

**DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR DE LOS RESIDUOS DE
COSECHA DE LA CAÑA DE AZÚCAR PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL**

**CLAUDIA PATRICIA CHÁVEZ ÁLVAREZ
NATHALIE VELASCO GIRALDO**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI**

2013

**DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR DE LOS RESIDUOS DE
COSECHA DE LA CAÑA DE AZÚCAR PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL**

**CLAUDIA PATRICIA CHÁVEZ ÁLVAREZ
NATHALIE VELASCO GIRALDO**

**Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero
Químico**

**Director: Ing. Jorge Enrique López, M.Sc., Ph. D
Codirector: Ing. Yesid Fabian Zambrano, M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI**

2013

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 ANTECEDENTES	4
2.1.1 Métodos físicos	4
2.1.2 Métodos físico-químicos	4
2.1.3 Métodos químicos	5
2.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.....	7
2.2.1 Celulosa ($C_6H_{10}O_5$) _n	8
2.2.2 Hemicelulosa ($C_5H_8O_4$) _m	8
2.2.3 Lignina [$C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}$] _n	8
2.3 DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR.....	9
2.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	10
2.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
3.2 ADECUACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	12
3.3 PRUEBAS PRELIMINARES	13
3.3.1 Determinación del tamaño de partícula.....	13
3.3.2 Determinación del tiempo de deslignificación.....	14
3.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR.....	15
3.5 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR.....	17
3.6 HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DEL MATERIAL DESLIGNIFICADO	19
3.7 ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES Y ETANOL OBTENIDO.....	21
3.8 ANÁLISIS ECONÓMICO PRELIMINAR DEL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR.....	22

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1	PRUEBAS PRELIMINARES	23
4.1.1	Determinación del tamaño de partícula del material.....	23
4.1.2	Determinación del tiempo de deslignificación.....	25
4.2	DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR	26
4.3	SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR.....	27
4.3.1	VERIFICACIÓN DEL TIEMPO DE DESLIGNIFICACIÓN.....	33
4.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN DEL MATERIAL DESLIGNIFICADO	33
4.5	ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES Y ETANOL OBTENIDO.....	34
4.6	ANÁLISIS ECONÓMICO PRELIMINAR DEL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR.....	39
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
	APÉNDICES	49
	APÉNDICE A. RELACION ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE H_2SO_4 Y EL pH UTILIZADO EN LA SOLUCIÓN DE CATALIZADOR.....	49
	APÉNDICE B. CRECIMIENTO DE LA LEVADURA USADA EN LA FERMENTACIÓN DEL MATERIAL	50
	APÉNDICE D. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DESLIGNIFICACIÓN	55
	APÉNDICE E. DETERMINACIÓN DE LA SIGNIFICANCIA DE LAS VARIABLES EN EL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN	57
	APÉNDICE F. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA EL PROCESO.....	60
	APÉNDICE H. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE COMPONENTES	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de experimentos para la determinación de la significancia de las variables..	15
Tabla 2. Composición del material en cada etapa del proceso.....	35
Tabla 3. Balance de materiales del proceso de obtención de etanol a partir de hojas y cogollos de caña de azúcar	36
Tabla 4 Análisis de los azúcares fermentables y el etanol obtenido en el proceso	38
Tabla 5 Rendimientos de etanol obtenidos del pretratamiento de diferentes sustratos.....	39
Tabla 6. Cantidades de materias primas, insumos y servicios para pretratar 1 Ton de residuos	40
Tabla 7. Costos de materias primas, insumos y servicios para pretratar 1 Ton de residuos	40
Tabla 8. Relación entre pH y concentración de ácido sulfúrico	49
Tabla 9. Curva de calibración para la levadura.....	51
Tabla 10. Resultados Número Kappa para el análisis granulométrico de fibra sin tratamiento	52
Tabla 11. Resultados Número Kappa para el análisis granulométrico de la fibra deslignificada	52
Tabla 12. Resultados análisis Van Soest para la fibra sin tratamiento	53
Tabla 13. Resultados análisis Van Soest para la fibra deslignificada.....	53
Tabla 14. Coeficientes de distribución para el análisis del tamaño de partícula.....	54
Tabla 15. Análisis de la selectividad para el tamaño de partícula.....	54
Tabla 16. Resultados análisis Número Kappa para la determinación del tiempo de deslignificación.	55
Tabla 17. Prueba Van Soest para la fibra deslignificada a diferentes tiempos.....	55
Tabla 18. Coeficientes de distribución para el análisis del tiempo	56
Tabla 19. Análisis de la selectividad para la determinación del tiempo	56
Tabla 20. Resultados hidrólisis enzimática del material deslignificado para 100g de muestra con 11,8% de humedad inicial	57
Tabla 21 Análisis de Varianza para la Concentración de Azúcares.....	58
Tabla 22. Análisis de varianza para la ecuación del modelo.....	60
Tabla 23. Resultados hidrólisis enzimática con el nuevo intervalo de valores para el tratamiento de 100 g de muestra con 11,8% de humedad.....	62
Tabla 24. Análisis de Varianza para la Ecuación 3	62
Tabla 25. Análisis de Varianza para la concentración de azúcares	63
Tabla 26 Análisis de Varianza para la variable concentración de azucares	64
Tabla 27. Hidrólisis enzimática de la deslignificación a diferentes tiempos de deslignificación	66

Tabla 28 Hidrólisis enzimática del material deslignificado a las condiciones adecuadas.	67
Tabla 29. Concentración de azúcares al final de la fermentación.....	67
Tabla 30. Análisis de la lignina presente en el material en cada etapa del proceso	68
Tabla 31. Concentración de azúcares medidos por HPLC.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los objetivos del pretratamiento de materiales lignocelulósicos. Tomado de (Balat, 2010).....	9
Figura 2. Análisis del tamaño de partícula.....	24
Figura 3 Análisis del tiempo de proceso	25
Figura 4. Concentración de azúcares reductores en la fibra deslignificada	26
Figura 5. Porcentaje de sacarificación de la hidrólisis enzimática	27
Figura 6. Efectos de las variables sobre la concentración de azúcares reductores para el intervalo de temperatura de 159 a 201°C.....	28
Figura 7. Superficie de contorno de la concentración de azúcares obtenida para el intervalo de temperaturas de 159 a 201°C	29
Figura 8. Efectos principales para la evaluación del nuevo intervalo de condiciones. Temperatura de 198 a 212°C.....	30
Figura 9 Efectos Principales para la concentración de azúcares reductores en el intervalo de temperatura de 159 a 212°C.....	31
Figura 10. Superficie de contorno para la concentración de azúcares reductores en el intervalo de temperatura de 159 a 212°C	32
Figura 11. Diagrama del proceso de obtención de etanol a partir de hojas y cogollos de caña de azúcar	36
Figura 12 Curva de calibración de la levadura	51
Figura 13. Diagrama de Pareto estandarizado de la concentración de azúcares reductores	58
Figura 14 Superficie de respuesta correspondiente a la Ecuación 2. Intervalo de temperatura de 159 a 201°C.....	61
Figura 15. Diagrama de Pareto para la concentración de azúcares. Intervalo de temperatura de 198 a 212°C	63
Figura 16. Diagrama de Pareto para la concentración de los azúcares reductores	64
Figura 17. Superficie de respuesta de la concentración de azúcares reductores en todo el intervalo de temperatura.	65

RESUMEN

Con el presente trabajo de investigación se buscó pretratar los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de la caña de azúcar, utilizando el proceso de explosión con vapor, pensando en tener una materia prima adecuada para la producción de etanol. Con este fin se utilizó un reactor de alta presión para encontrar las variables influyentes en este proceso y definir las condiciones más adecuadas. Las variables que se analizaron fueron: Tiempo, tamaño de partícula, temperatura, relación sólido- líquido y concentración de ácido sulfúrico, expresada como pH. Debido a que el pretratamiento del material se hace para facilitar la hidrólisis de los azúcares presentes, se consideró como variables de respuesta la pérdida en peso del material, la remoción de lignina y la concentración de azúcares reductores.

El tiempo y el tamaño de partícula se definieron al principio del estudio utilizando condiciones medias encontradas en la literatura. El tamaño de partícula encontrado fue pasante malla 9, que corresponde a un tamaño de partícula promedio de 1,82 mm y el tiempo de deslignificación encontrado para las primeras pruebas fue de 6 min. Los intervalos de trabajo para las demás variables fueron: Temperatura 165 a 195 °C, relación sólido -líquido 40 a 67 g fibra/ L de agua y pH de solución catalizadora 1,5 a 2,5.

Por medio de un análisis estadístico factorial 2^3 se encontró que todas las variables analizadas son influyentes en el proceso de deslignificación por explosión con vapor. Una vez se tuvieron las variables influyentes y los intervalos que favorecieron la concentración de azúcares reductores, la remoción de lignina y la pérdida de peso, se realizaron nuevas pruebas en estos intervalos para afinar las condiciones de proceso.

Finalmente, para obtener el material adecuado para la obtención de etanol, se debe realizar la deslignificación por explosión con vapor de las hojas y cogollos de la caña de azúcar a las siguientes condiciones: Temperatura 193 °C, pH 1,3 (0,17 % p/p de H₂SO₄) y relación sólido-líquido 40 g/L.

Adicionalmente, se hidrolizó y fermentó la fibra pretratada bajo las condiciones halladas como adecuadas para evaluar la cantidad de etanol obtenida. Las condiciones de hidrólisis y fermentación fueron las sugeridas en el protocolo experimental para Sacarificación enzimática NREL/TP-510-42629 y en el protocolo experimental para Hidrólisis y fermentación de biomasa lignocelulósica NREL/TP-510-42630, respectivamente. La cantidad de etanol obtenida con 100 g de fibra fue de 12 g.

Por lo tanto, se concluye que es viable deslignificar hojas y cogollos de caña de azúcar por medio de explosión con vapor, pues después de realizar este pretratamiento se obtiene un rendimiento de sacarificación del 43,36%, la fibra se relaja y facilita la obtención de etanol alcanzando un rendimiento del 78,57%.

1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación formó parte de un macro proyecto para obtener etanol a partir de los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de caña de azúcar, impulsado por el Grupo de Investigación en Biocombustibles y Biorefinerías, GRUBIOC, de la Universidad del Valle y la Universidad Autónoma de Occidente. También contó con la participación de CENICAÑA, ASOCAÑA y el apoyo económico del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR).

En el Valle del Cauca se sembraron 223 mil hectáreas de caña y se cosecharon 22 millones de toneladas en el año 2011 (CENICAÑA, 2012). Esta producción genera abundantes desechos lignocelulósicos, alrededor de 7 millones de toneladas por año, constituidos principalmente por las hojas y cogollos (Gómez, 2010). Actualmente una de las formas de cosecha de la caña de azúcar es realizarla manualmente precedida de la quema, porque aumenta los rendimientos de los corteros y elimina entre (15-20) ton/ha de los residuos totales, pero trae como consecuencia una serie de impactos ambientales negativos sobre la atmósfera (emisiones de CO₂ y otros gases), el suelo y las poblaciones cercanas a los cultivos (Serna y Rodríguez de Stouvenel, 2007).

En Colombia las leyes ambientales de 1997 prohíben incluso la quema controlada, por lo que se busca implementar una cosecha en verde que tiene como objetivo eliminar las quemadas, y así reducir los efectos negativos producidos por éstas. El mayor obstáculo para la implementación de la cosecha en verde, es el manejo de los residuos de cosecha (Serna y Rodríguez de Stouvenel, 2007). Usualmente las hojas y los cogollos de la caña de azúcar quedan sobre el área de cultivo, lo que puede ocasionar problemas como: (1) facilitar la proliferación de insectos y malos olores a causa de su descomposición, (2) afectar el rebrote de la caña, (3) impedir propias del cultivo como abono y riego. Por esto se considera importante realizar una recolección de los residuos de cosecha, teniendo en cuenta que se le puede dar un valor agregado.

De esta forma surge la idea de producir etanol a partir de estos residuos, puesto que tienen una composición aproximada de 42%p de celulosa, 26%p de hemicelulosa y 22%p de lignina en base seca (Gómez, 2010), lo que evidencia que las hojas y cogollos de la caña de azúcar son aptos para obtener azúcares fermentables. Así, con el alcohol carburante se puede ayudar a disminuir el consumo de combustibles fósiles y los impactos ambientales.

La producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos se realiza mediante la obtención de los azúcares contenidos en esta materia prima, siendo posteriormente transformados a etanol por la acción de diversos microorganismos en un proceso de fermentación. Los azúcares se obtienen mediante el rompimiento de las cadenas de celulosa y hemicelulosa (hidrólisis), con el fin de reducirlas a sus monómeros. El proceso más conveniente para realizar esta hidrólisis utiliza enzimas; sin embargo, los tejidos lignificados resisten la acción de las enzimas sobre la fibra, por lo que es necesario realizar un pretratamiento que permita remover la lignina e incrementar la accesibilidad de las enzimas durante la hidrólisis.

El pretratamiento propuesto en la presente investigación es la explosión con vapor en presencia de un catalizador ácido (H_2SO_4), técnica que según investigaciones anteriores (Segey, Rodger, 1999), ha demostrado ser un método eficiente, teniendo como ventaja que no necesita equipos adicionales para realizar la recuperación de los productos químicos utilizados, puesto que solo requiere de agua y H_2SO_4 en pequeñas cantidades.

Puesto que no se conocen las condiciones apropiadas de la deslignificación por explosión con vapor que permitan una buena remoción de lignina para este material e incrementen la obtención de azúcares reductores, se propone analizar experimentalmente esta operación variando los parámetros relevantes del proceso, como son la temperatura, la concentración de catalizador, el tamaño de partícula, la relación sólido-líquido y el tiempo, de manera que se determinen las condiciones óptimas del proceso.

De esta manera, con el fin de definir la viabilidad de deslignificar los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de la caña de azúcar cultivada en el Valle del Cauca, utilizando el proceso de explosión con vapor para obtener materia prima adecuada para la producción de etanol se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de variables como la temperatura, la concentración de catalizador, la relación sólido-líquido, el tamaño de partícula y el tiempo, sobre el proceso de deslignificación por explosión con vapor de las hojas y cogollos de la caña de azúcar.
- Seleccionar las condiciones de operación que permitan realizar una deslignificación adecuada por explosión con vapor de las hojas y cogollos de la caña de azúcar, y determinar la cantidad de etanol producida con estas condiciones.
- Estimar los costos preliminares del proceso de deslignificación por explosión con vapor a escala piloto con las condiciones elegidas como las adecuadas para este proceso.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

La finalidad del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de azúcares y evitando la degradación o pérdida de carbohidratos así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación. Existen diversos procesos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos (Sun & Cheng, 2002), los métodos físicos, fisicoquímicos y químicos más comunes son:

2.1.1 Métodos físicos

Fragmentación mecánica y pirólisis

El material lignocelulósico se fragmenta, tritura y muele (hasta 0.2–2mm) para aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión. En la pirólisis la lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando se trata a temperaturas altas de hasta 300°C (Millet et al., 1976). Aunque es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico tiene un costo elevado en comparación con otros métodos.

2.1.2 Métodos físico-químicos

Explosión con vapor

Es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves. La biomasa se trata con vapor saturado a una temperatura de 160–260°C (0.69–4.83 MPa) durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina se convierten en oligómeros solubles. La adición de ácido sulfúrico mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. Los factores que afectan el proceso son el tiempo del tratamiento,

la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad (Duff & Murray, 1996). Las ventajas de este método son un requerimiento bajo de energía comparado con los métodos físicos convencionales que requieren 70% más energía para alcanzar el mismo tamaño de reducción de las partículas. Las limitantes del proceso son la destrucción parcial del xilano y la separación incompleta de la lignina y los carbohidratos, así como la generación de compuestos inhibitorios para los microorganismos utilizados en procesos de fermentación (Holtzapfel et al., 1989).

