

INTENSIFICACIÓN DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Darío Domínguez García (1), Héctor Hernández Escoto (2)

1 [Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [dario_domgar@hotmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [hhee@mel.com]

Resumen

Buscando la obtención de una concentración mayor de azúcares reductores empleados en el proceso de fermentación para producir bioetanol de segunda generación se efectuó la evaluación de un proceso de hidrólisis enzimática de material lignocelulósico, la paja proveniente como residuo agrícola, posterior al diseño del proceso a nivel microreacción con enzima novozyme en un reactor de un volumen de medio litro. Se exploraron dos escenarios de dosificación de la paja siendo el primero de ellos poner toda la paja desde un inicio y monitorear la producción de azúcares reductores mediante técnica de Miller (DNS) a lo largo de 8 horas (hidrólisis enzimática convencional); el segundo de ellos fue dosificar al reactor cada determinado tiempo una cierta cantidad de paja. Como resultados se obtuvo que a manera de operabilidad es mejor dosificar la paja cada determinado tiempo, pues se favorece la agitación en el reactor y hay homogeneidad de temperatura y pH a lo largo del proceso además de lograr alto rendimiento en comparación con la manera convencional en un periodo más corto de tiempo. Se da pauta a seguir estudiando y mejorando éste método nuevo de dosificación y operación en la hidrólisis enzimática a mayores concentraciones.

Abstract

In order to achieve a higher concentration of reducing sugars employees in the process of fermentation to produce second-generation bioethanol an evaluation of a process of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material (straw as agricultural waste) was performed after to a process design in micro reaction level, with enzyme novozyme in a reactor of a volume of half a liter. Two scenarios of dosage of the straw were explored: the first of them involved all the straw in one load for the reactor and the production of reducing sugars was monitored using Miller's technique (DNS) over 8 hours (conventional enzymatic hydrolysis); the second of them was dose to the reactor each time a certain amount of straw. As results were obtained that the operability is better dosing the straw each time, since it favors the agitation in the reactor and there is a homogeneity of temperature and pH throughout the hole process in addition to achieve high performance in comparison with the conventional way in a shorter period of time. It gives guidelines to continue studying and improving this new method of dosing and operation in the enzymatic hydrolysis at higher concentrations.

Palabras Clave

Biomasa lignocelulósica; hidrólisis enzimática; dosificación; operabilidad de proceso; evaluación de bioprocesos

INTRODUCCIÓN

La bioenergía es una de las fuentes de energía renovables que puede reemplazar en parte el uso de los combustibles fósiles. Contribuye a la diversificación de la energía de los países y a la apropiación de tecnologías de energías emergentes, reduciendo las emisiones de gas invernadero, la generación de empleo en el área rural y la sustitución de la importación de combustibles (Islas et al., 2006). La agencia internacional de energía (IEA, por sus siglas en inglés) sugiere que a partir de la biomasa se puede obtener cerca de un tercio de la energía necesaria en África, Asia y Latinoamérica (Somerville, 2007). El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa [1].

Las mejoras en el aprovechamiento de la biomasa como materia prima requieren un gran esfuerzo para desarrollar nuevos sistemas de producción en el que las etapas de cultivo, transformación y aprovechamiento de los productos se lleven a cabo de manera eficiente con bajos impactos. Sin embargo, el éxito depende de hasta qué punto es posible cambiar de forma gradual la producción actual de bienes y servicios de los combustibles fósiles por materias primas de origen biológico. En la actualidad, las fuentes de energía derivadas de la biomasa suministran, a nivel mundial, 50 EJ (lo que representa el 10% del consumo anual de energía primaria mundial y el 75% de la energía derivada de fuentes alternativas de energía renovable) de la energía utilizada en el mundo. Por otro lado, se espera que la energía derivada de la biomasa pueda aportar 1,500 EJ en el año 2050. En este momento, sólo el 2% de las fuentes de energía derivadas de la biomasa son utilizadas en el sector de transportes, mientras que el resto es generalmente utilizado para usos domésticos. Combustibles de transporte derivados de la biomasa (biocombustibles), se pueden producir utilizando cultivos agrícolas convencionales que también pueden ser usados en la producción de alimentos (tecnologías de conversión de primera generación), cultivos lignocelulósicos y desechos agrícolas no utilizados (tecnologías de conversión

de segunda generación) u organismos microscópicos (tecnologías de conversión de tercera generación) [2].

