



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Producción integrada de etanol y metano a
partir de bagazo de caña de azúcar pretratado
mediante procesos térmicos**

Autor:

Sánchez Calvete, Alejandro

Tutores:

Bolado Rodríguez, Silvia

Travaini, Rodolfo

**Ingeniería Química y Tecnología
del Medio Ambiente**

Valladolid, Julio de 2016.

Agradecimientos

A mis padres y mi hermano, por su apoyo incondicional durante toda la carrera y porque gracias a ellos he conseguido llegar hasta aquí.

A mis amigos y compañeros de clase, por su apoyo y junto con los que he pasado muy buenos momentos.

A Rodolfo y a Silvia, junto con los demás investigadores de la UVA por su dedicación y por haberme enseñado, ayudado y aconsejado durante todo este trabajo.

Índice

Resumen	7
Palabras clave.....	7
Abstract	9
Keywords	9
1. Introducción	11
1.1 Antecedentes.....	11
1.2 Biocombustibles.....	12
1.2.1 Bioetanol.....	12
1.2.2 Biogás	14
1.3 Producción de etanol a partir de biomasa ligninocelulósica	15
1.3.1 Biomasa ligninocelulósica	16
1.3.1.1 Celulosa	17
1.3.1.2 Hemicelulosa	18
1.3.1.3 Lignina	19
1.3.2 Preparación del material ligninocelulósico (Reducción de tamaño)	20
1.3.3 Pretratamiento del material	20
1.3.4. Hidrólisis enzimática	24
1.3.5 Fermentación	25
1.3.5.1 <i>Saccharoyces cerevisiae</i> bakery	26
1.4 Biodegradación anaerobia para producción de biogás	28
1.4.1 Etapas de la digestión anaerobia	28
1.4.1.1 Hidrólisis.....	29
1.4.1.2 Acidogenesis	29
1.4.1.3 Acetogénesis.....	30
1.4.1.4 Metanogenesis.....	31
1.4.2 Factores que regulan la biodegradación anaerobia:	32
1.5 Integración del proceso	33
2. Objetivos.....	35
3. Materiales y métodos.....	37
3.1 Materiales	37
3.2 Pretratamientos	38

3.2.1 Térmico	38
3.2.2 Ácido	38
3.2.3 Básico	38
3.3 Hidrólisis enzimática.....	39
3.4 Fermentación	39
3.4.1 Microorganismo y medio de crecimiento	39
3.4.2 Experimentos de fermentación	40
3.4.3 Cálculo del rendimiento de etanol	40
3.5 Biodegradabilidad anaerobia.....	40
3.6 Métodos analíticos.....	41
3.6.1 ST y SV	41
3.6.2 Caracterización	41
3.6.3 Análisis de azúcares y etanol por HPLC.....	42
3.6.4 GC (gas chromatography).....	42
3.7 Determinación de los parámetros cinéticos.....	42
4. Resultados y discusiones	45
4.1 Pérdida de masa	45
4.2 Caracterización del bagazo pretratado	46
4.3 Hidrólisis	47
4.4 Fermentación	48
4.5 Producción de biogás.....	49
4.6 Cinéticas	54
4.7 Potencial de energía a partir del metano producido	56
Tabla 4.6: Energía generada por el metano.....	56
4.8 Balance energético del proceso.....	56
5. Conclusión.....	59
6. Bibliografía	61

Resumen

El trabajo estudia del efecto de los pretratamientos térmico, ácido diluido y básico diluido sobre la producción de biocombustibles a partir de bagazo de caña de azúcar. Se obtiene bioetanol por fermentación de los azúcares liberados en los hidrolizados del bagazo pretratado y se genera biogás de los residuos de fermentación. El análisis de los sólidos pretratados reveló que todos los pretratamientos generaron pérdidas de masa debido a la solubilización de componentes estructurales. Los sólidos pretratados fueron hidrolizados con cocteles enzimáticos comerciales, con el mejor rendimiento de conversión de 38,59% para celulosa y 43,58 % para xilanos para el pretratamiento básico. Los hidrolizados fueron fermentados con *Saccharomyces cerevisiae*, con rendimientos respecto al máximo teórico variando del 55% al 61%. Los residuos de las fermentaciones fueron convertidos a biogás por biodegradación anaerobia. El balance energético preliminar reveló la capacidad de generación de 5 MJ/kg de bagazo pretratado.

Palabras clave

Pretratamiento, bagazo de caña de azúcar, bioetanol, biogás, valorización.

Abstract

This work studied the effect of thermal, acid and alkaline pretreatments on the production of biofuels from sugar cane bagasse. Bioethanol was obtained by fermentation of sugar released in hydrolysates from pretreated bagasse and biogas was generated by fermentation's residue. Analysis of pretreated solid revealed that all pretreatments generated mass losses due to the solubilization of structural components. Pretreated solid were hydrolyzed by commercial enzymatic cocktails with the best conversion yield of 38,59% for cellulose and 43,58% for xylose, using the alkaline pretreatment. Hydrolysates were fermented by *Saccharomyces cerevisiae*, with yields from 55% to 61% respect to the maximum theoretical. Fermentation residues were converted to biogas by anaerobic biodegradation. The preliminary energy balance revealed the capacity of generate 5 MJ/kg of pretreated bagasse.

Keywords

Pretreatment, sugar cane bagasse, bioethanol, biogas, valorization.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

En los días actuales, la matriz energética mundial proviene mayoritariamente de los combustibles fósiles (Figura 1.1) [1].