Explosión de fibra de amoníaco (AFEX)

Este pretratamiento mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos, los cuales se tratan con amoníaco a alta temperatura y presión. Es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90% de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa y no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulósico sea triturado. Para reducir los costos y proteger el ambiente, el amoníaco se recicla después del pretratamiento (Dale et al., 1984).

2.1.3 Métodos químicos

Ozonólisis

El ozono degrada la lignina y la hemicelulosa de sustratos como la paja de trigo y de algodón, el bagazo de caña y el aserrín de pino y álamo. Las reacciones ocurren a presión y temperatura ambiente, se remueve la lignina hasta en un 8% y el rendimiento aumenta en un 57%, no produce residuos tóxicos pero se requiere una gran cantidad de ozono lo que eleva los costos (Vidal & Molinier, 1988).

Hidrólisis ácida

Los ácidos como el ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión. Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos que hidrolizan la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, en los residuos queda la celulosa y la

lignina, esta última se extrae con solventes orgánicos. El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa, pero su costo es alto en comparación con otros pretratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación (Eggeman & Elander, 2005).

Hidrólisis alcalina

Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Fan et al., 1987). En las maderas duras hay un incremento en la digestibilidad y un descenso del contenido de lignina, en maderas suaves con lignina hasta en un 26% no se han obtenidos resultados eficientes; en general la utilización de bases permite la disolución de la lignina, pero sus costos son altos, haciendo estos métodos no competitivos a gran escala (Sun & Cheng, 2002).

Proceso organosolvente

Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona, así como también ácidos inorgánicos como catalizadores (H_2SO_4 o HCl) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación (Zhao, 2009).

En el Grupo de Investigación en Biocombustibles (GRUBIOC) se realizó una investigación para encontrar el método más adecuado, Ultrasonido o Microondas, para mejorar la acción enzimática sobre la lignina contenida en los residuos de cosecha de la caña de azúcar (Figuerola y Parra, 2010). De esta investigación se obtuvo que el tratamiento más eficiente es el Ultrasonido, usando vainillina como mediador, el cual aumenta en 53% la remoción de lignina. Debido a que el rendimiento máximo que se obtuvo no es muy alto, los autores recomiendan usar la explosión con vapor de estos residuos como método de deslignificación.

Aunque no se conocen estudios de la deslignificación por explosión con vapor de las hojas y cogollos de la caña de azúcar, se dispone de información del proceso implementado en otros materiales. Es el caso de la deslignificación por explosión con vapor del bagazo de la caña de azúcar (Martín, Marcet, et. al, 2008), la deslignificación por explosión con vapor de hojas y tallos de maíz (Varga, Réczey, et. al, 2004) y la deslignificación por explosión con vapor de trozos de madera (Boussaid, Esteghlalian, et. al, 2000). Estos estudios demostraron que se produce una mayor remoción de lignina con las siguientes condiciones: temperatura de 210 a 230 °C, tiempo de 5 a 10 min y tamaño de partícula pasante malla 10.

Según investigaciones realizadas (Kaar, Gutierrez, et. al 1998), la deslignificación por explosión con vapor del bagazo de la caña de azúcar, es un pretratamiento eficiente para aumentar la conversión de los polisacáridos a monosacáridos durante la hidrólisis enzimática. Esta investigación también concluye que los resultados de la explosión con vapor dependen de la materia prima utilizada; materias primas con alto contenido en xilosa requieren condiciones más suaves que las materias primas con bajo contenido de xilosa.

En algunos estudios realizados sobre la explosión con vapor (Ballesteros, Negro, et. al, 2006), se demostró que la adición de un agente de impregnación antes del pretratamiento, es un método eficiente para incrementar la digestibilidad de la celulosa de los sustratos pretratados y solubilizar una porción significativa de los componentes de la hemicelulosa. La impregnación de la biomasa con catalizadores ácidos como H_2SO_4 , disminuyen la temperatura y el tiempo necesarios para realizar una buena deslignificación.

2.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

La composición química y estructural de los materiales lignocelulósicos, como las hojas y los cogollos de la caña de azúcar, varía considerablemente con la genética y con la influencia del medio ambiente. Una composición química típica de estos materiales, es aproximadamente:

50% p celulosa, 15%p hemicelulosa y 20%p lignina. El resto consiste en una serie de compuestos de bajo peso molecular solubles en agua (fracción hidrosoluble) o solventes orgánicos (extraíbles) y cenizas (Gómez, 2010). La celulosa y la hemicelulosa, que normalmente constituyen dos terceras partes de la materia seca de la pared celular, son polisacáridos que se pueden hidrolizar a azúcares y posteriormente fermentarlos para producir etanol. La lignina no se puede usar para la producción de etanol y obstaculiza la acción de las enzimas usadas para la hidrólisis de la celulosa, por lo que se debe remover (Balat, 2010).

2.2.1 Celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n.

Es el principal componente de la biomasa vegetal (30-60% del total de la materia prima seca), es un polímero lineal de glucosa, la orientación de los vínculos y de los puentes de hidrógeno hacen que el polímero sea rígido y difícil de romper. El proceso de hidrólisis del polisacárido se conoce también como sacarificación, en el cual generalmente el producto es glucosa (Balat, 2010).

2.2.2 Hemicelulosa ($C_5H_8O_4$)_m.

Es un polímero corto, muy ramificado de cinco carbonos (pentosa) y de seis carbonos (hexosas). Específicamente la hemicelulosa contiene xilosa y arabinosa (azúcares de cinco carbonos) y galactosa, glucosa y manosa (azúcares de seis carbonos). La hemicelulosa se hidroliza más rápido que la celulosa debido a sus ramificaciones y a su naturaleza amorfa (Balat, 2010).

2.2.3 Lignina [$C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}$]_n.

Es un polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides. Las unidades químicas básicas del fenil propano de la lignina (principalmente siringil, guayacil y p-hidroxi fenol), están unidas entre sí por un conjunto de vínculos que forman una matriz muy compleja. Esta matriz comprende una variedad de grupos funcionales, tales como hidroxilo, metoxilo y carbonilo, que imparten una alta polaridad a la macromolécula de lignina (Balat, 2010).

Las fibras de celulosa y hemicelulosa están unidas entre sí por la lignina, ésta es el constituyente intercelular incrustante o cementante de las células fibrosas de los vegetales y funciona como relleno para darle rigidez a las plantas mediante la formación de una capa externa por medio de enlaces covalentes y de puentes de hidrógeno.

El proceso de obtención de etanol requiere la hidrólisis enzimática y fermentación de los monómeros de la celulosa y la hemicelulosa. La lignina disminuye la accesibilidad de las enzimas a la fibra y por ende la conversión en azúcares fermentables (Pernalet, Piña, 2008), por lo que es necesario romper los enlaces de la lignina y liberar las estructuras fibrosas, para facilitar la accesibilidad de las enzimas durante los bioprocesos.

2.3 DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Los pretratamientos de la materia prima para la obtención de etanol deben ser capaces de relajar la fibra y facilitar la remoción de lignina (eliminar las barreras), para así aumentar la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas y la superficie de contacto entre éstas. La relajación de la fibra consiste en el rompimiento y cambio de la estructura física de ésta, como se muestra en la **Figura 1**.

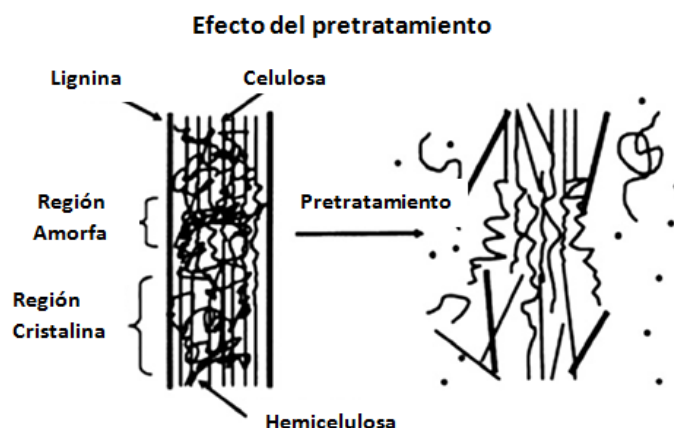


Figura 1. Esquema de los objetivos del pretratamiento de materiales lignocelulósicos. Tomado de (Balat, 2010)

Un buen pretratamiento debe cumplir los siguientes requerimientos: (1) producción de fibra celulósica reactiva para el ataque enzimático, (2) evitar la destrucción de la celulosa y la hemicelulosa, (3) evitar la formación de posibles inhibidores para las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentadores, (4) minimizar la demanda de energía, (5) producir pocos residuos, y (6) tener bajo costo y consumo de reactivos químicos (Balat, 2010).

La explosión con vapor es uno de los procesos más usados para el pretratamiento de residuos agrícolas, debido a los bajos requerimientos de energía y de insumos químicos, baja inversión de capital y efectos mínimos sobre el medio ambiente (Ruiz, Cara, et. al, 2007). Éste proceso consiste en el tratamiento de la biomasa con vapor saturado a alta presión. La deslignificación y la relajación de la fibra se dan por la disminución súbita de la presión, lo que ocasiona el rompimiento de las fibras y favorece la remoción de la lignina.

2.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se emplea principalmente para aumentar el área superficial accesible de la celulosa para mejorar la conversión de ésta en glucosa. Los métodos comunes para la degradación de celulosa en glucosa son: la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática (Zhong, Qunhui, et. al, 2007).

La hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos naturales es un proceso muy lento porque la hidrólisis de la celulosa se ve obstaculizada por parámetros estructurales del sustrato, tales como la cristalinidad de la celulosa, el contenido de lignina y hemicelulosa. Sin embargo, la hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química, entre las cuales pueden mencionarse que no genera gran corrosión, consume poca enzima y produce baja toxicidad en los hidrolizados. También son menores los costos de equipos, debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental, los rendimientos son mayores, no necesita utilizar agentes químicos, no produce compuestos inhibidores de la fermentación y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100% (Balat, 2010).

2.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en ausencia de aire (oxígeno), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono como la glucosa, la fructosa, la sacarosa y el almidón, para obtener como producto final alcohol en forma de etanol.

El sobrenadante de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos puede contener azúcares de seis carbonos (hexosas) y de cinco átomos de carbono (pentosas); si se han hidrolizado la celulosa y la hemicelulosa. Dependiendo de la fuente de lignocelulosa, el hidrolizado típicamente está formado por glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fucosa, y ramnosa. Los microorganismos relacionados con la fermentación de los azúcares para la conversión a bioetanol se pueden describir mejor en términos de sus parámetros de funcionamiento y otros requisitos tales como, la compatibilidad con los productos, procesos y equipos. Los parámetros de rendimiento de la fermentación son: intervalo de temperatura, intervalo de pH, tolerancia al alcohol, tasa de crecimiento, productividad, tolerancia osmótica, rendimiento, estabilidad genética y tolerancia a los inhibidores generados (Balat, 2010).

Los mejores microorganismos conocidos para la producción de etanol a partir de hexosas y pentosas son la levadura *Saccharomyces* *Sacchamycus* y la bacteria *Zymomonas mobilis*, ofreciendo altos rendimientos de etanol (90-97% teórico) y alta tolerancia al etanol, hasta aproximadamente 10% (p/v) en medio de fermentación (Farid, Dimitar, et. al, 2009).

3. METODOLOGÍA

3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Basados en la revisión bibliográfica sobre los temas relacionados con la deslignificación por explosión con vapor en el proceso de obtención de etanol se apoyó el análisis de los procesos experimentales y sus resultados, definiendo las condiciones de los procesos de hidrólisis y fermentación, los cuales se realizaron con la materia prima deslignificada a las condiciones elegidas como adecuadas. La revisión incluyó bases de datos disponibles en la Universidad del Valle tales como Science Direct, EBSCO y Web of science (Isi Products), también se consultaron proyectos de grado relacionados con la deslignificación por explosión con vapor y artículos disponibles en internet.

3.2 ADECUACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Con este proceso se logró la homogeneidad en el material que se utilizó en las pruebas experimentales. La materia prima (hojas y cogollos de la caña de azúcar), fue suministrada por un muestreo hecho por CENICAÑA. El tratamiento que se realizó incluyó:

- **Molienda gruesa:** Se utilizó un molino de cuchillas para molienda gruesa, puesto que éste es apropiado para la reducción de tamaño de materiales fibrosos.
- **Secado:** Permitió la preservación de la materia prima, evitando el crecimiento de hongos u otros microorganismos durante su almacenamiento. El material se secó al sol.
- **Molienda fina y tamizado:** Se realizó la reducción de tamaño de las hojas y cogollos hasta que al menos el 80% de las partículas pasaron por una malla 8 (Diámetro promedio de partícula 2,17mm). Se empleó un molino de cuchillas y tamices normalizados serie

Tyler, ya que estos permitieron relacionar la apertura de la malla con el tamaño de partícula del material.

3.3 PRUEBAS PRELIMINARES

Se seleccionó el tamaño de partícula y el tiempo con el que se realizaron las pruebas de deslignificación y se hicieron las mediciones preliminares de las variables de respuesta (lignina y pérdida de peso). Las pruebas incluyeron:

3.3.1 Determinación del tamaño de partícula

Deslignificación:

Se realizó la deslignificación de los residuos de cosecha de la caña de azúcar en un reactor de alta presión con capacidad de 10 litros, a condiciones medias encontradas en la literatura: Temperatura 190°C, tiempo 6 minutos, solución de H₂SO₄ con pH 3 (concentración de H₂SO₄ de 0,2 %p/p) y relación sólido-líquido 100 g/l (100 gramos de material seco/1 litro de agua) (Laser, Schulman, et. al, 2001) (Cara, Ruiz, et. al, 2007) (Ballesteros, Olivia, et. al, 2000) (De Bari, Viola, et. al, 2002) (Ballesteros, Negro, et. al, 2006) (Ruiz, Cara, et. al, 2007) (Söderström, Pilcher, et. al, 2002) (Sassner, Gustav Martensson, et.al, 2008). Posteriormente se realizó el lavado y secado del material sólido resultante y su tamizado para separar las fracciones correspondientes a las mallas disponibles para este estudio (malla 9, 10, 20, 30, 40, 60 y fondos).

Análisis granulométrico:

Se realizó el análisis granulométrico de la fibra antes y después de la deslignificación. Para cada fracción se midió la cantidad de lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas por el método de Van Soest (Van Soest, 1983) y el Número Kappa (Tappi T236 om-99, 1999). El método de Van Soest consiste básicamente en la disolución selectiva de los compuestos que se

encuentran en los tejidos vegetales, utilizando secuencialmente diferentes solventes. El número Kappa se basa en la oxidación de la lignina por la acción de permanganato de potasio.

Teniendo en cuenta que el objetivo de esta investigación es la evaluación de la viabilidad del pretratamiento de deslignificación para la obtención de etanol, se consideró:

-Para la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico es necesario romper la matriz formada por la lignina, celulosa y hemicelulosa que forma la fibra.

-Los tratamientos térmicos favorecen la relajación de la fibra, es decir, permiten la ruptura de la matriz y facilitan la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa.

-La remoción de lignina se utiliza como indicativo del grado de relajación de la fibra. Sin embargo, en vista de los inconvenientes presentados en su cuantificación y considerando que el objetivo del pretratamiento es maximizar la obtención de azúcares fermentables, se decide considerar los resultados del análisis de Van Soest para la celulosa y hemicelulosa, componentes para los cuales no se presentan inconvenientes en su determinación.

Molienda final:

Se realizó la molienda del material hasta alcanzar el tamaño de partícula establecido por el análisis granulométrico. Se utilizó un molino de cuchillas y tamices normalizados serie Tyler.

3.3.2 Determinación del tiempo de deslignificación

Se realizó la deslignificación de los residuos de cosecha de la caña de azúcar a las mismas condiciones usadas en la determinación del tamaño de partícula: Temperatura 190°C, solución de H₂SO₄ con pH 3 (concentración de H₂SO₄ de 0,2 %p/p), relación sólido-líquido 100g/l y el tamaño de partícula elegido. Este proceso se realizó a 0.5, 1, 2, 5, 10 y 15 minutos de reacción y análogamente a la determinación del tamaño de partícula, se analizaron los resultados

utilizando el Número Kappa y el método de Van Soest. Para la elección del tiempo, se consideró el mínimo posible que generó mejores resultados en cuanto a conservación de azúcares (celulosa y hemicelulosa).