Este trabajo se centra en el estudio de la producción de bioetanol de segunda generación a partir de la paja (residuo agrícola). Si bien estos residuos agroindustriales son abundantes, su uso es complejo pues primero se necesita sacarificar la materia prima, es decir, liberar carbohidratos simples como la glucosa de estructuras complejas como la lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina), para que éstos puedan ser aprovechables en el proceso de fermentación que produce el etanol [3]. He aquí que radica la importancia de la hidrólisis enzimática, etapa en la cual se centra este trabajo, pues la optimización de este proceso, su estudio bioquímico y su implementación biotecnológica están actualmente en la frontera de la investigación moderna. Actualmente llevar a cabo procesos de hidrólisis enzimática con alto contenido de sólidos como el 15% o el 20% es difícil y en muchas ocasiones cuando se efectúan los rendimientos no son tan altos en comparación con aquellas hidrólisis que se llevan a cabo a concentraciones menores [4]. Por eso la idea de efectuar este estudio y lograr implementar un procedimiento de intensificación en los procesos de hidrólisis a fin de lograr cargar más sustrato (paja) y tener altas concentraciones, con el objetivo de que esas altas concentraciones mejoren la etapa siguiente de fermentación en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de realizar una comparación entre dos maneras distintas de llevar a cabo un proceso de hidrólisis enzimática y ver cuál de ellas es mejor en cuanto a la cantidad de azúcares reductores producidos y en las implicaciones técnicas de operabilidad se procedió primero con realizar experimentos a microreacción a fin de determinar las condiciones óptimas de temperatura, pH y carga enzimática a utilizar en ambos procesos de hidrólisis; posteriormente se efectuaron los experimentos de hidrólisis, tanto de forma convencional como de forma que se propone para intensificarlo; finalmente, se llevan a cabo las técnicas de medición de azúcares

reductores y se realiza la comparación entre ambos tipos de procesos de hidrólisis enzimática.

Determinación de condiciones óptimas de operación

La paja proporcionada por agricultores del estado de Guanajuato fue tamizada a fin de eliminar las partículas de suciedad y evitar que interfieran más adelante en el proceso. Una vez libre de suciedad, la paja se molió hasta que el tamaño de partícula oscilara entre 250 y 500 micras. Cuando la paja se encontró limpia y de ese tamaño de partícula se sometió a un proceso de deslignificación alcalino oxidativo que incluía un lavado posterior para ajustar el pH de la paja deslignificada. Se efectuaron experimentos para explorar 3 diferentes condiciones de temperatura para la hidrólisis: 45, 50 y 55 °C; a su vez, en cada temperatura se exploraron 3 diferentes valores de pH: 4, 4.5 y 5; a su vez en cada escenario se varió la carga enzimática utilizada que, para una masa de paja en peso seco de 0.015 gramos, fue de: 1.5, 3.5, 5.5 y 7.5 microlitros de enzima. Se efectuaron en total 36 experimentos para cumplir las combinaciones anteriores. Los materiales utilizados en esta etapa fueron: parrilla con agitación, agitador magnético, material de vidrio, termobalance AND MF-50, microtubos, centrífuga para microtubos Corning, termomixer comfort® (en donde se efectuaron las microreacciones) y medidor de glucosa y xilosa YSI.

Los datos obtenidos de producción de azúcares en cada uno de los diferentes 36 escenarios se procesaron en el programa de cómputo estadístico Minitab, con el cual se obtuvieron las condiciones de temperatura, pH y carga enzimática óptimas (aquellas que lograron mayor rendimiento en las microreacciones).

Hidrólisis enzimática convencional

Se llevó a cabo a una concentración de 5% w/v en un reactor Corning de 0.5 L por lo que se midió la cantidad de humedad presente en la paja deslignificada y se calculó utilizar 25 gramos en peso seco de ésta. Se montó el reactor sobre una

parrilla con agitación y termopar para control de temperatura y se acondicionó un sistema de agitación mecánica de aspas al reactor con un motor Heidolph. La manera convencional consistió en cargar el agua correspondiente al reactor, adicionar la cantidad de paja calculada y acondicionar esta mezcla a las condiciones de temperatura y pH encontradas en el proceso anterior; posteriormente se adicionó la cantidad de enzima correspondiente a la carga enzimática óptima encontrada en el paso anterior. Se tomó muestra del reactor cada hora, en un plazo de 8 horas, se midieron azúcares reductores con la técnica de Miller (DNS), se calculó el rendimiento en cada uno de los lapsos de tiempo en donde se muestreó y se creó una trayectoria tiempo contra producción de azúcares y contra rendimiento.