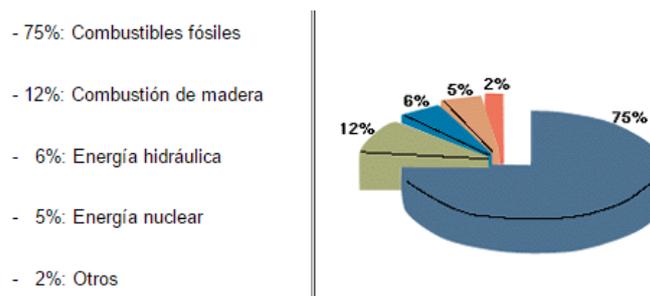


Figura 1.1: Producción energética del mundo [1]

La utilización de estas fuentes no renovables ha sido asociada a un constante deterioro del medio ambiente, que se manifiesta en emisiones de contaminantes tales como CO_2 , NO_x , y SO_x , que a parte de su efecto contaminante, han sido asociadas al aumento del efecto invernadero [1].

En los últimos años la demanda energética a nivel mundial ha ido aumentando cada vez más, debido a dos factores principales: el crecimiento de la población mundial y el desarrollo industrial. Este aumento en el consumo energético proveniente de matrices fósiles, ha incrementado progresivamente las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera y ha generado un aumento en la demanda de petróleo, provocando también problemas políticos y económicos (Bellido et al., 2011).

Debido al agotamiento previsto de las fuentes fósiles de combustibles y los problemas citados anteriormente, se han buscado intensivamente alternativas para su sustitución. Dentro de las muchas alternativas propuestas, la producción de energía a partir de fuentes renovables ha ido tomando cada vez más importancia debido a su menor impacto ambiental y a la posibilidad de disminuir la dependencia de Occidente de los países productores de petróleo de Oriente. Teniendo en cuenta este panorama, la Unión Europea ha desarrollado una política estratégica conjunta en la que establece que para el año 2020, el 20% del consumo de energía debe ser de carácter renovable, siendo el 10% destinados al sector transporte (Bellido et al., 2011).

Las fuentes de energía renovables, también son conocidas como energías limpias y tienen las siguientes características: sus sistemas de aprovechamiento energético suponen un menor impacto ambiental, la cercanía de los centros de

producción energética a los lugares de consumo puede ser viable en muchas de ellas y son una alternativa para las fuentes de energía no renovables o convencionales [2].

Entre las fuentes de energía renovables más destacadas tenemos: la energía eólica cuyo potencial es muy elevado y está adquiriendo cada vez mayor implantación gracias a las zonas de aprovechamiento eólico y a la optimización de nuevos materiales en los aerogeneradores; la energía geotérmica procedente del flujo calorífico de la tierra; la energía hidráulica, también con gran potencial de implementación, la energía maremotriz que aprovecha la energía contenida en las olas; la energía solar que es la mayor fuente de energía disponible ya que el sol proporciona una energía de 1,34 kw/m² permitiendo que con captadores energéticos adecuados se pudiera satisfacer la demanda energética mundial; y por último, una de las más prometedoras, la producción de biocombustibles a partir de la biomasa orgánica, que tiene diferentes formas de aprovechamiento según su composición [2].

1.2 Biocombustibles

Biocombustible es el término que se aplica a cualquier combustible de origen biológico, que se obtiene a partir de biomasa orgánica como pueden ser restos o desechos orgánicos. Su característica principal es que son renovables, además de que no generan residuos de difícil tratamiento y emiten menor cantidad de CO₂ ya que están producidos por un ciclo de carbono a corto plazo. En cuanto al transporte tienen generalmente un balance energético positivo ya que la cantidad de energía contenida en el producto es superior a la requerida para su producción y distribución. (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009).

Dentro de los biocombustibles, los podemos clasificar en dos tipos: los líquidos como son el bioetanol, el biodiesel, el biometanol, el biobutanol y los aceites vegetales y los gaseosos como son el biogás, el gas de síntesis y el biohidrógeno. Entre los biocombustibles líquidos los más utilizados son el biodiesel y el bioetanol y entre los biocombustibles gaseosos el más utilizado es el biogás (Bellido et al., 2011).

1.2.1 Bioetanol

El bioetanol es el biocombustible más utilizado a nivel mundial en el sector del transporte. La mayor parte del bioetanol procede de materias primas como la caña de azúcar, pero también es producido a partir de remolacha o de granos de cereales. Este etanol producido a partir de la fermentación de los concentrados de

azúcares provenientes de cultivos, se denomina de primera generación (1G). Pese a sus ventajas frente a los combustibles fósiles, sus materias primas forman parte del sustento humano y animal y su disponibilidad es insuficiente para cubrir las demandas de los países industrializados. Buscándose mitigar estos problemas, se han buscado desarrollar tecnologías para la producción de los mismos biocombustibles, pero a partir de los residuos agrícolas y agroindustriales, de los llamados residuos lignocelulósicos. Estos residuos contienen azúcares poliméricos, que tras una serie de etapas pueden ser convertidos en combustibles, los llamados combustibles de segunda generación (2G). En la Figura 1.2 podemos ver el esquema general de producción de etanol de 1G y 2G a partir de las diferentes materias primas (García and Martínez, 2012).

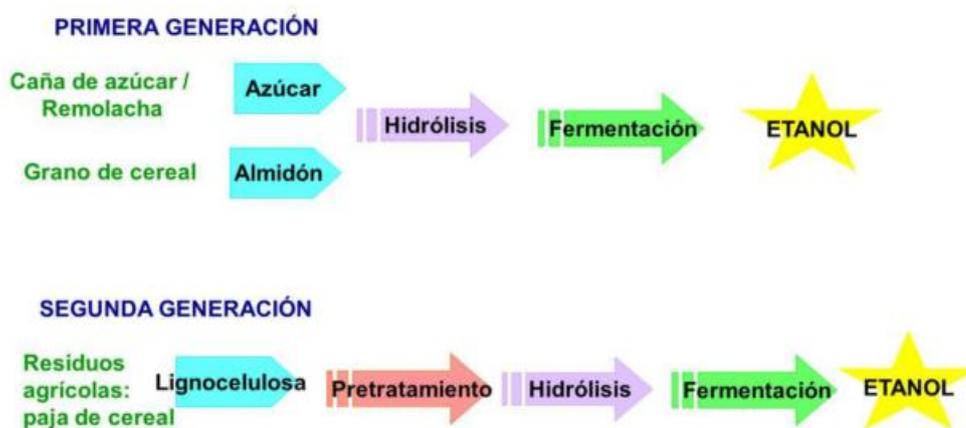


Figura 1.2: Esquema de producción de etanol de 1G y 2G a partir de las diferentes materias primas (García and Martínez, 2012)

El bagazo de caña de azúcar es material sólido fibroso remanente de los tallos de caña, que se obtiene como residuo del post procesamiento en las factorías para la producción de etanol combustible y/o azúcar alimentario. Desde el punto de vista físico, el bagazo integral se compone de 45% de fibra, 2-3% de sólidos insolubles, 2-3% de sólidos solubles y 50% de humedad, mientras que desde el punto de vista químico, se compone de 40-50% de celulosa, 20-30% de hemicelulosa, 20-25% de lignina y el 2,5% cenizas [3].