3.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Estas actividades permitieron establecer el efecto de la temperatura, la concentración de ácido y la relación sólido-líquido sobre el proceso de deslignificación por explosión con vapor. Para determinar los efectos de las variables se utilizó un análisis estadístico Factorial 2^3 con tres puntos centrales y los puntos estrella de cada variable (Ver Tabla 1). El diseño relaciona los valores máximos (+), mínimos (-), centrales y puntos estrella (++, --) de cada variable a evaluar y la interrelación entre ellos.

Tabla 1. Diseño de experimentos para la determinación de la significancia de las variables.

Prueba	T (°C)	pH H ₂ SO ₄	Rel. S/L
1	+	+	+
2	+	+	-
3	Central	Central	Central
4	+	-	+
5	-	+	+
6	+	-	-
7	Central	Central	Central
8	-	+	-
9	-	-	+
10	-	-	-
11	Central	Central	Central
12	++	Central	Central
13	--	Central	Central
14	Central	++	Central
15	Central	--	Central
16	Central	Central	++
17	Central	Central	--

Para la determinación de las variables significativas del proceso se realizó la deslignificación a las condiciones mostradas a continuación. Los valores de las variables incluyen el máximo, mínimo, central y estrellas de cada variable a evaluar.

Variable	(+)	(-)	Central	Estrella ++	Estrella --
T (°C)	195	165	180	201	159
Rel. S/L	100g/1,5L	100g/2,5L	100g/2,0L	100g/1,3L	100g/2,9L
pH ¹ H ₂ SO ₄	2,5	1,5	2	2,7	1,3

¹Para facilitar la experimentación, se manejó la variable concentración de ácido en términos de pH. (Ver APÉNDICE A)

Debido a que se presentaron múltiples inconvenientes en la determinación del tamaño de partícula y del tiempo de deslignificación utilizando el método de Van Soest para hallar la cantidad de lignina, se decidió cambiar la variable de respuesta a cantidad de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, con la determinación de los azúcares reductores, se garantizó la eficiencia del pretratamiento de deslignificación para la obtención de monómeros fermentables.

Para la evaluación de la cantidad de azúcares reductores se utilizó la metodología DNS (Miller, 1959) (Ghose, 1987). La técnica del ácido 3-5 dinitrosalicílico consiste en una oxidoreducción que se fundamenta en la capacidad de la glucosa y de otros azúcares para reducir este compuesto a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico, reducción que produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores, la cual mediante lectura espectrofotométrica permite determinar dicha concentración por la interpolación en una curva patrón.

Se realizó la deslignificación siguiendo el diseño de experimentos establecido (Ver Tabla 1) y posteriormente se realizó la hidrólisis enzimática de cada una de las fibras deslignificadas. La hidrólisis se realizó con base en la norma NREL/TP-510-42629 con las siguientes condiciones:

Concentración de sustrato: 10% w/v (g/ml)
Temperatura: 50 °C
Agitación magnética
Tiempo: 48 horas
Buffer citrato: pH=4.8
Antibiótico: 1 ml
Concentración de enzimas: 0,4 ml enzima/ g sustrato.
Coctel de enzimas comerciales (Salcedo, et al. 2011):

Los resultados obtenidos se analizaron en el programa Statgraphics (StatPoint.Statgraphics.Centurion) el cual permite evaluar la influencia de las variables mediante diagramas de Pareto y gráficos de efectos principales.

3.5 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Permitió la determinación de las condiciones de operación adecuadas del proceso de deslignificación por explosión con vapor, utilizando los factores experimentales que tienen una influencia significativa en las variables de respuesta, de acuerdo a lo encontrado en los análisis estadísticos. Se analizaron los resultados obtenidos para determinar el intervalo de condiciones que favorecen la hidrólisis de azúcares fermentables en la obtención de bioetanol. Para esto, se realizó un análisis de los *Efectos Principales* en la concentración de azúcares reductores el cual permitió establecer las tendencias a seguir en la búsqueda de las mejores condiciones del proceso.

Deslignificación:

La metodología empleada en esta actividad fue la misma que en la determinación de las variables significativas del proceso, pero las pruebas se realizaron con las variables que,

según los análisis estadísticos, resultaron ser influyentes en el proceso. Teniendo definidas las tendencias de las variables, se estableció el nuevo intervalo de valores de las variables del proceso para validar los resultados y determinar así las condiciones apropiadas de deslignificación. Los valores de las variables incluyen el valor máximo, mínimo, central y estrellas del nuevo intervalo a evaluar y las combinaciones de ellos (Ver Tabla 1). Las condiciones evaluadas fueron:

Variable	(+)	(-)	Central	Estrella ++	Estrella --
T (°C)	210	200	205	212	198
Rel. S/L	100g/2,5L	100g/3,0L	100g/2,75L	100g/2,42L	100g/3,13L
pH* H ₂ SO ₄	1,5	0,8	1,15	1,65	0,65

Mediciones Generales:

Se determinó la concentración de azúcares reductores y la pérdida en peso del material usando la metodología DNS. Utilizando el programa Statgraphics se estableció la correlación que describe el comportamiento de la variable *concentración de azúcares reductores* en función de las variables significativas del proceso. Se consideraron los siguientes criterios:

- Los coeficientes de la correlación deben ser menor a la mitad del número de ensayos realizados en la experimentación.
- La variabilidad de la correlación no debe ser inferior al 85%
- El coeficiente libre (constante) debe ser significativamente pequeño.

Establecida la correlación más adecuada para el comportamiento de la *concentración de azúcares* se generó la superficie de contorno que permitió determinar el intervalo de condiciones de operación adecuadas para la deslignificación.

Verificación del tiempo de deslignificación:

Con las condiciones de temperatura, tamaño de partícula, relación sólido-líquido y concentración de catalizador que se eligieron como las más adecuadas para el proceso, se observó la variación de la concentración de azúcares reductores a diferentes intervalos de tiempo de deslignificación: Las condiciones del proceso fueron:

Temperatura: 193 °C

pH: 1,33 (0,174% p/p de H₂SO₄)

Relación sólido-líquido: 40g/l

Tamaño de partícula: pasante malla 9 (diámetro promedio de partícula de 1,82 mm)

Tiempo de deslignificación: 0, 10, 30, 60, 120 segundos

Se eligió el tiempo que permitió conservar la mayor cantidad de azúcares y a la vez evitar la pérdida en peso de material sólido.

3.6 HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DEL MATERIAL DESLIGNIFICADO

Se determinó la cantidad de etanol obtenido del material deslignificado a las condiciones establecidas como adecuadas. Para esto, el material se deslignificó a las siguientes condiciones:

Temperatura: 193 °C

pH: 1,33 con equivalencia en [H₂SO₄] 0,174%p/p

Relación sólido-líquido: 40g/l

Tamaño de partícula: pasante malla 9 (diámetro promedio de partícula de 1,82 mm)

Tiempo: 0,5 minutos

El material pretratado se hidrolizó enzimáticamente según el protocolo experimental NREL/TP-510-42629 con las siguientes condiciones:

Concentración de sustrato: 10% w/v (g/ml)

Temperatura: 50 °C

Agitación: 150 rpm

Tiempo: 72 horas

Buffer citrato: pH=4.8

Concentración de enzimas: 0,4 ml enzima/ g sustrato.

Coctel de enzimas (Salcedo, et al. 2011):

El material hidrolizado se filtró y se reservó la torta sólida para analizarla. El líquido resultante se fermentó con *saccharomyces cerevisiae* según el protocolo experimental NREL/TP-510-42630. (Ver APÉNDICE B)

Para la fermentación del líquido resultante de la hidrólisis enzimática de las muestras, se preparó un medio análogo al usado en el crecimiento de la levadura, reemplazando la glucosa por el líquido de la hidrólisis, ajustando su concentración. La fermentación se realizó a las siguientes condiciones:

Temperatura: 32°C

Agitación: 130 rpm

Tiempo: 15 horas

Concentración de peptona: 20g/l

Concentración de glucosa: 60g/l

Extracto de levadura: 10g/l

Buffer citrato: pH 4.8

Levadura: 1,7 g/l

Volumen de hidrolizado: 250 ml

Al finalizar la fermentación, se midió la concentración de azúcares reductores para determinar el rendimiento teórico de producción de etanol del proceso.

3.7 ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES Y ETANOL OBTENIDO

El objetivo del pretratamiento de los residuos de cosecha de la caña de azúcar es facilitar la hidrólisis de los azúcares presentes en el material para fermentarlos y obtener bioetanol. El material pretratado a las condiciones establecidas como adecuadas para el proceso y posteriormente hidrolizado y fermentado se analizó para determinar la variación de las cantidades de lignina y azúcares reductores durante el proceso. Además, se midió la cantidad de etanol obtenido y se comparó con el rendimiento teórico.

Para la determinación de los componentes del material (lignina y carbohidratos) se utilizó el procedimiento **NREL/TP-510-42618** *“Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass”* el cual permite medir los carbohidratos estructurales y no estructurales de la biomasa mediante dos etapas de hidrólisis que permiten fraccionarla en material ácido soluble y ácido insoluble.

El material ácido insoluble es principalmente lignina ácido insoluble, proteína y cenizas, los cuales se cuantifican mediante análisis gravimétricos. El material ácido soluble, además de contener las formas monoméricas de los carbohidratos, incluye también la fracción de lignina ácido soluble, la cual es medida por espectroscopía. Los monómeros, por ser solubles en el líquido de la hidrólisis, se miden por HPLC.

Se realizó el análisis al material sólido de cada etapa del proceso. Se manejó la siguiente nomenclatura:

1. Muestra sin pretratamiento
2. Material deslignificado
3. Réplica del material deslignificado
4. Torta sólida resultante de la hidrólisis del material deslignificado
5. Torta sólida resultante de la réplica de la hidrólisis del material deslignificado.

Las pruebas identificadas como 1', 2', 3', 4' y 5' corresponden al duplicado de cada muestra requerido en el procedimiento para la validación de los resultados.

Con los resultados obtenidos de la fracción ácido soluble medidos por HPLC se establecieron las proporciones de cada componente (lignina ácido soluble, lignina ácido insoluble, glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa) y se midió la concentración de etanol alcanzada en el fermentado. La composición de cada componente se refirió a 100g de materia prima seca. La concentración obtenida para el etanol se reportó en %v/v respecto a la cantidad de fermentado obtenido del proceso. Posteriormente, se realizó el balance de materiales del proceso.

3.8 ANÁLISIS ECONÓMICO PRELIMINAR DEL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Esta etapa permitió estimar el costo del proceso de deslignificación por explosión con vapor a escala piloto. Se realizó el balance del consumo de material, insumos y servicios para establecer la cantidad y los costos de los insumos químicos necesarios y de los servicios requeridos para realizar el proceso de deslignificación por explosión con vapor a escala piloto.

Una vez se obtuvieron los costos de la materia prima, de los insumos y de los servicios, se calculó el costo aproximado de realizar el proceso de deslignificación por explosión con vapor a escala piloto.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRUEBAS PRELIMINARES

4.1.1 Determinación del tamaño de partícula del material

Comparando las dos técnicas analíticas utilizadas, se observó la tendencia de la lignina a concentrarse en el material pretratado lo que se evidencia cualitativamente en el aumento del Número Kappa y cuantitativamente en el análisis de Van Soest. Los resultados indican que el contenido de lignina en el material pasó de un promedio de 12% (10,55g) a 24% (12,76g), después del pretratamiento (Ver APÉNDICE C).

Este comportamiento induce a creer que las altas temperaturas y el ácido sulfúrico empleado como catalizador de la deslignificación posiblemente favorecieron la formación de compuestos no deseados en el proceso, como los furfurales e hidroximetil furfurales (HMF) que no son cuantificados (Li, Henriksson, Gellerstedt, 2005). Además, a las condiciones del proceso se dio la formación de compuestos con alto peso molecular los cuales, por reacciones de recondensación con la lignina, se consideran en el análisis como material ácido insoluble (lignina Klason) (Cara, Ruiz, 2007) (Ballesteros, Olivia, et. al, 2002) y su cuantificación está fuera del alcance de este trabajo. Esto implica que para el análisis mediante métodos gravimétricos como el de Van Soest se consideraron estos compuestos como aditivos a la lignina, lo que representó un aumento, no solo porcentual, sino también en la cantidad de ésta. Análogamente, es posible que se formaran compuestos por oxidación del Permanganato de Postasio en el análisis del Número Kappa.

Analizando las concentraciones de lignina se observó que estas no cambiaron de manera significativa con el tamaño de partícula (en el intervalo establecido) después de la deslignificación (21-24) %, por lo que se concluyó que la concentración es prácticamente homogénea y se descartó este componente como variable de respuesta del pretratamiento.

Tomando en cuenta los porcentajes obtenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina, se calculó el grado de concentración de los componentes después del pretratamiento. Para esto, se calcularon los coeficientes de distribución de cada componente y las selectividades respectivas (Ver APÉNDICE C).

Se observó que después del pretratamiento el componente que más se concentra es la celulosa, pasando del 47% al 52% lo que es favorable para los procesos siguientes. Analizando el coeficiente de distribución de la celulosa, se observó que la mayor concentración se presentó en las partículas de mayor tamaño, lo que se validó con la menor concentración de lignina. Además, considerando la selectividad de celulosa/lignina y de celulosa/hemicelulosa para este tamaño de partícula (pasante malla 9), se tiene que corresponde a los valores más altos, favoreciendo la concentración de los azúcares por encima de la lignina (Ver Figura 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos y analizando el incremento de partículas finas después del proceso de deslignificación, que pueden presentar dificultades en los procesos posteriores, se decidió que el tamaño de partícula adecuado es pasante malla 9 (diámetro promedio de partícula de 1,82 mm). Por lo tanto, para los ensayos posteriores se molió el material hasta que el 80% del mismo alcanzó este tamaño.

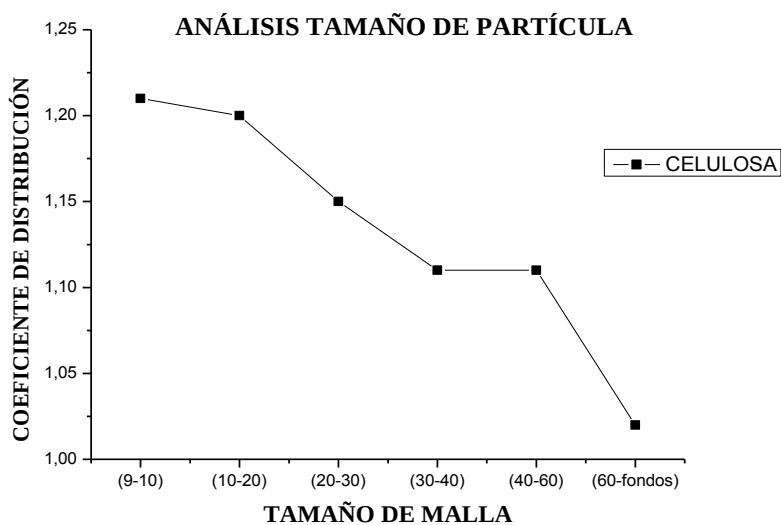


Figura 2. Análisis del tamaño de partícula

4.1.2 Determinación del tiempo de deslignificación

De los resultados obtenidos se observó que la concentración de lignina se incrementó, al igual que en las pruebas de determinación del tamaño de partícula, debido a la pérdida de la hemicelulosa durante el proceso y a la formación de compuestos no deseados. Por lo tanto, se analizaron los coeficientes de distribución y las selectividades para cada componente (celulosa, hemicelulosa y lignina) (Ver APÉNDICE D)

Considerando que las concentraciones de lignina y celulosa no varían significativamente con el tiempo, se eligió la hemicelulosa como componente a conservar. Debido a que ésta se pierde conforme aumenta el tiempo y lo que se desea es maximizar la cantidad de azúcares reductores, se decidió tomar 0,5 minutos como tiempo de deslignificación (Ver Figura 3).