Hidrólisis enzimática intensificada con el método propuesto

En primera instancia se realizaron los mismo pasos que en la hidrólisis convencional, la diferencia radicó en que cantidad de paja incluso mucho mayor que la calculada para el 5% w/v no se cargó en su totalidad desde un inicio del proceso sino que se dosificó al reactor en lapsos de tiempo, muestreando el sistema en cada adición, midiendo los azúcares producidos por la técnica de Miller (DNS) y creando una trayectoria tiempo contra producción de azúcares y contra rendimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de condiciones óptimas de operación

En la imagen 1 se muestra el resultado de ejecutar los resultados de los experimentos en el software Minitab que muestran las condiciones de operación óptimas, resultando éstas:

- Temperatura: 52.37 °C
- pH: 4.0

- Carga enzimática: 7.5 µL

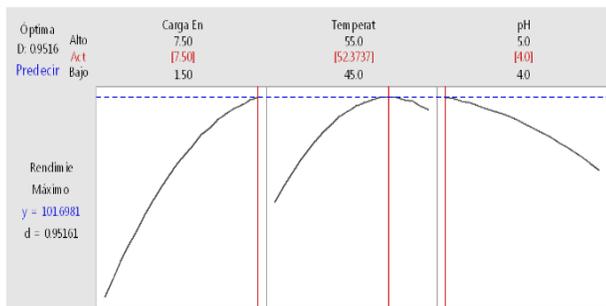


IMAGEN 1: Interfaz del programa computacional de estadística Minitab que muestra límites inferiores y superiores de las 3 variables, así como el valor óptimo de cada una de ellas.

Hidrólisis enzimática convencional

En la imagen 2 se muestra la trayectoria de proceso para el caso de ésta hidrólisis y se observa que se obtiene un máximo rendimiento de a las 4 horas de haberse puesto en operación el sistema, produciéndose 15.3401 gramos de azúcares reductores lo cual representa un 61.36% de rendimiento comparado con la masa total de paja seca cargada al reactor.

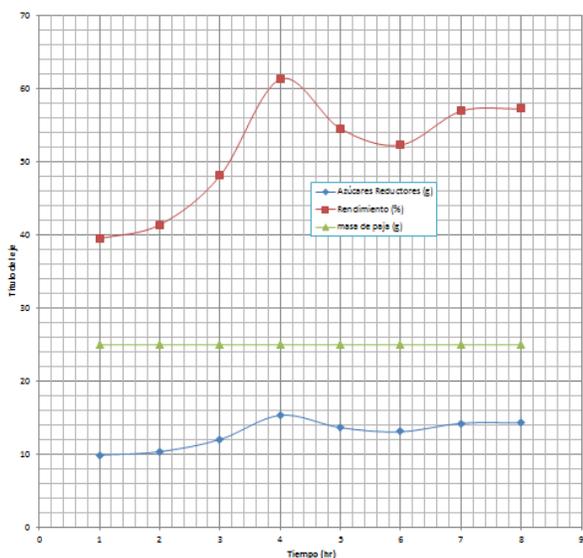


IMAGEN 2: Trayectoria de proceso para la hidrólisis convencional mostrando la variación de masa de azúcares reductores producidos y porcentaje de rendimiento respecto al tiempo.

Hidrólisis enzimática intensificada con el método propuesto

En la imagen 3 se muestra la trayectoria de proceso para la hidrólisis intensificada, mostrando que se obtiene un rendimiento máximo de 68.13% a las 2.1 horas de operación produciéndose un total de azúcares reductores de 23.84 gramos.

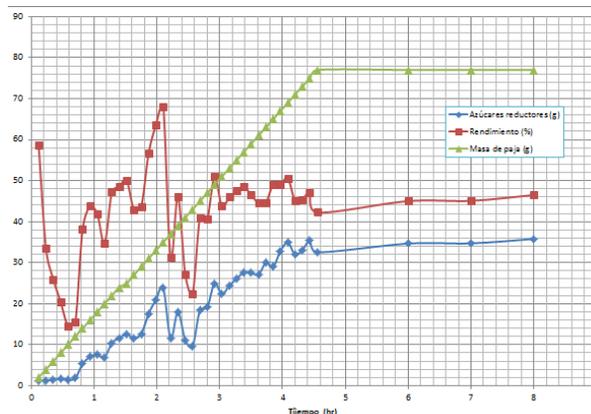


IMAGEN 3: Trayectoria de proceso para la hidrólisis intensificada mostrando la variación de masa de azúcares reductores producidos y porcentaje de rendimiento respecto al tiempo.