Los primeros países en producir etanol y utilizarlo como biocombustible fueron Brasil y EEUU, a partir de caña de azúcar y de maíz respectivamente, y hasta a día de hoy son los mayores productores y exportadores de este. Se prevé que el bioetanol va a ser el combustible dominante a medio plazo con una producción de 1,81 millones de barriles en 2017, donde Brasil y EEUU serán los mayores productores junto con Canadá y China. En la Figura 1.3 se muestra un gráfico con la previsión realizada por la IEA (International Energy Agency) (Sims et al., 2008)

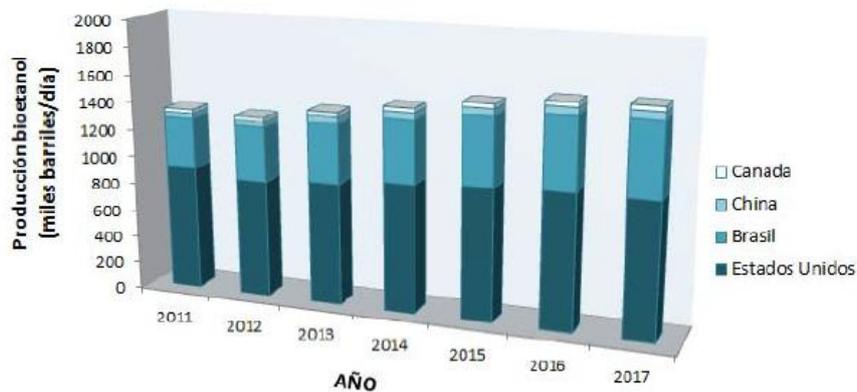


Figura 1.3: Previsión del aumento de la producción de bioetanol para los principales productores (Sims et al., 2008).

En cuanto a las aplicaciones, el bioetanol puede utilizarse como combustible único, produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina, debe ser mezclado en concentraciones bajas (5%-10%) para que los motores no necesiten modificaciones, si se utilizan concentraciones superiores es necesaria la adaptación de los motores [4]. También puede utilizarse como aditivo para el gasóleo, de tal forma que facilita la combustión y contribuye a reducir la emisión de gases contaminantes, ofreciendo una alternativa al diesel en el campo de los vehículos diesel (Rakopoulos et al., 2008).

1.2.2 Biogás

El biogás es un biocombustible que se genera en medios naturales a partir de diferentes reacciones de biodegradación que sufre la materia orgánica como desechos de la agricultura, estiércol, desechos municipales o vegetales, mediante la acción de microorganismos anaerobios así como de otros factores en ausencia de oxígeno. La composición del biogás depende del sustrato digerido y del funcionamiento del proceso. En general la composición del biogás es de un 60% metano (CH₄), un 38% de dióxido de carbono (CO₂) y trazas de otros gases [5] como observamos en la tabla de la Figura 1.4:

Compuesto	Concentración
Metano (CH ₄) (%)	50 - 70
Dióxido de Carbono (CO ₂) (%)	30 - 50
Hidrogeno (H ₂) (%)	1- 10
Nitrógeno (N ₂) (%)	< 3
Oxígeno (O ₂) (%)	< 0.1
Ácido Sulfhídrico (H ₂ S) (ppm)	0 – 8000

Figura 1.4: Composición general del biogás (AGROWASTE, 2013)

En cuanto a las aplicaciones, el biogás puede ser utilizado para tratar residuos biodegradables, dado que produce un combustible de gran valor (el metano), y genera un residuo que puede aplicarse como abono genérico o acondicionador del suelo. También puede ser utilizado para producir energía eléctrica mediante turbinas o plantas generadoras de gas, así como en estufas, calderas, hornos o cualquier sistema de combustión de gas. Además el metano puede comprimirse y utilizarse en los motores de los coches al igual que el gas natural comprimido (GNC), en países como Suecia, Alemania o Suiza se utiliza como combustible para el transporte público y privado [5].

1.3 Producción de etanol a partir de biomasa ligninocelulósica

Los métodos tradicionales de producción de etanol 1G se basan en apenas dos etapas, la extracción de los concentrados de azúcares y su fermentación. En el caso de la producción de etanol 2G a partir de biomasa ligninocelulósica, el proceso es más complejo, ya que los polímeros de azúcares presentes deben ser desenlazados de la trama con la lignina, convertidos en sus respectivas unidades monoméricas y finalmente fermentados hasta etanol. De esta manera el proceso tiene las siguientes etapas principales, (Figura 1.5):

1. Preparación del material ligninocelulósico (Reducción de tamaño)
2. Pretratamiento del material
3. Hidrólisis principal
4. Fermentación
5. Recuperación del etanol