Las pruebas preliminares permitieron establecer los valores de las variables tamaño de partícula y tiempo de proceso. Éstas se mantuvieron fijas en los análisis posteriores con los valores: Tamaño de partícula: Pasante malla 9 (diámetro promedio de partícula de 1,82 mm), tiempo de proceso: 0,5 minutos

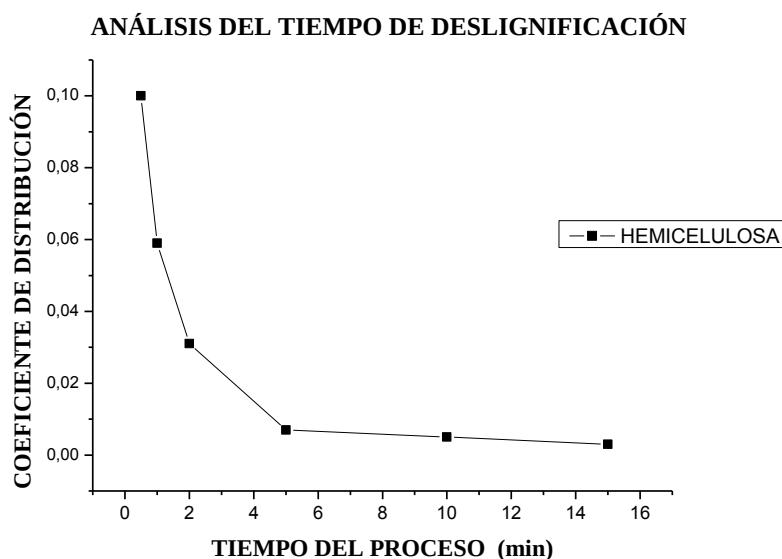


Figura 3 Análisis del tiempo de proceso

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Se observó que las mayores pérdidas de peso se presentaron en las fibras tratadas a altas temperaturas, sin embargo, estas mostraron la mayor concentración de azúcares reductores y los mayores porcentajes de sacarificación de las condiciones evaluadas (Ver Figura 4) APÉNDICE E).

El Porcentaje de Sacarificación se considera un indicador de la conversión de celulosa y hemicelulosa a sus monómeros respectivos durante la hidrólisis enzimática. Se calcula usando la **Ecuación 1** (Salcedo, et al. 2011) (Ver Figura 5)

Ecuación 1: Porcentaje de sacarificación

$$\text{Sacarificación (\%)} = \frac{\text{azúcares reductores (mg/ml)} * 0.9}{\text{Concentración de sustratos (mg/ml)}} \times 100$$

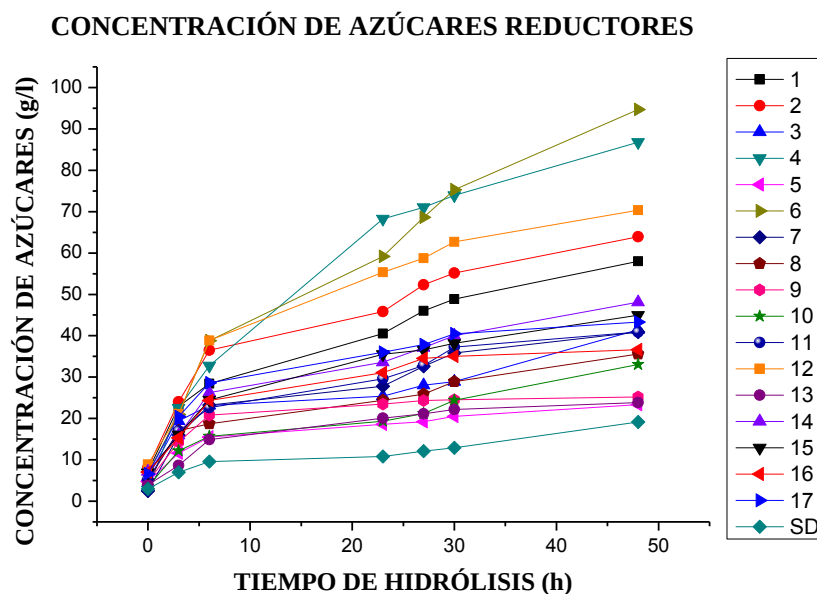


Figura 4. Concentración de azúcares reductores en la fibra deslignificada

PORCENTAJE DE SACARIFICACIÓN DEL MATERIAL DESLIGNIFICADO

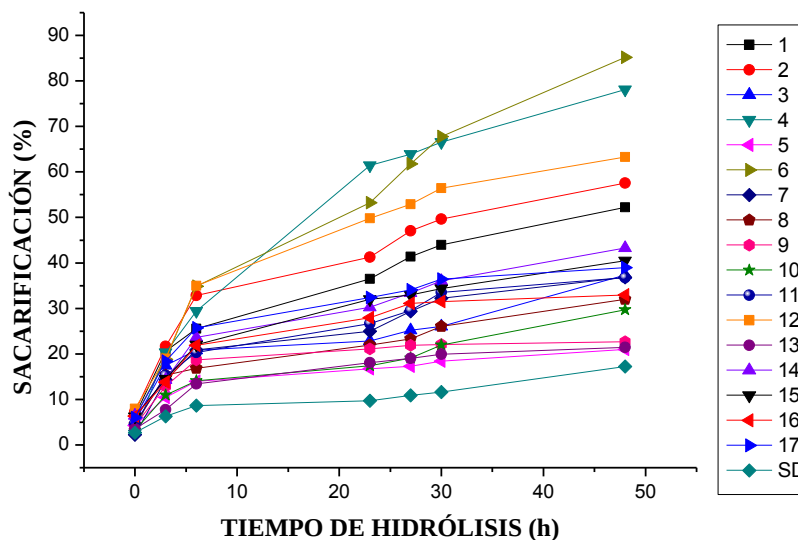


Figura 5. Porcentaje de sacarificación de la hidrólisis enzimática

Se pudo observar que en el experimento hecho a una temperatura 195°C, pH 1,5 y relación sólido/líquido de 40g/l (100g/2,5l), se obtuvo la mayor concentración de azúcares (94,70 g/l) y el mayor porcentaje de sacarificación (85,2%). Para evaluar la influencia de las variables en el proceso, se utilizó el programa Statgraphics (Statgraphics.Centurion) (Ver APÉNDICE E).

Del análisis de los resultados, se estableció como variables significativas en el proceso: Temperatura, pH (concentración de H₂SO₄), relación sólido/líquido y la interacción de los factores temperatura y pH con un nivel de confianza del 95% (Ver APÉNDICE E).

4.3 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Analizando los efectos de las variables en el proceso de deslignificación, se observó que si se aumenta la temperatura y se disminuyen el pH y la relación sólido/líquido, es posible maximizar la concentración de azúcares.

De los factores influyentes, la temperatura domina el proceso. Considerando los valores altos de esta variable y comparando los valores de la relación sólido/líquido para estas temperaturas, se observó que la menor relación favorece el proceso. Sin embargo, fue necesario encontrar la superficie que mejor representó el comportamiento de las variables de proceso respecto a la concentración de azúcares. (Ver Figura 6)

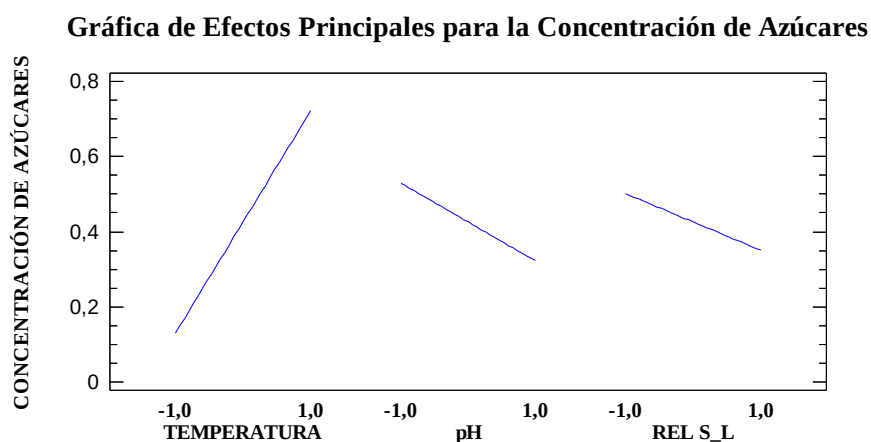


Figura 6. Efectos de las variables sobre la concentración de azúcares reductores para el intervalo de temperatura de 159 a 201°C

De esta manera, realizando regresiones múltiples que relacionaran las variables independientes, así como la interacción de los efectos significativos y que fuera estadísticamente representativa, se obtuvo la regresión que se muestra en la Ecuación 2 (Ver APÉNDICE E)

Ecuación 2: Concentración de azúcares

$$\text{Concentración de Azúcares} = 0,395294 - 0,0637584 \cdot \text{pH} - 0,0612416 \cdot \text{Rel_S_L} + 0,39279 \cdot \text{Temperatura} - 0,10125 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{pH} - 0,0965402 \cdot \text{Temperatura}^3$$

Con la Ecuación 2 y con una relación sólido/líquido de 40g/l se construyó la superficie de contorno para la variable estandarizada de concentración de azúcares reductores. Se evidenció que para maximizar la concentración de azúcares es necesario bajar el pH de la solución de ácido sulfúrico. Respecto a la temperatura, se observó un máximo en la curvatura de la concentración de azúcares, lo que sugirió que hay un valor de temperatura definido que favorece la liberación de azúcares y por encima del cual se da la degradación de los compuestos (Ver Figura 7).

SUPERFICIE DE CONTORNO DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES

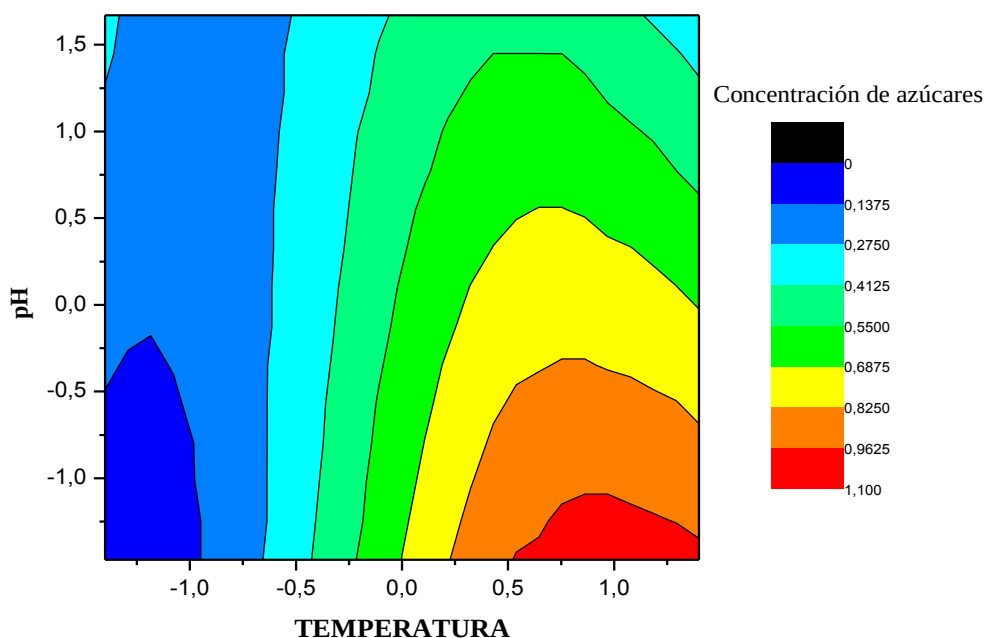


Figura 7. Superficie de contorno de la concentración de azúcares obtenida para el intervalo de temperaturas de 159 a 201°C

Teniendo definidas las tendencias de las variables, se estableció el nuevo intervalo de condiciones para validar los resultados y determinar así las condiciones apropiadas del proceso (Ver APÉNDICE F).

De los resultados obtenidos se puede observar que el efecto de la temperatura, que es la variable más influyente, cambió de positivo a negativo, sugiriendo su disminución para aumentar la obtención de azúcares. Esto sugirió que en algún punto entre los dos intervalos evaluados 159 a 201°C y 198 a 212°C, se encuentra el valor de la variable temperatura que maximiza la obtención de azúcares (Ver Figura 7). Por otro lado, los efectos de pH y de la relación sólido/líquido tendieron a estabilizarse, dejando de ser fuertemente influyentes (Ver Figura 8).

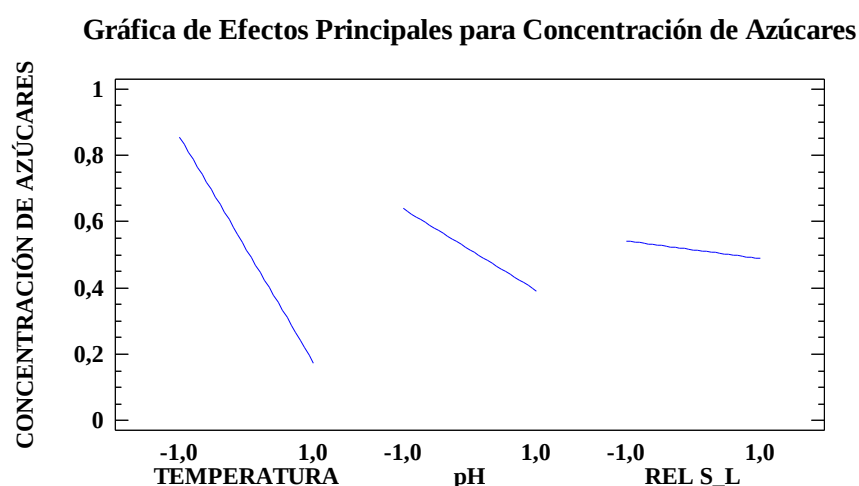


Figura 8. Efectos principales para la evaluación del nuevo intervalo de condiciones.
Temperatura de 198 a 212°C

Se analizó el intervalo completo de datos en función de la temperatura 159 a 212°C para determinar el intervalo favorable para el proceso (Ver Figura 9). Nuevamente la temperatura fue la variable más influyente y con un efecto positivo sobre la concentración de azúcares. (Ver APÉNDICE F)

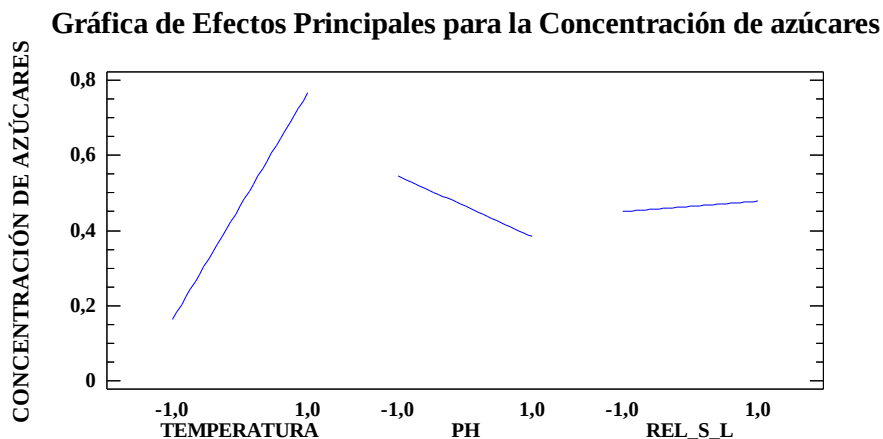


Figura 9 Efectos Principales para la concentración de azúcares reductores en el intervalo de temperatura de 159 a 212°C

La gráfica de efectos principales sugirió el aumento de temperatura, lo que confirmó que existe un intervalo de temperaturas que favorece la relajación del material y facilita la hidrólisis de los azúcares del material. Se observó que las otras variables, pH y relación sólido-líquido tendieron a estabilizarse. Realizando regresiones múltiples se determinó la ecuación que mejor representó el conjunto completo de datos (159 a 212°C). Se obtuvo la Ecuación 3.