Analizando los resultados obtenidos primeramente para la determinación de condiciones óptimas de operación vemos que, como se esperaría en un inicio la carga enzimática óptima resultó la mayor de entre las experimentadas pues, entre mayor cantidad de enzima esté presente en el sistema, mayor es la posibilidad de que más cantidad de sustrato sea hidrolizado, referente a la temperatura vemos que está en un rango entre los dos valores más grandes con los cuales se experimentó y es favorable que no sea el valor mayor puesto que una temperatura más baja comparada con la mayor disponible se traduce en un ahorro energético; finalmente, el pH óptimo resultó ser el más bajo de los valores experimentados lo cual también es bueno ya que implica menos uso de reactivos como lo es solución diluida de ácidos, para controlarlo.

En el caso de la comparación entre ambos tipos de hidrólisis, convencional e intensificado podemos resaltar varios aspectos. En cuestión de operabilidad indudablemente el método intensificado es mejor puesto que, debido a la adición en lapsos de tiempo del sustrato, la

agitación en ningún momento presenta problema e incluso a bajas revoluciones por minuto es buena, que a su vez se traduce en una excelente homogeneidad de temperatura y pH en el sistema, a diferencia del método convencional que, en un inicio del proceso y debido a la carga de sustrato, provoca un mal mezclado, agitación forzada y mala homogeneidad de temperatura y pH. En cuestión de rendimientos y producción de azúcares reductores vemos que, el método intensificado presenta la desventaja de no ser tan regular o seguir una tendencia de siempre crecimiento, sino que presenta altibajos debidos a que con el paso del tiempo el volumen se va incrementando poco a poco y se añade masa en peso seco que causan variaciones irregulares en los rendimientos; sin embargo, a pesar de ello vemos que tan solo a 2.1 horas de operación se alcanzó un rendimiento alto, incluso mayor que el rendimiento más alto que la hidrólisis convencional alcanzó en un periodo del doble de tiempo (4 horas), lógicamente es un beneficio más del método intensificado al disminuir tiempo de operación que nuevamente se traduce en disminuir tiempo de calefacción y ahorrar energía. Una desventaja de éste método intensificado es que requiere un control de pH mayor que el método convencional puesto que, en caso de tener una paja tratada alcalinamente cada adición representa un incremento en el pH y requiere uso de reactivo para ajustarlo y cumplir con las condiciones óptimas de operación.

CONCLUSIONES

Se efectuaron dos procesos de hidrólisis enzimática de paja, uno de manera convencional y otro de una forma propuesta intensificada a fin de comparar el mejor que logre producir un hidrolizado con mayor concentración de azúcares reductores utilizables en el proceso de fermentación para producir bioetanol de segunda generación, resultando mejor el método propuesto intensificado al obtener un rendimiento mayor en una cantidad menor de tiempo. Como una primera exploración a éste método se obtuvieron buenos resultados y se da pauta a que en trabajos futuros se mejore ésta técnica de intensificación con la finalidad de obtener todavía mejores resultados y lograr mejorar de manera global el proceso de producción de bioetanol de segunda generación.

AGRADECIMIENTOS

Al alumno de Ingeniería Química Osvaldo López Negrete por realizar el proceso de deslignificación de la paja y proporcionarla para la realización de los experimentos involucrados en este estudio y al maestro en Ingeniería Química Javier Ulises Hernández Beltrán por su asesoría a lo largo de toda la experimentación.

REFERENCIAS

- [1] Cuervo, L., Folch, J.L & Quiroz, R.E (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.
- [2] Escobar, J.C; Orozco, D.J; Lora, E.S; Venturini, O.J & Barros, R.M (2014). Procesos biológicos de conversión. En Martínez. J.M & Lora, E.E (Ed.), *Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad*. (pp. 123-164). La Red Iberoamericana de Aprovechamiento de Residuos Orgánicos en Producción de Energía.
- [3] Zamora-Hernández, T; Prado-Fuentes, A; Capataz-Tafur, J; Barrera-Figueroa, B.E & Peña-Castro, J.M (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química*, 25(2), 122-127.
- [4] Ana da Silva Ayla Sant', de Souza Marcella Fernandes, Ballesteros Ignacio, Manzanares Paloma, Ballesteros Mercedes, Bon Elba P.S. Highsolids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. *Process Biochemistry* <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.018>