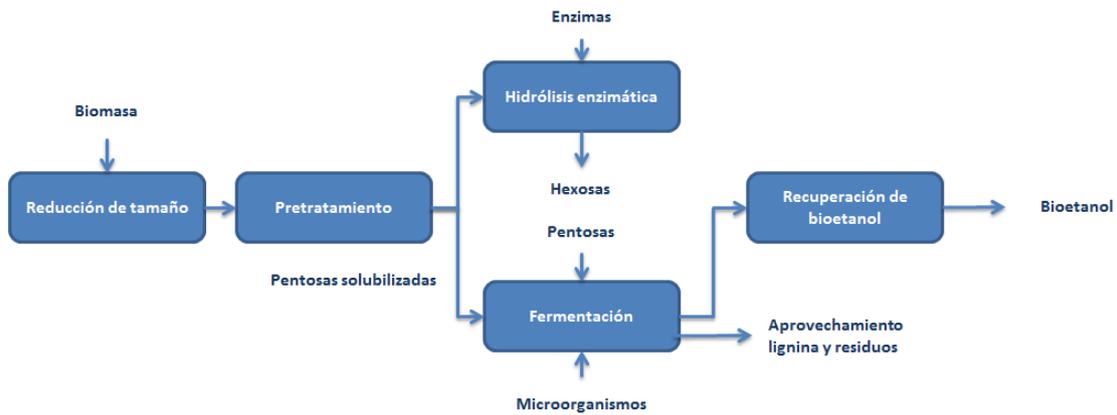


Figura 1.5: Esquema de las etapas de producción del bioetanol (2G) (Bellido et al., 2011)

1.3.1 Biomasa ligninocelulósica

Los componentes de los materiales ligninocelulósicos se clasifican en 2 tipos:

Componentes estructurales: son tres polímeros, la celulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$, la hemicelulosa $(C_5H_8O_4)_m$ y la lignina $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}]_n$. Del total de compuestos que forman los materiales ligninocelulósicos la celulosa representa el 50-60% del peso total, la hemicelulosa representa el 20-30% del peso total y la lignina representa el 20% del peso total. La proporción de estos componentes varía dependiendo del material ligninocelulósico (Figura 1.6). La unión entre celulosa y lignina puede producirse directamente a través de la hemicelulosa (Figura 1.7), hecho que se restringe de forma severa la accesibilidad enzimática y microbiana a los polímeros de azúcares. La estructura y composición química de los materiales ligninocelulósicos es un factor clave que afecta a la eficiencia de la producción de bioetanol de segunda generación (Brandt et al., 2013) (Miguel, 2010).

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Maderas duras			
Nogal	46,2	20,9	21,9
Arce	44,9	23,0	28,0
Chopo	43,5	21,8	26,2
Álamo	49,9	25,1	18,1
Maderas blandas			
Pino	46,4	20,6	29,4
Abeto	49,9	21,6	28,7
Residuos agrícolas			
Paja de trigo	30,2	22,3	17,0
Paja de cebada	33,1	24,9	16,1
Residuos de maíz	36,8	30,6	23,1
Biomasa herbácea			
Pasto varilla	45,0	31,4	12,0
Residuos celulósicos			
Papel periódico	40-55	25-40	18-30

Figura 1.6: Composición de los diferentes materiales ligninocelulósicos (Wyman, 1996; Sun y Cheng, 2002; Negro et al., 2003; Ballesteros et al., 2006)

Componentes secundarios: son componentes de menos proporción entre el 4-10% del peso total de dos tipos: componentes de bajo peso molecular, hidrosolubles o extraíbles con solventes orgánicos denominados extractivos y los materiales minerales inorgánicos, que en los análisis químicos se presentan como cenizas (Ca, K, Mg) (Miguel, 2010).

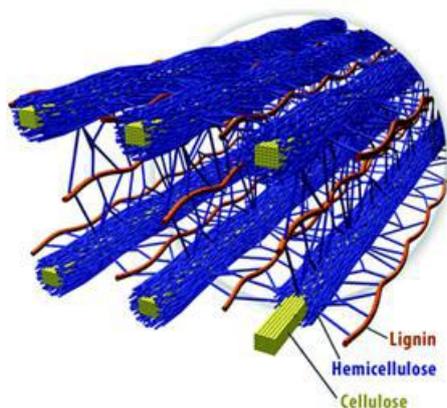


Figura 1.7: Estructura de la biomasa (Brandt et al., 2013)

1.3.1.1 Celulosa

Es la molécula más abundante de la tierra, y es el polímero mayoritario en la pared celular vegetal. Es un homopolímero lineal (Figura 1.8) de elevado peso molecular y alto grado de polimerización entre 200 y 10.000 unidades de β -D-glucopiranosas unidas por un enlace de tipo éter entre el carbono 1 y 4 (β ,1-4),

dando lugar a largas cadenas que se conocen como microfibrillas, unidas entre sí por puentes de hidrógeno en los grupos hidroxilo (Miguel, 2010).

Posee una estructura fibrosa, muy estable y resistente al ataque químico, y a la tracción mecánica. Es un polímero semicristalino, ya que presenta regiones cristalinas donde las microfibrillas (Figura 1.9) tienen una estructura altamente ordenada, que le confiere gran resistencia, y regiones amorfas que le dan gran elasticidad, susceptibles a la degradación enzimática. Cuanto más ordenada y cristalina sea la celulosa, menos soluble y más difícil de degradar será (Miguel, 2010).

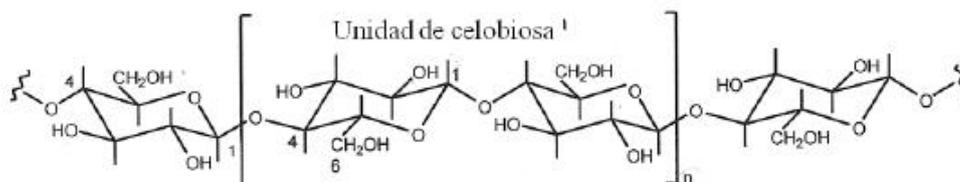


Figura 1.8: Estructura primaria de la celulosa (Miguel, 2010)

