>GLUCOSA (g/l)</b>	<b>XILOSA (g/l)</b>	<b>ETANOL (g/l)</b>	<b>GLICEROL (g/l)</b>	<b>BIOMASA (g/l)</b>
Sin Inóculo	17.672	5,520			
0	15,932	5,317	0,000	0,000	1,250
0.5	14,042	5,470	0,694	0,019	1,870
1	12,652	5,374	0,915	0,062	1,890
1.5	10,772	5,294	1,222	0,356	1,910
2	8,160	5,324	2,006	0,967	2,680
4	2,152	4,947	4,314	1,285	2,830
6	0,888	5,012	4,429	1,304	2,970
8	0,000	5,105	5,932	1,335	2,990
10	0,000	5,286	6,189	1,285	3,010
13	0,000	4,992	6,186	1,317	3,280
18	0,000	5,105	6,171	1,285	3,150

## G.2. Fermentación de Referencia con Glucosa pura.

**Tabla. 18.** Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación de Referencia hecha con **Glucosa pura- ENSAYO 1**

<b>TIEMPO</b>	<b>BIOMASA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>ETANOL</b>	<b>GLICEROL</b>
<b>(h)</b>	<b>(g/l)</b>	<b>(g/l)</b>	<b>(g/l)</b>	<b>(g/l)</b>
Sin inóculo	0,000	16,996	0,000	0,000
0	0,820	15,512	0,000	0,000
1	0,875	14,816	0,512	0,000
2	1,150	11,284	1,488	0,224
4	1,250	3,996	2,016	0,344
5	1,500	2,868	2,696	0,512
6	1,500	1,904	3,952	0,740
8	2,250	0,000	4,832	0,836
10	2,000	0,000	5,828	0,680
13	2,250	0,000	6,728	0,780
18	2,200	0,000	6,624	0,725

**Tabla. 19.** Concentración en g/l de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y biomasa, en muestras de la fermentación de Referencia hecha con **Glucosa pura. ENSAYO 2**

<b>TIEMPO</b>	<b>BIOMASA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>ETANOL</b>	<b>GLICEROL</b>
<b>(h)</b>	<b>(g/l)</b>	<b>(g/l)</b>	<b>(g/l)</b>	<b>(g/l)</b>
Sin inóculo	0,000	15,418	0,000	0,000
0	0,830	12,870	0,000	0,000
1	0,934	12,174	0,420	0,000
2	0,976	8,642	1,220	0,206
4	1,076	2,472	1,930	0,316
5	1,326	1,974	2,712	0,471
6	1,326	1,316	3,241	0,681
8	1,972	0,000	3,962	0,769
10	1,996	0,000	4,779	0,626
13	2,000	0,000	5,464	0,718
18	2,000	0,000	5,432	0,482