Ecuación 3: Concentración de azúcares reductores

$$\begin{aligned} \text{Concentración de azúcares reductores} = & 0,572786 - 0,0998785 \cdot PH - 0,0275783 \cdot REL_S_L + \\ & 0,496869 \cdot Temperatura - 0,0422323 \cdot REL_S_L^2 + 0,190703 \cdot Temperatura \cdot REL_S_L - \\ & 0,464821 \cdot Temperatura^2 - 0,472026 \cdot Temperatura^3 \end{aligned}$$

Se graficó la Ecuación 3 considerando que la relación sólido-líquido es el factor menos influyente del proceso. Se fijó esta variable en su menor valor (40g/l), puesto que fue la tendencia que favoreció al proceso. (Ver APÉNDICE F).

Se generó la superficie de contorno del proceso para establecer las condiciones adecuadas. Concentraciones de azúcares reductores mayores a 40 g/l son favorables para la obtención de etanol (Ruiz, Cara, et. al, 2007). La región de mayor concentración de azúcares (región naranja y roja) fue el intervalo que favoreció el proceso (Ver Figura 10).

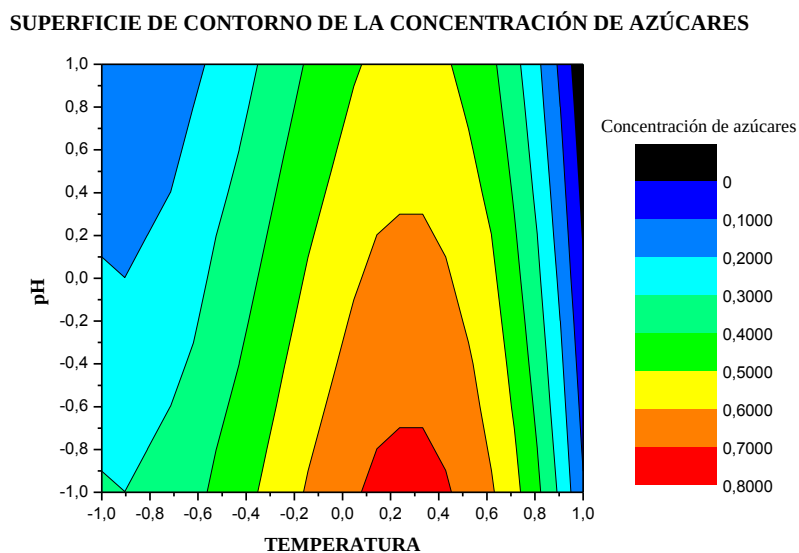


Figura 10. Superficie de contorno para la concentración de azúcares reductores en el intervalo de temperatura de 159 a 212°C

La superficie de contorno muestra las variables normalizadas. Haciendo la transformación de estas a sus valores reales se tiene que una concentración de azúcares de 40 g/l corresponde a 0.6 en la variable normalizada, de manera que para establecer el intervalo de condiciones favorable para el proceso se consideró la región naranja y roja de la superficie de contorno. Se tuvieron los siguientes resultados para cada variable:

Temperatura: Intervalo normalizado [-0.13 – 0.65]
Intervalo real [182 - 203] °C

pH [H₂SO₄]: Intervalo normalizado [-1 – 0.3]
Intervalo real [0.66 – 1.99] corresponde a una concentración de H₂SO₄ de [0.032 – 0.278]%p/p

4.3.1 VERIFICACIÓN DEL TIEMPO DE DESLIGNIFICACIÓN

Se realizó el proceso de deslignificación e hidrólisis enzimática para cada condición de tiempo de proceso. (Ver APÉNDICE F). Los resultados mostraron que aunque al mayor tiempo analizado se alcanzó la mayor concentración de azúcares y el mayor porcentaje de sacarificación, la pérdida en peso fue considerable. Esto se debe a que con el paso del tiempo se degrada la hemicelulosa y esto no es favorable para la obtención de bioetanol. Además, el aumento del tiempo favorece la formación de compuestos inhibidores en la hidrólisis y fermentación (Li, Henriksson, Gellerstedt, 2005), por lo que se decidió trabajar a 0,5 minutos de deslignificación.

Se definieron las condiciones adecuadas para el proceso de deslignificación:

Temperatura: 182 a 203 °C

pH: 0.66 a 1.99 con equivalencia en concentración de H₂SO₄ de 0.032 a 0.278 %p/p

Relación sólido-líquido: 40g/l

Tamaño de partícula: pasante malla 9 (diámetro promedio de partícula de 1,82 mm)

Tiempo: 0,5 minutos

4.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN DEL MATERIAL DESLIGNIFICADO

Se deslignificó 100 g de materia prima con 11,8% de humedad a las condiciones adecuadas. Se obtuvo 64,75 g de material de material pretratado con 3,55% de humedad. En la hidrólisis

enzimática se alcanzó una concentración de azúcares reductores de 48 g/l y un porcentaje de sacarificación de 43%. (Ver APÉNDICE G). Después de la fermentación, se obtuvo en el líquido una concentración de azúcares de 2,03 g/l y un porcentaje de sacarificación de 1,85%, lo cual evidencia una buena conversión de azúcares a etanol.

4.5 ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES Y ETANOL OBTENIDO

El proceso de obtención de etanol realizado incluyó las siguientes etapas (Ver Figura 11):

- Pretratamiento por explosión con vapor de residuos de cosecha de caña de azúcar utilizando 100 g de material seco. Se liberó vapor que no fue cuantificado y se obtuvo *material pretratado* (64.75 g)
- Hidrólisis enzimática del *material pretratado* por 72 horas. De este proceso se obtuvo el *hidrolizado* (627 ml) y las tortas del sólido.
- Fermentación del *hidrolizado* con *saccharomyces cerevisiae*. De este proceso se obtuvo *etanol* (12,03 g) y quedó el *residuo fermentado al cual solo se le cuantificó la concentración de azúcares presentes*.

Con los resultados de las concentraciones de HPLC medidos, se determinó la concentración de los componentes en cada etapa del proceso (Ver Tabla 2)

Tabla 2. Composición del material en cada etapa del proceso

<i>COMPONENTE</i>	<i>MATERIA PRIMA</i>	<i>MATERIAL PRETRATADO</i>	<i>HIDROLIZADO</i>	<i>FERMENTADO</i>
Celulosa (glucosa)	45,90	52,35	25,51	0,51
Hemicelulosa ¹	32,60	6,88	4,45	-
<i>Xilosa</i>	22,90	5,98	3,26	
<i>Manosa</i>	1,80	0,20	0,39	
<i>Galactosa</i>	2,20	0,10	0,53	
<i>Arabinosa</i>	5,70	0,60	0,27	
Lignina acido insoluble AIL	11,55	24,25	-	-
Lignina acido soluble ASL	7,00	5,07	-	-
Otros (extractivos y cenizas)	3,00	-		
Etanol	-	-		2,43 ²

¹Hemicelulosa: la composición corresponde al la suma de los monómeros que contiene: Xilosa, manosa, galactosa y arabinosa

²Etanol: La composición que se reporta es en %v/v

En el balance de materiales del proceso (Ver Tabla 3) se evidenció que el análisis cuantitativo del material pretratado con explosión con vapor se dificulta por los diferentes compuestos que se pueden formar durante su desarrollo, como es el caso de los furfurales, HMF, ácido acético y demás componentes volátiles ((Li, Henriksson, Gellerstedt, 2005). Debido a esto, un balance completo de masa se convierte en un proceso muy complejo y que está fuera del alcance de este trabajo. Sin embargo, se presentan las variaciones de los componentes fundamentales del proceso (lignina y carbohidratos).

Después del pretratamiento, se obtuvo el 64% del material original. Esta recuperación se considera buena en comparación con estudios realizados con otras maderas blandas como es el caso del sorgo (50% de sólidos recuperados), trigo (60% de sólidos recuperados) (Ballesteros, Olivia, et. al, 2004) y poda de olivo (40% de sólidos recuperados) (Cara, Ruiz, et. al, 2007)

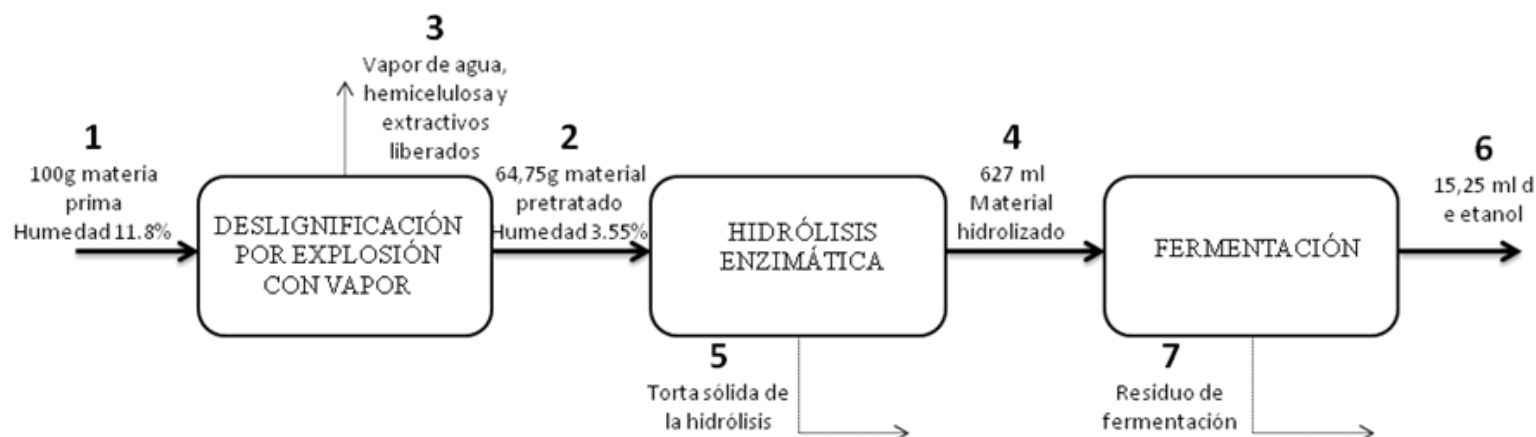


Figura 11. Diagrama del proceso de obtención de etanol a partir de hojas y cogollos de caña de azúcar

Tabla 3. Balance de materiales del proceso de obtención de etanol a partir de hojas y cogollos de caña de azúcar

COMPONENTE	1	2	3	4	5	6	7
Celulosa (glucosa)	40,48	32,69	Vapor de agua, hemicelulosa y extractivos liberados (No cuantificados)	25,51	6,99	-	0,51
Hemicelulosa	28,75	5,27		4,45	0,78		-
Xilosa	20,20	3,73		3,26	0,45		
Manosa	1,59	0,42		0,39	0,03		
Galactosa	1,94	0,61		0,53	0,07		
Arabinosa	5,03	0,51		0,27	0,23		
Lignina ácido insoluble AIL	10,14	15,14			24,68	-	-
Lignina ácido soluble ASL	6,17	3,16			3,18	-	-
Etanol	-	-		-	-	12,03	-
OTROS (extractivos y cenizas)	2,65	6,23		-	-	-	-

Analizando los azúcares presentes en la materia prima (69,23 g), se observó que después del pretratamiento se perdió el 45% de ellos. La hemicelulosa del material se solubilizó excesivamente, y su contenido se redujo en un 80% en relación a la cantidad inicial. Aunque la pérdida de hemicelulosa está asociada al tipo de sustrato y a las condiciones de la explosión con vapor, pérdidas entre 75-90% son propias del principio de hidrólisis (Ballesteros, Olivia, et. al, 2004) (91% para la poda de olivo (Cara, Ruiz, et. al, 2007), 89% para el bagazo de caña de azúcar (Laser, Shulman, et. al, 2001), 80% para maderas blandas (Ballesteros, Olivia, et, al, 2000)). Por otro lado, la solubilización de la celulosa fue del 20%, que es comparable con maderas blandas como el sorgo y el trigo (Ballesteros, Olivia, et. al, 2004).

El material pretratado contiene 38 g de azúcares/100 g de materia prima, lo que resultó ser un buen rendimiento en cuanto a recuperación de azúcares comparado con materiales como el olivo (47,5 g de azúcar/100 g de materia prima) (Cara, Ruiz 2007), el álamo (50,3 g de azúcar /100g de materia prima) y las maderas blandas (46.4 g de azúcar / 100 g de materia prima) (Ballesteros, Olivia, 2000)

Sin embargo, aunque el material pretratado contiene 38 g de material disponible para ser hidrolizado, una vez realizado este proceso se alcanzó una concentración de azúcares de 48g/l, correspondiente a 30g de azúcares, y ésta se consideró para determinar el rendimiento de la conversión de azúcares a etanol. Concentraciones como la obtenida para las hojas y cogollos de caña (30g de azúcares/100g de materia prima) son apropiadas para la obtención de etanol, comparadas con otros estudios realizados: Girasol (16,7g de azúcar/100 g de materia prima) (Ruiz, Cara et. al. 2007), poda de olivo (12 g de azúcar/100 g de materia prima) (Cara, Ruiz, et. al, 2007) y maderas blandas (17g de azúcar/100g de materia prima) (Söderström, Pilcher, et. al, 2002)

Para la determinación de los rendimientos de producción de etanol, se consideró la relación teórica de *0.51g de etanol/g azúcar* (Cara, Ruiz, et. al. 2007), un volumen de fermentado de 627 ml y la concentración obtenida experimentalmente (Ver Tabla 4)

Finalmente, se obtuvo 12,03 g de etanol /100 g de materia prima, equivalentes a una concentración de 19 g/l alcanzando un rendimiento de fermentación del 78,57%.

Tabla 4 Análisis de los azúcares fermentables y el etanol obtenido en el proceso

<i>COMPONENTE</i>	<i>CANTIDAD</i>	
	<i>G</i>	<i>ml</i>
Azúcar en la materia prima	69,23	
Azúcar en el material pretratado	37,96	
Azúcares en el hidrolizado	30,02	
Etanol teórico	15,31	19,40 ¹
Etanol real	12,03	15,25
Rendimiento de azúcares ²		43,36%
Rendimiento de etanol ³		78,61%

¹Conversión de gramos a mililitros usando densidad del etanol 0.789 g/ml

²El rendimiento de azúcares corresponde a la relación de los azúcares disponibles para ser fermentables en el material hidrolizado y la cantidad de azúcares disponibles en la materia prima, expresado como porcentaje.

³El rendimiento de etanol corresponde a la relación entre el etanol real y el teórico expresado como porcentaje

Comparando la cantidad de etanol obtenido de las hojas y cogollos de la caña de azúcar con otros tipos de material lignocelulósico con concentraciones de azúcares similares al del material estudiado y que se usan para la obtención de etanol, como el cedro 17g etanol/100g de material (Chikako, et al. 2011) o la poda de olivo 15.9 g de etanol/100g de material (Cara, Ruiz, et. al. 2007), se observó que los resultados fueron comparables y satisfactorios. Además, comparando la concentración alcanzada experimentalmente con otros estudios similares, se concluyó que las hojas y cogollos de la caña de azúcar pretratadas por la metodología de explosión con vapor son potencialmente eficaces para la producción de etanol (Ver Tabla 5)

Tabla 5 Rendimientos de etanol obtenidos del pretratamiento de diferentes sustratos

Material	Concentración g/l	Rendimiento %	Referencia
Álamo	19.0	71.2	Ballesteros, Olivia, et. al, 2004
Eucalipto	17.0	62.5	Ballesteros, Olivia, et. al, 2004
Paja de trigo	18.1	62.5	Ballesteros, Olivia, et. al, 2004
Sorgo	16.2	60.9	Ballesteros, Olivia, et. al, 2004
Sauce	15.4	79	Sassner, Martensson, et. al, 2007

4.6 ANÁLISIS ECONÓMICO PRELIMINAR DEL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN POR EXPLOSIÓN CON VAPOR

Para la realización de este análisis económico se decidió trabajar con los costos de operación (materias primas, insumos y servicios), considerando una planta en estado estable.