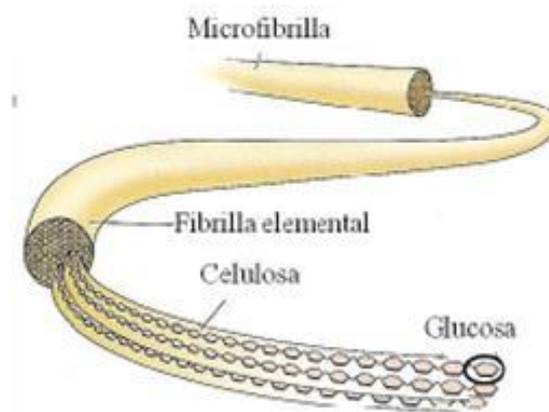


Figura 1.9: Estructura de una microfibrilla (Miguel, 2010)

1.3.1.2 Hemicelulosa

También forma parte de la pared celular vegetal, siendo el segundo polímero más abundante en la tierra por detrás de la celulosa. Forma cadenas ramificadas, con menor grado de polimerización que la celulosa, no presentando zonas cristalinas (Miguel, 2010).

Es un heteropolímero (Figura 1.10) que está formado principalmente por 3 tipos de unidades monoméricas: las pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), y en menor cantidad por las hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), además de ácidos urónicos (D-glucurónico, D-galacturónico, 4-O-metilglucurónico). Su función

principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina (Bellido et al., 2011).

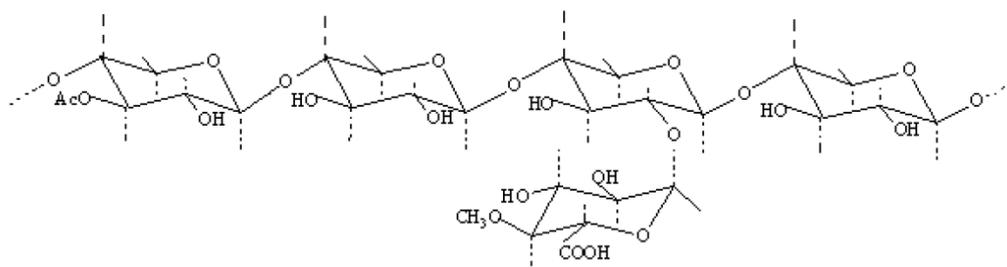


Figura 1.10: Estructura de la hemicelulosa (Bellido et al., 2011)

En nuestro caso, el bagazo de caña de azúcar la mayoría de la hemicelulosa se presenta en forma de xilosa (21,7%).

1.3.1.3 Lignina

Es el tercer polímero (Figura 1.12) más abundante en la tierra por detrás de la celulosa y la hemicelulosa. Es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado que al igual que la hemicelulosa está formada por varias unidades monoméricas principalmente alcoholes aromáticos, conocidos como alcoholes cinamílicos (el alcohol p-cumarílico o unidad H, el alcohol conefirílico o unidad G y el alcohol sinapílico o unidad S (Figura 1.11)). La lignina de las maderas de coníferas está formada principalmente por unidades G, mientras que la lignina de las maderas frondosas está formada por unidades S y G. A su vez los materiales alternativos o herbáceos como el bagazo de caña de azúcar son ricos en unidades S, G y H.

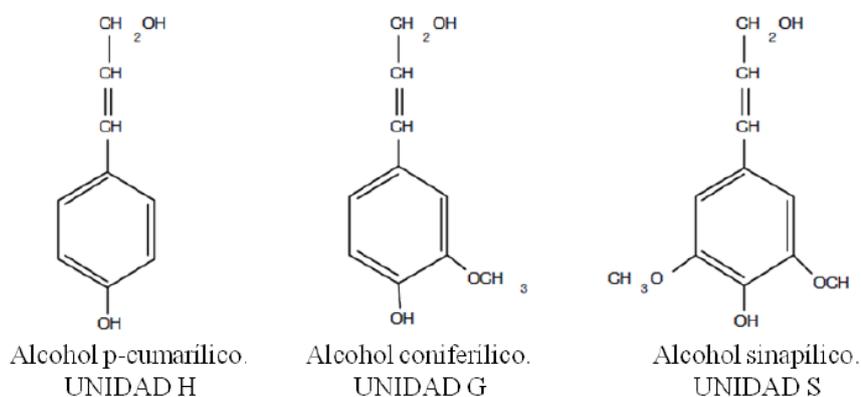


Figura 1.11: Alcoholes cinamílicos (Miguel, 2010)

Su función es proteger a la celulosa del ataque microbiano, conferir resistencia e impermeabilidad al material y mantener unidas las fibras celulósicas (Miguel, 2010).

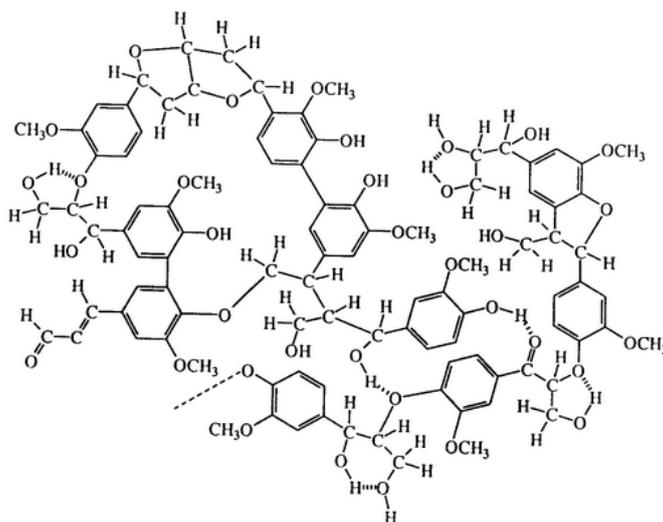


Figura 1.12: Estructura de la lignina (Bellido et al., 2011)

1.3.2 Preparación del material ligninocelulósico (Reducción de tamaño)

Los residuos ligninocelulósicos deben ser procesados de forma adecuada mediante la reducción de tamaño ya sea mediante procesos de cortado, molido o tamizado, esto facilita la penetración del pretratamiento, ya sea simplemente agua, o una disolución ácida o básica de una determinada concentración, además también facilita la accesibilidad de los enzimas en la etapa de hidrólisis (García and Martínez, 2012) [6].

1.3.3 Pretratamiento del material

Su finalidad es aumentar la digestibilidad de dichos materiales ligninocelulósicos permitiendo la mejora de la eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática ya que esos materiales son muy resistentes a los ataques enzimáticos debido a la estructura que existe entre la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Si durante el proceso se prescinde de esta fase de pretratamiento, el rendimiento de la hidrólisis enzimática apenas alcanzaría el 20%. Dependiendo de la materia prima, el comportamiento y las propiedades físico-químicas de dicha materia serán diferentes para cada uno de los pretratamientos aplicados, por lo que será

necesario buscar el pretratamiento más efectivo (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009) (Alvira et al., 2010).

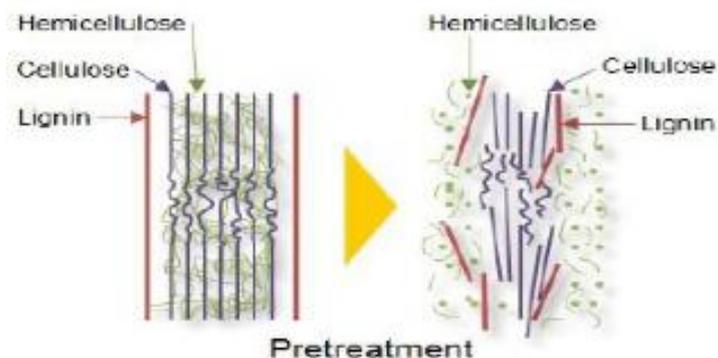


Figura 1.13: Efecto del pretratamiento (Alvira et al., 2010)

Para que el pretratamiento sea efectivo debe cumplir sobretodo los siguientes objetivos (Alvira et al., 2010):

1. Provocar la solubilización y/o desestructuración de la lignina.
2. Disociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa facilitando la accesibilidad de las enzimas.
3. Disminuir la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa.
4. No atacar, o atacar lo mínimo posible los polímeros de azúcares.
5. Presentar baja formación de productos de inhibición que puedan afectar las etapas siguientes de hidrólisis enzimática y fermentación.

Existen diferentes métodos de pretratamientos que pueden ser divididos en:

Métodos físicos: no modifican la estructura química de la materia prima, incrementan el área superficial y el tamaño de poro (Tahezadeh and Karimi, 2008). En este tipo de pretratamiento el material ligninocelulósico es fragmentado, molido o triturado para reducir la cristalinidad de la celulosa y disminuir el grado de polimerización, facilitando la accesibilidad de las enzimas sobre la biomasa y su conversión en azúcares (Sánchez & Cardona, 2008).

Métodos físico-químicos: aquellos en los que interviene un agente químico y una magnitud física provocando un cambio en la estructura química de la materia prima. Destacan la explosión a vapor y la acción de agentes químicos como los ácidos (ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4)), las bases (Hidróxido de sodio (NaOH) o de calcio ($Ca(OH)_2$)), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o solventes orgánicos (etanol o metanol) para solubilizar la lignina y modificar la estructura de la celulosa para facilitar la acción de los enzimas. Los más destacados son la ozonólisis, el pretratamiento térmico, el pretratamiento ácido, el pretratamiento básico y el pretratamiento con peróxidos (Bellido et al., 2011).

En nuestro caso vamos a utilizar los siguientes pretratamientos físico-químicos: térmico, ácido y básico:

El pretratamiento térmico consiste en someter a la biomasa a la acción de agua caliente a 120 °C durante un tiempo determinado. Se lleva a cabo en un autoclave que debe estar presurizado para mantener el agua en estado líquido. Permite solubilizar la hemicelulosa de la celulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de inhibidores por ello el pH debe estar entre 4 y 7 (Sánchez Riaño et al., 2010) (Cardona et al., 2010).

El pretratamiento ácido consiste en someter a la biomasa a una disolución diluida de ácido ya sea ácido sulfúrico o ácido clorhídrico en unas determinadas condiciones de presión, de temperatura y de concentración. Ataca a los polisacáridos especialmente a la hemicelulosa, que representa aproximadamente el 35% del total de carbohidratos que pueden ser hidrolizados en azúcares monoméricos y que es más fácil de hidrolizar que la celulosa. Además la celulosa y la lignina permanecen inalteradas en la fase sólida. Dependiendo de las condiciones de operación, la fase líquida del hidrolizado podrá estar constituida por azúcares (xilosa, glucosa y arabinosa), productos de descomposición de la hemicelulosa (oligómeros de los polímeros y ácido acético generados de los grupos acetilo de los azúcares) y productos de la deshidratación de las pentosas (furfural) y de las hexosas (HMF). Tiene la ventaja que es un pretratamiento de bajo coste sin embargo, es un pretratamiento corrosivo (Bolado-Rodríguez et al., 2016) (Cardona et al., 2010).

El pretratamiento básico consiste en someter a la biomasa a una disolución básica por ejemplo hidróxido de sodio, de potasio o de calcio que digiere la matriz de lignina y hace más fácil la degradación enzimática de la celulosa y la hemicelulosa. Además rompe la pared celular mediante la disolución de hemicelulosa, lignina y sílice mediante la hidrólisis de ésteres urónicos; y acético y reduce el grado de inhibición en la fermentación del metano y reduce el coste de producción (Bolado-Rodríguez et al., 2016) (Cardona et al., 2010).

Métodos químicos: modifican la estructura química de la materia prima mediante la acción de agentes químicos como son el ozono, cuyo tratamiento se conoce como ozonolisis.

Métodos biológicos: estos métodos implican la utilización de enzimas o de microorganismos para tratar la materia prima como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda que son capaces de degradar la lignina y al hemicelulosa eliminando las barreras que protegen la celulosa. No generan compuestos tóxicos y requieren muy poca cantidad de energía, además son procesos lentos que limitan su implicación industrial (Bellido et al., 2011).