Para calcular los costos de operación de la deslignificación por explosión con vapor se tomó una capacidad de una tonelada de hojas y cogollos de caña de azúcar en un día y se determinó las cantidades necesarias de materias primas, insumos y servicios para el pretratamiento de dicha cantidad (Ver Tabla 6).

Adicionalmente, se establecieron los costos de las materias primas, insumos y servicios para deslignificar una tonelada de residuos de caña (Ver Tabla 7).

Tabla 6. Cantidades de materias primas, insumos y servicios para pretratar 1 Ton de residuos

<i>DESCRIPCIÓN</i>	<i>CANTIDAD</i>	<i>UNIDAD</i>
MATERIAS PRIMAS		
Hojas y Cogollos de caña de azúcar	1.000,00	kg
INSUMOS		
Concentración de H2SO4	0,17	% p/p
Solución de H2SO4 para 1 ton	200,00	L
Cantidad de H2SO4 para 20 m3 de solución al 0,17% p/p	34,00	kg
Volumen de H2SO4 al 99%	61,20	L
SERVICIOS		
Agua para preparar solución de H2SO4	138,80	L
Agua para pretratar 1 Ton residuos	10.000,00	L
Molienda de 1 Ton de Hojas y Cogollos (Molino forrajero 3 kW/h)	24,00	kW
Energía consumida por el Reactor (Reactor alta presión 9 kW/h)	72,00	kW

Tabla 7. Costos de materias primas, insumos y servicios para pretratar 1 Ton de residuos

DESCRIPCIÓN	CONSUMO		VALOR UNITARIO		COSTO	
MATERIAS PRIMAS						
Hojas y Cogollos de caña de azúcar	1.000,00	kg	0,01	\$/kg	\$	10
Transporte Hojas y Cogollos de caña	1.000,00	kg	14.000,00	\$/Ton*25km	\$	28.000
INSUMOS						
Volumen de H2SO4 al 97%	61,20	L	1.000,00	\$/L	\$	61.200
SERVICIOS						
Agua para preparar solución de H2SO4	138,80	L	8.060,00	\$/m3	\$	1.119
Agua para pretratar 1 Ton residuos	10.000,00	L	8.060,00	\$/m3	\$	80.600
Molienda de 1 Ton de Hojas y Cogollos	24,00	kW	279,52	\$/kW	\$	6.708
Energía consumida por el Reactor	72,00	kW	279,52	\$/kW	\$	20.125
Costos de pretratar 1 Ton de Hojas y Cogollos de caña					\$	197.762

El valor de las hojas y cogollos de caña se tomó del Informe anual de CENICAÑA 2011, este precio corresponde al costo generado por la recolección de los residuos. El costo del transporte de los residuos se tomó también de este informe, utilizando el valor que

corresponde a transporte de caña corta (cortada con maquina), pues los residuos antes de transportarse se muele para facilitar su manipulación (CENICAÑA, 2011).

Los costos de agua y energía eléctrica se tomaron de las tarifas vigentes 2012 de EMCALI para establecimientos comerciales y públicos.

De la Tabla 7 se observa que el costo de pretratar 1 Tonelada de hojas y cogollos de caña con Explosión con vapor es de \$ **197.762** y que el mayor costo del proceso es el del agua, pues es el servicio de mayor uso en el pretratamiento porque se utiliza en la generación del vapor y en la preparación de la solución de ácido sulfúrico.

Es importante resaltar que este costo puede disminuir considerablemente si se tiene en cuenta la economía de escala, realizando el proceso para cantidades mayores. Adicionalmente, el costo del pretratamiento puede ser menor si se realizan adecuaciones en el proceso que permitan condensar el vapor generado y utilizarlo nuevamente como agua de alimento para la producción de vapor.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos se concluye:

- La deslignificación por explosión con vapor es una opción viable para el pretratamiento de las hojas y cogollos de la caña de azúcar en el proceso de obtención de etanol puesto que permitió pasar de una concentración de azúcares fermentables de 19 g/l a 48 g/l después del pretratamiento.
- Las variables influyentes en la pérdida de peso y en la concentración de azúcares del material pretratado, en los intervalos evaluados, son: Temperatura, pH (concentración de H_2SO_4), relación sólido-líquido y la interacción de los factores temperatura y pH.
- Las condiciones adecuadas para la deslignificación con explosión con vapor de los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de la caña de azúcar son: Temperatura: 182 a 203°C, pH: 0.66 a 1.99 con equivalencia en concentración de H_2SO_4 0.032 a 0.278 %p/p, relación sólido-líquido: 40g/l, tamaño de partícula: pasante malla 9 (diámetro promedio de partícula de 1,82 mm) y tiempo de reacción: 0,5 minutos.
- El rendimiento de sacarificación alcanzado en la hidrólisis del material pretratado a las condiciones encontradas como las adecuadas fue de 43,36% respecto al contenido de azúcares en la materia prima, obteniendo una concentración de azúcares de 48 g/l.
- En el proceso de fermentación se obtuvieron 12g de etanol, equivalentes a una concentración de 19g/l, que corresponden a un rendimiento de fermentación del 78,57% considerando la conversión teórica de 0,51 g de etanol/g de azúcar.
- El pretratamiento de deslignificación de los residuos de cosecha de la caña de azúcar con explosión de vapor es técnicamente viable, pues se alcanzaron concentraciones de

azúcares adecuadas para la obtención de etanol. El rendimiento de sacarificación, la conversión de etanol, los bajos requerimientos energéticos y de insumos químicos y la baja inversión de capital hacen que este pretratamiento sea adecuado para el aprovechamiento de este material

- Se recomienda adecuar el reactor de alta presión usado en la deslignificación, de manera que haya un tanque en el cual se genere el vapor y este se inyecte al reactor donde se realiza la deslignificación, con el objetivo de garantizar que el contacto de la fibra con el vapor sea completamente homogéneo y haya mayor superficie de contacto. Adicionalmente es importante contar con un control de temperatura preciso y un sistema de calentamiento eficiente para garantizar que la reacción inicie en el momento en el que se alcanza la temperatura y no durante el calentamiento, logrando controlar el tiempo de reacción de la mejor forma.
- Se recomienda adecuar el reactor de alta presión usado en la deslignificación, de manera que se pueda recuperar la fracción ácido soluble que genera en el proceso y que por impedimentos del equipo actualmente no se hace. Esta fracción contiene gran cantidad de azúcares (principalmente hemicelulosas) que, de ser recuperadas, incrementarían el rendimiento del etanol obtenido en el proceso, haciendo que la metodología evaluada sea más rentable.
- La obtención de etanol no es proporcional a la remoción de lignina, pues condiciones extremas en las que se puede remover gran cantidad de lignina favorecen la formación de inhibidores como Furfurales e Hidroximetilfurfurales que impiden el buen desempeño de la hidrólisis y la fermentación. Sin embargo, se recomienda realizar ensayos donde se asocie la remoción de lignina con la obtención de etanol para evaluar las mejores condiciones de deslignificación que favorezcan la producción de etanol y la generación de inhibidores sea mínima.

- El análisis económico realizado es una primera aproximación al costo real de realizar la deslignificación por explosión con vapor a escala piloto, el cual puede disminuir teniendo en cuenta la economía de escala. Es importante incluir en el análisis costos de mano de obra y mantenimiento en el análisis. Además, se recomienda considerar los costos de realizar los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación para evaluar el costo total de producción de etanol a partir de las hojas y cogollos de la caña de azúcar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. En: Energy conversion and management. Turquía, No. 2, vol 52, 2010. p 861-862

BALLESTEROS, Ignacio, NEGRO, Ma José, OLIVA, José, CABAÑAS, Araceli, MANZANARES, Paloma y BALLESTEROS, Mercedes. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Madrid España, vol 129-132, 2006. p 496

BALLESTEROS, Ignacio, NEGRO, Ma José, OLIVA, Araceli, MANZANARES, Paloma y BALLESTEROS, Mercedes. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces Marxianus*. En: Process Biochemistry. España, vol 39, 2004. p 1843 - 1844

BALLESTEROS, Ignacio, NEGRO, Ma José, OLIVA, Araceli, MANZANARES, Paloma y BALLESTEROS, Mercedes. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. España, No 22, vol 98-100, 2002. p 719 - 729

BALLESTEROS, Ignacio, OLIVA, José, GONZALEZ, Alberto, CARRASCO, Jose Luis y BALLESTEROS, Mercedes. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Madrid España, vol 84 - 86, 2000. p 103 - 107

BARI, Isabella, VIOLA, Egidio, BARISANO, Donatella, NANNA, Francesco y BRACCIO, Giacobbe. Ethanol production at flask and pilot scale from concentrated slurries of steam-exploded Aspen. En: Industrial and Engineering Chemistry Research. Italia, No 7, vol 41, 2002. p 174 -1752

BOUSSAID, Abdel, ESTEGHLALIAN, Ali, GREGG, David, HO LEE, Keun y SADDLER, Jhon. Steam Pretreatment of Douglas-Fir Wood Chips. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Canadá, vol 84-86, 2000. p 693

CARA, Cristóbal, RUIZ, Encarnación, BALLESTEROS, Mercedes, MANZANARES, Paloma, NEGRO, M^a José y CASTRO, Eulogio. Production of fuel ethanol from steam explosion pretreated olive pruning. En: Enzyme and Microbial Technology. Madrid España, No. 2, vol 42, 2008. p 160-162

CENICAÑA: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia. Informe Anual 2011, Sección Producción de Caña y Azúcar. Santiago de Cali, 2012. p 136

CHIKAKO, Asada, CHIZURU, Sasaki, YOSHIHIRO, Uto, JUN, Sakafuji, YOSHITOSHI, Nakamura. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass. En: Biochemical Engineering Journal. Tokushima, Japan, 2011. p 28-29

DALE, Bruce, HENK Linda y SHIANG Ming, Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. En: Developments in Industrial Microbiology. Estados Unidos, vol 26, 1984. p 223-233.

DUFF, Sheldon y MURRAY, William. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. En: Bioresource Technology. Canadá, No 1, 1996. p 1-33

EGGEMAN, Tim y ELANDER, Richard. Process and economic analysis of pre-treatment technologies. En: Bioresource Technology. Estados Unidos, vol 96, 2005. p 2019-2025

FAN, Liang, GHARPURAY, Mahendra y LEE, Yong-Hyun (1987). Cellulose hydrolysis biotechnology monographs. En: Editor. Alemania, 1987. p 57

FARID, Talebnia, DIMITAR, Karakashev e IRINI, Angelidaki. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. En: Bioresource Technology. Dinamarca, vol 113, 2009. p 4745

FIGUEROA, Jersson y PARRA, Angela. Deslignificación Enzimática de Residuos de Cosecha de la Caña de Azúcar [Trabajo de grado]. Santiago de Cali: Universidad del Valle. Facultad de ingenierías. Escuela de Ingeniería Química; 2010. p 22-45

GAIL, Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. En: Analytical Chemistry. No 3, Vol 31, 1959. P 426-428

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. En: International Union of Pure and Applied Chemistry. Nueva Delhi, India, No. 2, vol 59, 1987. p 260

GÓMEZ C. Caracterización de los polisacáridos presentes en los residuos de cosecha (hojas y cogollos) de tres variedades (CC8475, CC 8592 y V7151) de caña de azúcar [Tesis de maestría]. Santiago de Cali: Universidad del Valle. Facultad de ingenierías. Escuela de Ingeniería Química; 2010. p 7-45

HOLTZAPPLE, Mark y HUMPHREY, Arthur. Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. En: Biotechnology and Bioengineering. Estados Unidos, vol 33, 1989. p 207-210.

KAAR W., GUTIERREZ C., y KINOSHITA C. Steam Explosion of Sugarcane Bagasse as a Pretreatment for Conversion to Ethanol. En: Biomass and Bioenergy. US, No. 3, vol 14, 1998. p 277-287

LASER, Mark, SCHULMAN, Deborah, ALLEN, Stephen, LICHWA, Josephh, ANTAL, Michael y LYND, Lee. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. En: Bioresource Technology. Estados unidos, vol 81, 2001, p 34 - 44

MARTÍN, Carlos, MARCET, Marcelo, THOMSEN, Anne. Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. En: Bioresources. Cuba, 2008. p 671

MILLET, Merilla, BAKER, Andrew y Scatter LD. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. En: Biotechnology and Bioengineering. Estados Unidos, vol 6, 1976. p 125–153

PERNALETE, Zoycris, PIÑA, Francibell, SUÁREZ, Madeleine, FERRER, Alexis y AIELLO, Cateryna. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga del amoniaco. En: Bioagro. Venezuela, No. 1, vol 20, 2008. p 4

RUIZ, Encarnación, CARA, Cristóbal, MANZANARES, Paloma, BALLESTEROS, Mercedes y CASTRO, Eulogio. Evaluation of steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. En: Enzyme and Microbial Technology. Madrid España, No. 2, vol 42, 2008. p 160-162

SALCEDO J. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha de caña de azúcar [Tesis de doctorado]. Sincelejo: Universidad de Sucre. Facultad de ingenierías. Ingeniería Química; 2011. p 185-187

SASSNER, Per, MARTENSSON, Carl, GALBE, Mats y ZACCHI, Guido. Steam pretreatment of H₂SO₄ impregnated Salix for the production of bioethanol. En: Bioresource Technology. Suecia, vol 99, 2006. p 137-145

SERGEY, Shevchenko, RODGER, Beatson y SADDLER, Jhon. The Nature of Lignin from Steam Explosion/ Enzymatic Hydrolysis of softwood. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Canadá, vol 77-79, 1999. p 867

SERNA, Liliana y RODRIGUEZ DE STOUVENEL, Aida. Residuos de caña de azúcar como sustrato en la producción fermentativa de ácido láctico. En: INCI. Venezuela, No. 5, vol 32, 2007. p 328-332

SODERSTROM, Johanna, PILCHER, Lina, GALBE, Mats y ZACCHI, Guido. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. En: Biomass and Bionergy. Suecia, vol 24, 2003. p 475- 480

STAT POINT. Statgraphics Centurion.v15.1.0.2.Incl.Keygen-SSG

SUN, Ye, CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. En: Bioresource Technology. Estados Unidos, vol 83, 2002. p 1- 6

Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Kappa number of pulp. T 236 om-99. Canada: TAPPI, 1999.

TORRES, Jorge y VILLEGAS, Fernando. Manejo y aprovechamiento de residuos de la cosecha en verde. Santiago de Cali: Serie técnica No 35 (Cenicaña), 2006.

VAN SOEST, Peter. Use of detergents in the Analysis of fibrous feeds I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. En: Journal of the AOAC. Estados Unidos, 1983. p 829 – 835

VARGA, Eniko, RÉCZEY, Kati y ZACCHI, Guido. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Hungría, vol 113-116, 2004. p 509

VIDAL, Pierre, y MOLINIER, Jacques. Ozonolysis of lignin, improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. En: Biomass. Francia, vol 16, 1988. p 1–17.

ZHAO, Xiu-Jian(2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. En: Applied Microbiology and Biotechnology.china, vol 82. p 815–827

ZHONG, Xu, QUNHUI, Wang, ZHAOHUA, Jiang, XUE-XING, Yang y YONGZHEN, Ji. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. En: Biomass and Bioenergy. China, vol 31, 2007. p 162 – 167

APÉNDICES

APÉNDICE A. RELACION ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE H_2SO_4 Y EL pH UTILIZADO EN LA SOLUCIÓN DE CATALIZADOR

Se estableció la relación entre los valores de pH utilizados en la experimentación y su correspondiente concentración de H_2SO_4 en porcentaje peso a peso (Tabla 8)

Tabla 8. Relación entre pH y concentración de ácido sulfúrico

pH de la solución	Concentración de H_2SO_4 % p/p
3,00	0,011
2,70	0,020
2,50	0,033
2,38	0,034
2,00	0,037
1,65	0,070
1,50	0,102
1,30	0,209
1,15	0,240
0,80	0,269
0,65	0,289

APÉNDICE B. CRECIMIENTO DE LA LEVADURA USADA EN LA FERMENTACIÓN DEL MATERIAL

Cultivo de la levadura utilizada en el proceso de fermentación del material hidrolizado.