En la siguiente Tabla 1.1 se comparan los efectos de los métodos descritos anteriormente:

Tipo	Incremento	Disminución	Degradación	Redistribución	Eliminación
Físico	Área superficial específica Tamaño de poro	Grado de polimerización Cristalinidad			
Fco.-Qco.	Área superficial específica Tamaño de poro		Hemicelulosa (Parcial)	Lignina	
Químico	Área superficial interna Porosidad	Grado de polimerización Cristalinidad	Hemicelulosa		Lignina
Biológico	Área superficial específica Tamaño de poro		Hemicelulosa Lignina		

Tabla 1.1: Efecto de los diferentes pretratamientos sobre los componentes de la biomasa lignocelulósica (Mosier et al., 2005)

1.3.3.1 Inhibidores que se generan en los pretratamientos

Dependiendo de las condiciones del pretratamiento (temperatura, presión, tiempo de residencia, etc), de la materia prima y de la presencia de catalizadores, pueden ocurrir reacciones secundarias generando subproductos. Estos compuestos pueden actuar como inhibidores para los microorganismos durante las etapas siguientes de hidrólisis enzimática y fermentación. Se clasifican de acuerdo con su estructura química en: ácidos carboxílicos (alifáticos), furaldehídos y compuestos aromáticos (Bellido et al., 2011).

Los furaldehídos generados son principalmente el furfural, producto de la degradación de las pentosas y el 5 hidroximetilfurfural (HMF), producto de la degradación de la celulosa. Estos compuestos tienen como efectos reducir la tasa específica de crecimiento de microorganismos fermentativos, descenso de la productividad específica de etanol y disminución de la producción de biomasa (Oliva, 2003).

Los compuestos aromáticos son compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina como el 4-hidroxibenzaldehído, la vainillina, el sinringaldehído, el acetosiringona, el ácido vainillínico y el ácidosiringico. Estos compuestos causan una pérdida de la integridad de la membrana celular de los microorganismos fermentativos, reduciendo de este modo el crecimiento celular y el consumo de azúcares (Oliva, 2003).

Los ácidos alifáticos que pueden generarse son principalmente el ácido acético que se produce por los restos de acetilo de las hemicelulosas y el ácido fórmico y levulínico, procedentes de la degradación del furfural y del HMF. Una elevada concentración de estos compuestos ácidos puede llegar a provocar la muerte celular (Oliva, 2003).

En la Figura 1.14 se puede de forma esquemática la procedencia de cada uno de los inhibidores explicados anteriormente:

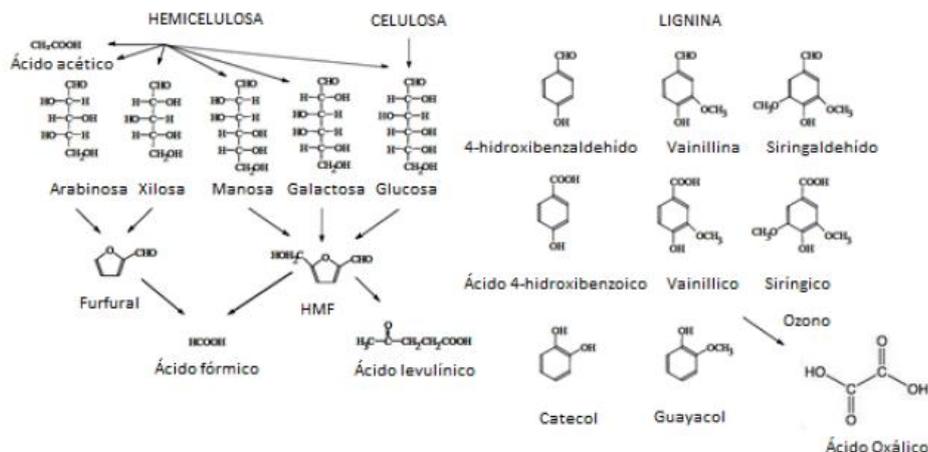


Figura 1.14: Compuestos inhibidores generados durante el pretratamiento de materiales lignocelulósicos (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009)

1.3.4. Hidrólisis enzimática

Finalizado el proceso de pretratamiento, el siguiente paso es la hidrólisis de los polisacáridos que forman la biomasa (celulosa y hemicelulosa) presentes en la materia prima. Dicha hidrólisis es llevada a cabo por diferentes tipos de celulasas y de xilanasas. En el caso de las celulasas, se requiere la acción sinérgica de las siguientes enzimas: 1) las endo- β -(1,4)-glucanasas (EGs) que hidrolizan las regiones amorfas de la celulosa para producir oligosacáridos de menor longitud, 2) las celobiohidrolasas (CBHs) o exo- β -(1,4)-glucanasas que hidrolizan los extremos terminales no reductores de esas cadenas, liberando unidades de celobiosa, glucosa y oligosacáridos de bajo peso molecular y 3) las β -(1,4)-glucosidasas (BGs) que hidrolizan la celobiosa y otros oligómeros a glucosa. También se produce un mecanismo de sinérgia entre las Egs y CBHs y las BGs ya que esta última degrada la celobiosa que tiene un efecto fuertemente inhibitor sobre las primeras (Figura 1.15) (García and Martínez, 2012) (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009).