Condiciones de crecimiento de la levadura:

Temperatura: 32°C

Agitación: 130 rpm

Tiempo: 12 horas

Concentración de peptona: 20g/l

Concentración de glucosa: 60g/l

Extracto de levadura: 10g/l

Buffer citrato: pH 4.8

Se realizó la curva de calibración de la concentración de la levadura en cultivo en función de la absorbancia. Esto se hace para determinar la cantidad de levadura que se debe agregar al medio de fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 9 y Figura 12.

Tabla 9. Curva de calibración para la levadura

<i>Absorbancia</i>	<i>Concentración de levadura g/l</i>
0,131	0,065
0,223	0,116
0,317	0,194
0,432	0,258
0,464	0,291
0,597	0,387
0,707	0,465
0,771	0,581
1,228	1,162
1,757	1,743
2,245	5,810
2,475	11,620
2,585	17,430
2,651	23,240
2,705	29,050

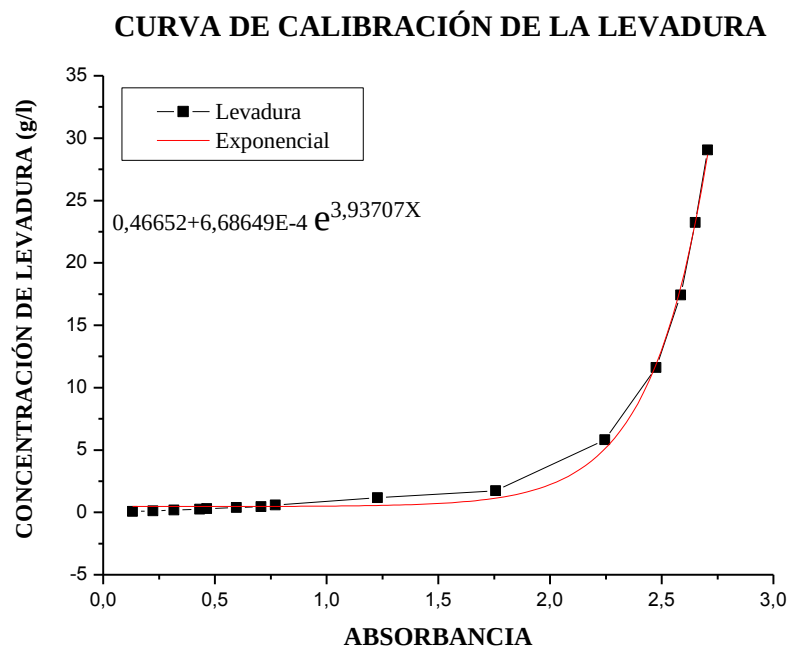


Figura 12 Curva de calibración de la levadura

APÉNDICE C. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL MATERIAL

Resultados para el análisis del material usando las metodologías del número Kappa y Van Soest. Para el número Kappa, los resultados se muestran en la Tabla 10 y Tabla 11

Tabla 10. Resultados Número Kappa para el análisis granulométrico de fibra sin tratamiento

Malla	Humedad %	Peso seco G	Tiosulfato ml	Permanganato ml	Factor de Corrección	No. Kappa
(9-10) ¹	12,07	0,8793	35,80	34,00	0,966	37,8505
(10-20)	12,04	0,8796	34,10	37,40	0,973	38,4282
(20-30)	11,85	0,8815	36,60	32,40	0,963	35,3960
(30-40)	11,54	0,8846	34,60	36,40	0,971	39,9675
(40-60)	11,54	0,8846	27,60	50,40	1,001	57,3944
Blanco ²				52,80		

Tamaño de la muestra: 1 g. Temperatura del análisis: 24°C

¹La nomenclatura empleada hace referencia al material pasante y retenido en los tamices normalizados. Así (9-10) considera el material pasante malla 9 y retenido en malla 10.

²Blanco en el número Kappa: es la medición que se hace sin material lignocelulósico y que se utiliza como referencia para los cálculos.

Tabla 11. Resultados Número Kappa para el análisis granulométrico de la fibra deslignificada

Malla	Humedad %	Peso seco G	Tiosulfato ml	Permanganato ml	Factor de corrección	No. Kappa
(9-10)	6,42	0,9358	8,70	88,20	1,085	103,6146
(10-20)	6,32	0,9368	12,90	79,80	1,066	90,2065
(20-30)	6,35	0,9365	21,30	63,00	1,028	69,6204
(30-40)	5,77	0,9423	16,90	71,80	1,048	80,8758
(40-60)	5,76	0,9424	12,70	80,20	1,067	91,9675
Blanco				52,80		

Tamaño de la muestra: 1 g. Temperatura del análisis: 24°C

Los resultados obtenidos con el análisis de Van Soest se muestran en la Tabla 12 y Tabla 13.

Tabla 12. Resultados análisis Van Soest para la fibra sin tratamiento

Malla	Cantidad	Humedad	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas
	g	%	%	%	%	%	G	g	g	g
(9-10)	27,54	12,07	31,87	53,30	13,99	0,5	7,72	12,91	3,39	0,12
(10-20)	34,35	12,04	34,55	47,62	10,89	3,24	10,44	14,39	3,29	0,98
(20-30)	14,64	11,85	32,46	47,58	12,08	3,25	4,19	6,14	1,56	0,42
(30-40)	13,77	11,54	33,43	47,00	11,44	3,46	4,07	5,72	1,39	0,42
(40-60)	7,54	11,54	33,03	43,97	10,87	3,98	2,20	2,93	0,72	0,27
(60-fondo)	2,17	12,22	33,63	36,87	10,07	4,00	0,64	0,70	0,19	0,08
Total	100,00						29,26	42,79	10,55	2,29

Tabla 13. Resultados análisis Van Soest para la fibra deslignificada

Malla	Cantidad	Humedad	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas
	g	%	%	%	%	%	g	g	g	g
(9-10)	12,00	6,42	0,24	64,71	21,43	2,48	0,03	7,27	2,41	0,28
(10-20)	17,60	6,32	0,64	57,31	22,31	4,63	0,11	9,45	3,68	0,76
(20-30)	8,70	6,35	0,86	54,94	22,37	5,17	0,07	4,48	1,82	0,42
(30-40)	9,90	5,77	1,45	52,35	22,99	6,37	0,14	4,88	2,15	0,59
(40-60)	7,60	5,76	3,19	48,67	21,70	7,02	0,23	3,49	1,55	0,50
(60-fondo)	5,00	5,49	1,65	37,76	24,35	14,35	0,08	1,78	1,15	0,68
Total	60,80						0,64	31,35	12,76	3,24

Coeficientes de distribución y selectividades determinadas para el análisis del tamaño de partícula del proceso (Tabla 14, Tabla 15)

Tabla 14. Coeficientes de distribución para el análisis del tamaño de partícula

Mallas	Lignina	Hemicelulosa	Celulosa
(9-10) ¹	1,53	0,01	1,21
(10-20)	2,05	0,02	1,20
(20-30)	1,85	0,03	1,15
(30-40)	2,01	0,04	1,11
(40-60)	2,00	0,10	1,11
(60-fondos)	2,42	0,05	1,02

Tabla 15. Análisis de la selectividad para el tamaño de partícula

Mallas	Celulosa/lignina	Hemicelulosa/lignina	Celulosa/hemicelulosa
(9-10)	0,793	0,005	164,612
(10-20)	0,588	0,009	64,930
(20-30)	0,624	0,014	43,343
(30-40)	0,554	0,022	25,607
(40-60)	0,555	0,048	11,451
(60-fondos)	0,424	0,020	20,864

APÉNDICE D. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DESLIGNIFICACIÓN

Resultados para el análisis del material usando las metodologías del número Kappa y Van Soest. Los resultados se muestran en la Tabla 16 Y Tabla 17

Tabla 16. Resultados análisis Número Kappa para la determinación del tiempo de deslignificación.

Tiempo de proceso min	Humedad %	Peso seco g	Tiosulfato ml	Permanganato ml	Factor de Corrección	No. Kappa
Fibra lignificada	7,91	0,9208	31,90	43,80	0,987	47,5497
0,5	5,12	0,9489	11,30	85,00	1,078	97,8094
1	5,18	0,9482	9,20	89,20	1,088	103,6451
2	4,57	0,9544	14,20	79,20	1,065	89,4917
5	5,05	0,9495	15,00	77,60	1,061	87,8303
10	5,51	0,9449	13,80	80,00	1,066	91,4534
15	5,06	0,9494	14,50	78,60	1,063	89,1631
Blanco			53,80			

Tamaño de la muestra: 1 gramo. Temperatura del análisis: 24°C

Tabla 17. Prueba Van Soest para la fibra deslignificada a diferentes tiempos.

Tiempo de proceso min	Cantidad (g)	Humedad %	Hemicelulosa %	Celulosa %	Lignina %	Cenizas %	Hemicelulosa g	Celulosa g	Lignina g	Cenizas g
0,5	62,10	5,12	3,32	59,90	19,30	4,57	1,96	35,30	11,37	2,70
1	59,20	5,18	1,95	61,44	20,34	5,19	1,09	34,49	11,42	2,91
2	55,10	4,57	1,02	61,01	21,30	5,13	0,53	32,08	11,20	2,70
5	56,40	5,05	0,24	60,86	22,26	5,50	0,13	32,59	11,92	2,94
10	55,50	5,51	0,16	62,22	22,62	5,97	0,08	32,63	11,86	3,13
15	54,20	5,06	0,11	60,89	22,27	5,50	0,05	31,33	11,46	2,83
Fibra lignificada	100,00	7,92	33,16	46,54	11,56	3,61	30,53	42,85	10,64	3,32

Coeficientes de distribución y selectividades determinadas para el análisis del tiempo del proceso (Tabla 18, Tabla 19)

Tabla 18. Coeficientes de distribución para el análisis del tiempo

Tiempo	Lignina	Hemicelulosa	Celulosa
0,5	1,67	0,100	1,29
1	1,76	0,059	1,32
2	1,84	0,031	1,31
5	1,93	0,007	1,31
10	1,96	0,005	1,34
15	1,93	0,003	1,31

Tabla 19. Análisis de la selectividad para la determinación del tiempo

Tiempo	Celulosa/lignina	Hemicelulosa/lignina	Celulosa/hemicelulosa
0,5	0,77	0,060	12,86
1	0,75	0,033	22,44
2	0,71	0,017	42,78
5	0,68	0,004	179,02
10	0,68	0,002	279,30
15	0,68	0,002	411,97

APÉNDICE E. DETERMINACIÓN DE LA SIGNIFICANCIA DE LAS VARIABLES EN EL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN

Los resultados obtenidos de la deslignificación del material para establecer la significancia de las variables en el proceso se muestran en la Tabla 20

Tabla 20. Resultados hidrólisis enzimática del material deslignificado para 100g de muestra
con 11,8% de humedad inicial

Prueba	Cantidad final (g)	Humedad %	Pérdida en peso (g)	Azúcar g/l	Sacarificación ¹ %
SD ²			88,2	19,20	17,2
1	69,9	5,59	22,21	58,00	52,2
2	66,5	5,22	25,17	64,00	57,6
3	89,0	9,59	7,73	41,50	37,3
4	64,9	6,79	27,70	86,80	78,1
5	89,1	4,17	2,82	23,30	21,0
6	62,6	4,28	28,28	94,70	85,2
7	83,7	3,79	7,67	40,90	36,8
8	90,7	9,22	5,86	35,60	32,0
9	98,3	13,87	3,54	25,20	22,7
10	95,8	10,49	2,45	33,00	29,7
11	102,2	18,53	4,94	40,90	36,8
12	61,2	5,88	30,60	70,30	63,3
13	86,7	6,94	7,51	23,80	21,5
14	83	7,14	11,12	48,10	43,3
15	84,3	6,56	9,43	45,00	40,5
16	81,5	6,73	12,18	36,00	32,9
17	76,1	5,76	16,48	43,30	39,0

¹Porcentaje de Sacarificación: Indicador de la conversión de la hidrólisis enzimática.

²SD: Material Sin Deslignificar. Fibra sin pretratamiento

Se analizó la significancia de las variables mediante Diagramas de Pareto y gráficos de Efectos principales del programa Statgraphics. Los resultados se muestran en la Figura 13

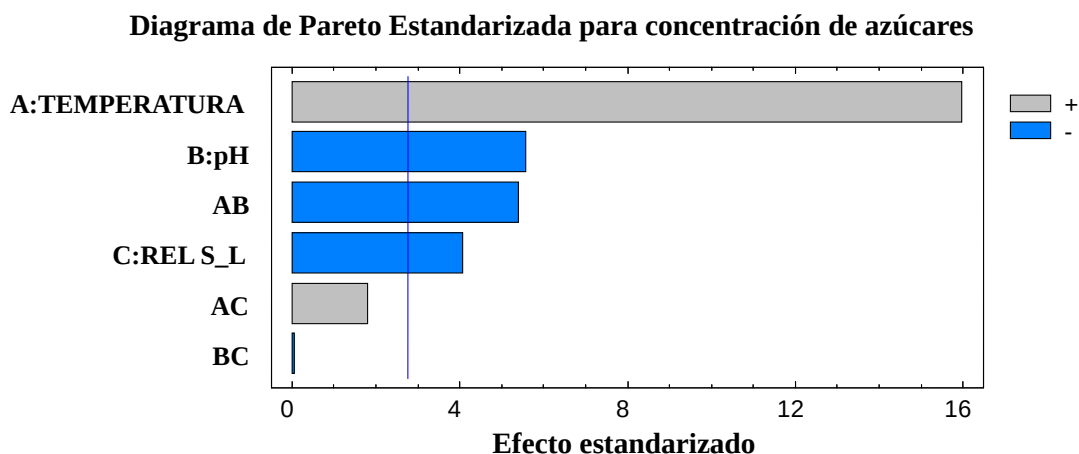


Figura 13. Diagrama de Pareto estandarizado de la concentración de azúcares reductores

Se evaluó el análisis de varianza para determinar el nivel de confianza de los resultados. Se muestra el análisis para la determinación de la significancia de las variables (Tabla 21)

Tabla 21 Análisis de Varianza para la Concentración de Azúcares

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	990,125	1	990,125	255,41	0,0001
B:pH	120,125	1	120,125	30,99	0,0051
C:Rel_S_L	63,845	1	63,845	16,47	0,0154
AB	114,005	1	114,005	29,41	0,0056
AC	13,005	1	13,005	3,35	0,1410
BC	0,005	1	0,005	0,00	0,9731
Error total	15,5064	4	3,87659		
Total (corr.)	1316,62	10			

Datos estadísticos:

R-cuadrada = 98,8223%

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,0556%

Error estándar del est. = 1,96891

Error absoluto medio = 0,935537

Estadístico Durbin-Watson = 2,36258 (P=0,7775)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,266877

El análisis de varianza permite establecer la variabilidad de la *concentración de azúcares reductores* para cada uno de los efectos y evalúa la significancia estadística de cada efecto comparándolo con su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, el efecto de la Temperatura, pH, relación s/l y la interacción de los factores Temperatura*pH tienen una *valor-P* menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%.

El estadístico *R-Cuadrada* indica que el modelo explica 98,82% de la variabilidad de la *concentración de azúcares reductores*. El estadístico *R-cuadrada ajustada*, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 97,05%. *El error estándar del estimado* muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,968. *El error medio absoluto (MAE)* de 0,935 es el valor promedio de los residuos.

Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

APÉNDICE F. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA EL PROCESO

Análisis de varianza (ANOVA) para la regresión que relaciona las variables independientes y la interacción de los efectos significativos del proceso (Ecuación 2). Los resultados se muestran en la Tabla 22

Tabla 22. Análisis de varianza para la ecuación del modelo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,04056	5	0,208113	16,73	0,0001
Residuo	0,136818	11	0,012438		
Total (Corr.)	1,17738	16			

R-cuadrada = 88,3963%

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 83,1219%

Error estándar del est. = 0,11139

Error absoluto medio = 0,0763991

Estadístico Durbin-Watson = 1,82203 (P=0,4078)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,0133331

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95%.

La Figura 14 muestra la superficie de respuesta de la Ecuación 2

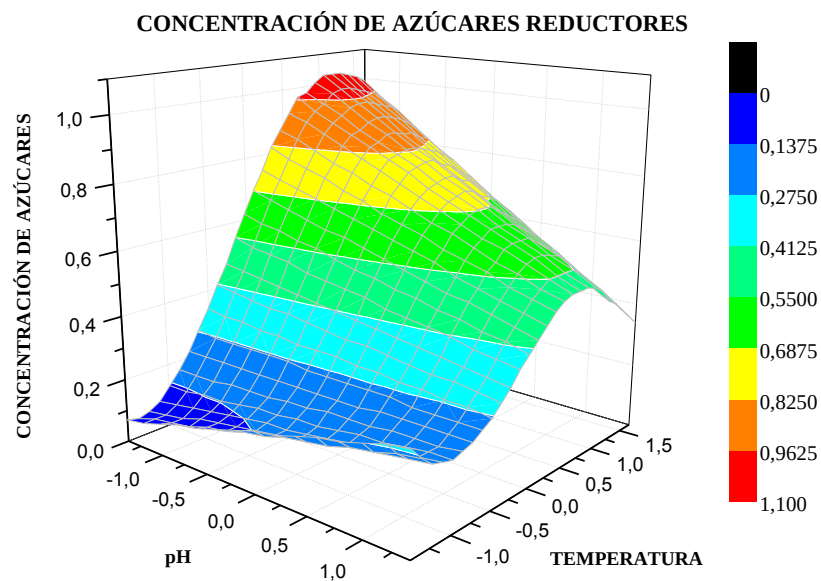


Figura 14 Superficie de respuesta correspondiente a la Ecuación 2. Intervalo de temperatura de 159 a 201°C

Los resultados de la experimentación para determinar las condiciones adecuadas para el proceso se muestran en la Tabla 23

Tabla 23. Resultados hidrólisis enzimática con el nuevo intervalo de valores para el tratamiento de 100 g de muestra con 11,8% de humedad.

Prueba	Cantidad final (g)	Humedad %	Pérdida en peso (g)	Azúcar g/l	Sacarificación %
SD			88,2	19,20	17,2
1	56,1	3,465	34,0	46,3	41,6
2	61,8	2,903	28,2	49,2	44,3
3	57,3	3,154	32,7	59,0	53,1
4	56,5	3,378	33,6	53,9	48,5
5	68,9	6,559	23,8	71,3	64,2
6	48,1	3,448	41,8	58,7	52,8
7	65,9	9,072	28,3	58,8	52,9
8	58,5	3,441	31,7	69,5	61,0
9	46,9	2,434	42,4	68,3	61,5
10	62,9	4,392	28,1	67,7	61,0
11	53,1	3,149	36,8	58,2	52,3
12	41,2	2,57	48,1	46,0	41,4
13	64,8	3,616	25,7	70,3	63,2
14	40	3,181	49,5	46,0	41,4
15	60,6	4,138	30,1	63,9	57,5
16	60,2	4,665	30,8	57,3	51,6
17	56,2	5,437	35,1	59,2	53,3

Análisis de varianza de la Ecuación 3 (Tabla 24)

Tabla 24. Análisis de Varianza para la Ecuación 3

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,3398	7	0,1914	11,49	0,0000
Residuo	0,433014	26	0,0166544		
Total (Corr.)	1,77281	33			

R-cuadrada = 85,5747 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 78,9987 %

Error estándar del est. = 0,129052

Error absoluto medio = 0,0825142

Estadístico Durbin-Watson = 1,36292 (P=0,0123)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,304085

Resultados estandarizados para la variable *concentración de azúcares reductores* en el intervalo de temperatura [198 - 212] °C (Figura 15)

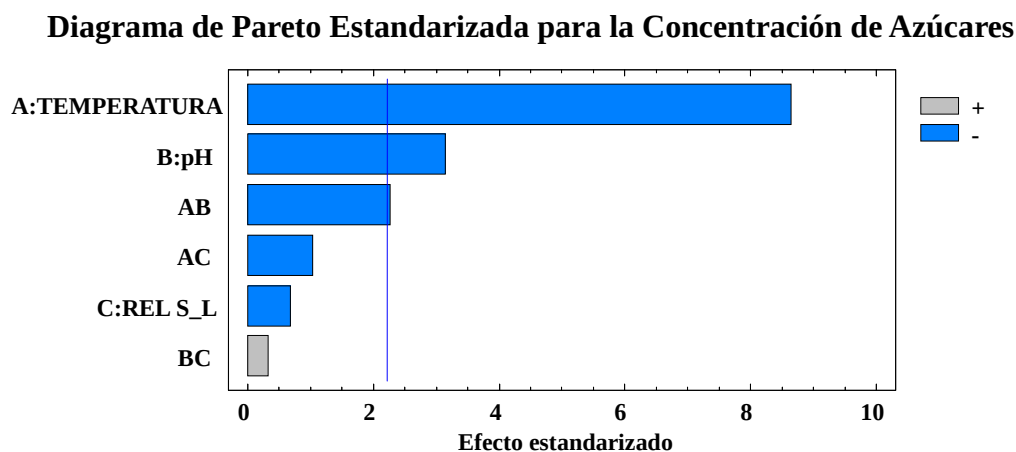


Figura 15. Diagrama de Pareto para la concentración de azúcares. Intervalo de temperatura de 198 a 212°C

Análisis de varianza para la variable estandarizada *concentración de azúcares reductores* (Tabla 25)

Tabla 25. Análisis de Varianza para la concentración de azúcares

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TEMPERATURA	1,38326	1	1,38326	74,70	0,0000
B:pH	0,182866	1	0,182866	9,87	0,0105
C:REL S_L	0,00846223	1	0,00846223	0,46	0,5144
AB	0,095048	1	0,095048	5,13	0,0469
AC	0,0198005	1	0,0198005	1,07	0,3255
BC	0,001922	1	0,001922	0,10	0,7540
Error total	0,185186	10	0,0185186		
Total (corr.)	1,87654	16			

R-cuadrada = 90,1316 %

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 84,2105 %

Error estándar del est. = 0,136083

Error absoluto medio = 0,0616738

Estadístico Durbin-Watson = 1,66181 (P=0,3168)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,121371

Resultados estandarizados para la variable *concentración de azúcares reductores* en el intervalo de temperatura [159 - 212] °C (Figura 16) y su análisis de varianza (Tabla 26)

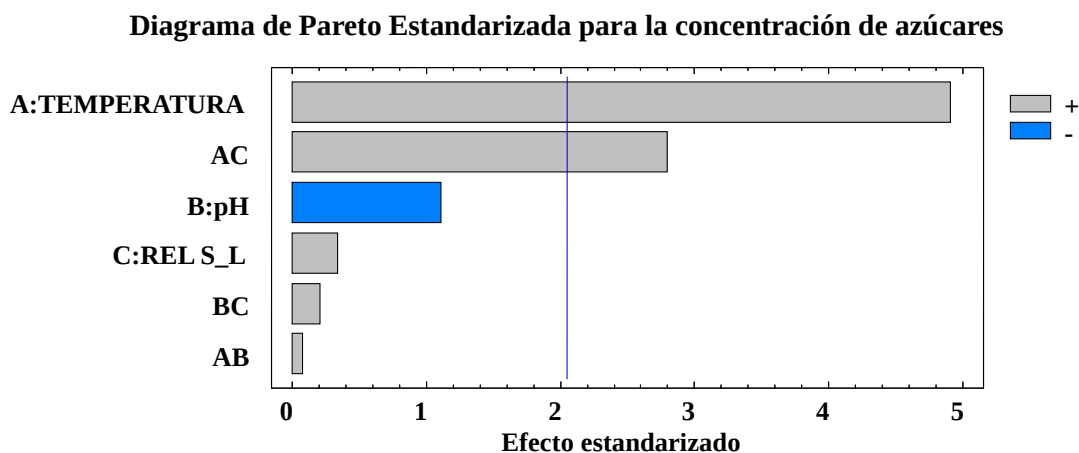


Figura 16. Diagrama de Pareto para la concentración de los azúcares reductores

Tabla 26 Análisis de Varianza para la variable concentración de azucares

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TEMPERATURA	0,687272	1	0,687272	24,05	0,0000
B:pH	0,0350382	1	0,0350382	1,23	0,2779
C:REL S_L	0,00332661	1	0,00332661	0,12	0,7356
AB	0,00017694	1	0,00017694	0,01	0,9379
AC	0,223647	1	0,223647	7,83	0,0094
BC	0,00125392	1	0,00125392	0,04	0,8356
Error total	0,771517	27	0,0285747		
Total (corr.)	2,07902	33			

R-cuadrada = 87,8910 %

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 81,6438 %

Error estándar del est. = 0,169041

Error absoluto medio = 0,119655

Estadístico Durbin-Watson = 1,05719 (P=0,0014)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,460334

Superficie de respuesta obtenida al graficar la Ecuación 3 considerando la relación sólido/líquido de 40g/l. Los resultados se muestran en la Figura 17

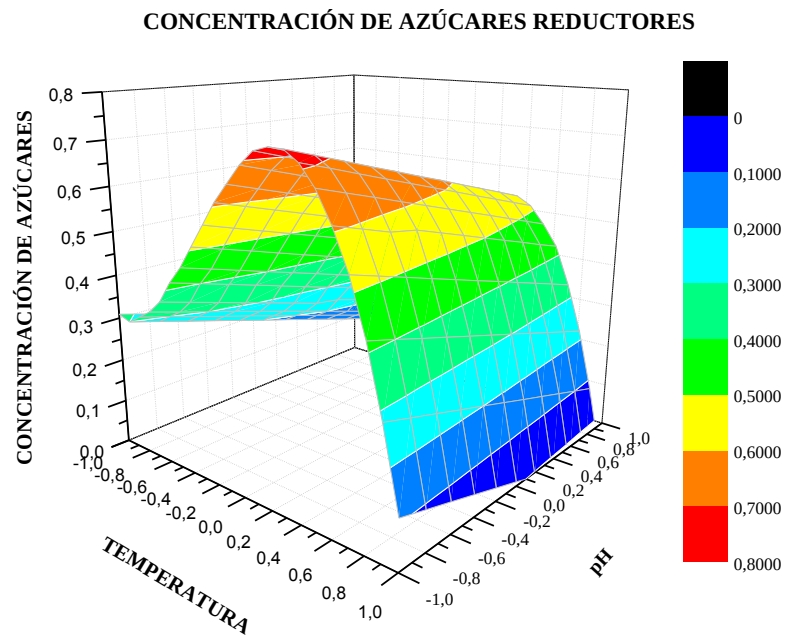


Figura 17. Superficie de respuesta de la concentración de azúcares reductores en todo el intervalo de temperatura.

Los resultados de la experimentación para la validación del tiempo de deslignificación a las condiciones adecuadas del proceso se muestran en la Tabla 27

Tabla 27. Hidrólisis enzimática de la deslignificación a diferentes tiempos de deslignificación

Tiempo de proceso (s)	Cantidad final (g)	Humedad %	Pérdida en peso (g)	Azúcar g/l	Sacarificación %
0	64,3	2,571	25,6	52,4	47,1
10	65,2	4,523	25,9	49,3	44,4
30	66,4	6,534	26,1	45,5	40,9
60	60,3	2,128	29,2	49,4	44,5
120	54,9	2,263	34,5	56,0	50,4

Tamaño de la muestra: 100 gramos. Humedad: 11,8%

APÉNDICE G. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN

Resultados de la deslignificación de 100 g de material con 11,8% de humedad a las condiciones adecuadas del proceso. (Tabla 28).

Tabla 28 Hidrólisis enzimática del material deslignificado a las condiciones adecuadas.

Prueba	Cantidad inicial (g)	Humedad %	Cantidad final (g)	Humedad %	Pérdida en peso (g)	Azúcar g/l	Sacarificación %
1	100	11,8	64,3	2,571	25,6	48,2	43,4
1'	100	11,8	65,2	4,523	25,9	47,7	42,9

1' corresponde al duplicado de la prueba 1

Resultados de la fermentación del material hidrolizado (Tabla 29)

Tabla 29. Concentración de azúcares al final de la fermentación

<i>Prueba</i>	<i>Volumen de hidrolizado</i>	<i>Concentración de Azúcares</i>	<i>Sacarificación</i>
	<i>ml</i>	<i>g/l</i>	<i>%</i>
1	250	2,01	1,86
1'	250	2,04	1,84

APÉNDICE H. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE COMPONENTES

Los resultados de la concentración de lignina en la materia prima, material deslignificado e hidrolizado se muestran en la Tabla 30

Tabla 30. Análisis de la lignina presente en el material en cada etapa del proceso

<i>Muestras</i>	<i>Lignina Acido Insoluble (AIL)</i>	<i>Lignina Acido Soluble (ASL)</i>	<i>Lignina libre de extractivos</i>
	%	%	%
1	11,70	6,89	18,59
1'	11,30	7,10	18,40
2	23,50	5,20	28,70
2'	24,70	5,05	29,75
3	24,20	5,10	29,30
3'	24,63	4,94	29,57
4	39,23	5,04	44,27
4'	38,78	5,80	44,58
5	40,30	6,26	46,56
5'	39,85	6,12	45,97

La Tabla 31 muestra los resultados de la concentración (mg/ml) de azúcares en cada etapa del proceso obtenidas por medición de los hidrolizados de cada muestra por HPLC. Se incluyó el análisis de la concentración de etanol en el material fermentado con su respectiva réplica (muestras F y F'). El resultado se reporta en %v/v y se refiere al volumen de etanol presente en el volumen total de fermentado. Para la determinación de la fracción de cada componente en las muestras se consideraron las siguientes condiciones:

- Volumen: 86,73 ml (solución para la hidrólisis en el método de ***“Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass”***)
- Masa: 300 mg de materia prima seca

Tabla 31. Concentración de azúcares medidos por HPLC

<i>Muestras</i>	<i>Glucosa</i>		<i>Xilosa</i>		<i>Galactosa</i>		<i>Arabinosa</i>		<i>Manosa</i>		<i>Etanol</i>
	<i>mg/ml</i>	<i>%</i>	<i>mg/ml</i>	<i>%</i>	<i>mg/ml</i>	<i>%</i>	<i>mg/ml</i>	<i>%</i>	<i>mg/ml</i>	<i>%</i>	
1	1,584	45,79	0,789	22,81	0,075	2,17	0,203	5,87	0,065	1,88	0,000
1'	1,591	46,00	0,795	22,98	0,080	2,31	0,195	5,64	0,058	1,68	0,000
2	1,815	52,47	0,210	6,07	0,004	0,12	0,023	0,66	0,007	0,20	0,000
2'	1,814	52,44	0,209	6,04	0,005	0,14	0,021	0,61	0,008	0,23	0,000
3	1,819	52,59	0,214	6,19	0,003	0,09	0,022	0,64	0,006	0,17	0,000
3'	1,809	52,30	0,200	5,78	0,002	0,06	0,021	0,61	0,006	0,17	0,000
4	0,476	13,76	0,039	1,13	0,001	0,03	0,004	0,12	0,002	0,06	0,000
4'	0,512	14,80	0,044	1,27	0,002	0,06	0,004	0,12	0,001	0,03	0,000
5	0,482	13,93	0,041	1,19	0,003	0,09	0,005	0,14	0,003	0,09	0,000
5'	0,501	14,48	0,043	1,24	0,002	0,06	0,003	0,09	0,002	0,06	0,000
F	0,017	0,49	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	2,300
F'	0,019	0,53	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	0,000	0,00	2,500

¹ La concentración de etanol está dada en %v/v y se refiere al volumen de etanol presente en el volumen total fermentado.