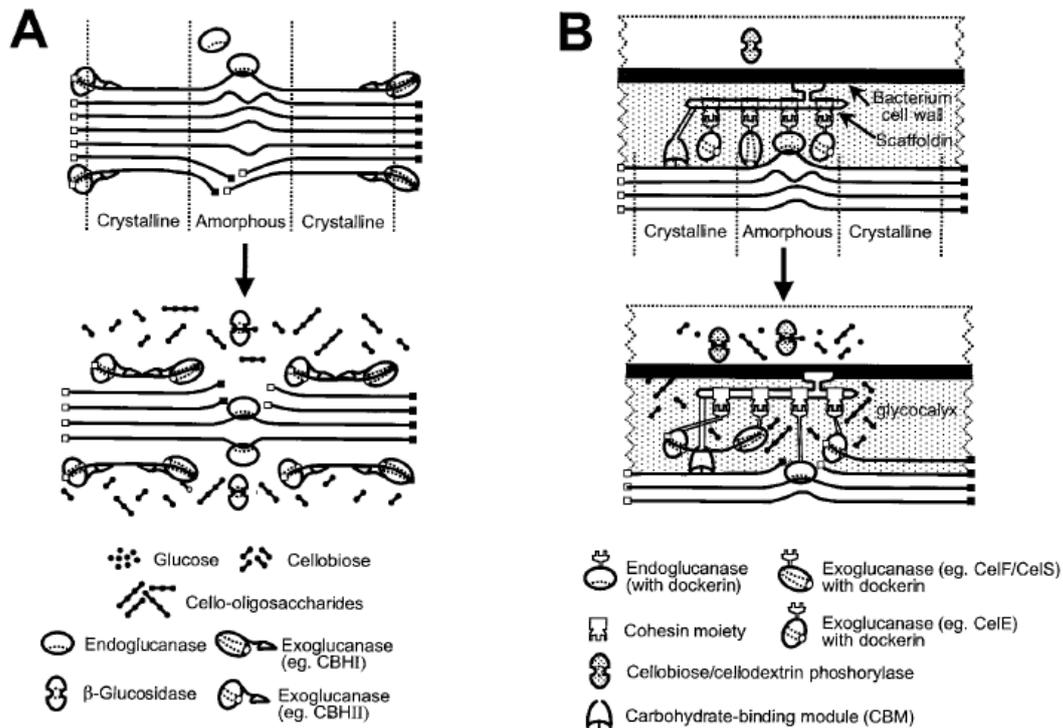


Figura 1.15: Mecanismo propuesto para la hidrólisis de la celulosa mediante una acción combinada de celulasas (Lee R. Lynd, Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, 2002)

En el caso de las xilanasas, las enzimas mayoritarias que participan en este proceso son: las endo-(1,4)-xilanasas y las β -xilosidasas, implicadas en la despolimerización del esqueleto principal de los xilanos y su transformación en xilosa, respectivamente. La etapa de hidrólisis enzimática, limitante en el proceso de obtención de etanol, está influenciada por varios factores referentes a la materia prima pretratada y a las propias enzimas, dentro de los cuales destacan: el uso de complejos enzimáticos adecuadamente combinados, el índice de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, el área superficial disponible, el contenido y la distribución de lignina, el contenido de hemicelulosa, el tamaño de partícula y la porosidad. Por todo esto cuanto más efectivo sea el pretratamiento, menor cantidad de enzima será necesario utilizar y más efectiva será la hidrólisis también [8].

1.3.5 Fermentación

Una vez que ha tenido lugar la hidrólisis enzimática, los azúcares fermentables presentes en los hidrolizados deben ser convertidos a etanol por microorganismos (García and Martínez, 2012).

La conversión estequiométrica de la glucosa y la xilosa es de 0,511 gramos de etanol por gramo de azúcar. En la práctica es muy difícil obtener conversiones tan

altas ya que las levaduras derivan parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento. El microorganismo empleado debe ser también capaz de tolerar los posibles compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009).

A diferencia de la glucosa que se puede llevar a cabo de forma eficiente por un gran número de microorganismos, la fermentación de la xilosa presenta algunas limitaciones, ya que solo algunas levaduras son capaces de convertirla en etanol y con rendimientos muy bajos. Además las levaduras fermentadoras de xilosa no toleran altas concentraciones de etanol, son muy sensibles a los inhibidores y a los cambios de pH (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009).

El residuo generado durante la fermentación es aprovechado para producir metano mediante biodegradabilidad anaerobia, ya que sirve de sustrato para los microorganismos anaerobios que llevan a cabo dicho proceso de producción de metano (Angelidaki et al., 2009).

1.3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae* bakery

Saccharomyces cerevisiae (Figura 1.16) es una levadura, un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos. Tiene un tamaño de aproximadamente entre 3-5 μm de diámetro. En la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares o en las savias dulces de algunas plantas [9].

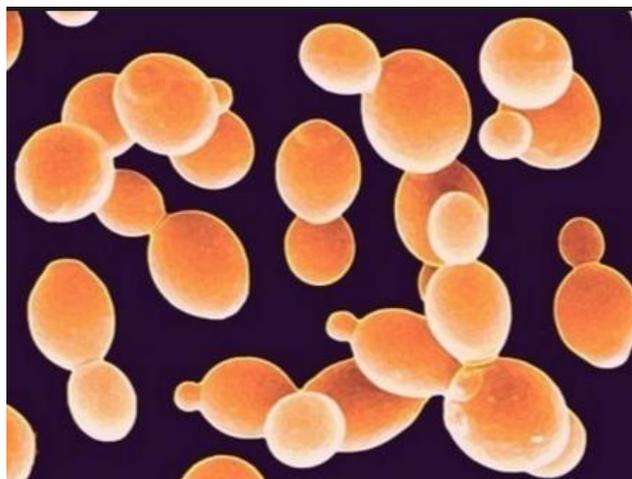
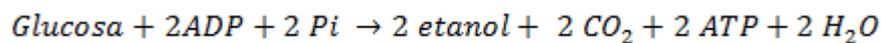


Figura 1.16: Morfología de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [9]

Es el microorganismo tradicionalmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica para producir etanol de primera generación, ya que puede utilizar altos rendimientos. Además, si se emplea en procesos de producción de etanol a partir de lignocelulosa, muestra gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento. Es utilizado a nivel

industrial para la fabricación de pan, vino y cerveza. Presenta el problema que no es capaz de utilizar en la fermentación los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar las pentosas como la xilosa (R.C. Saxena, D.K. Adhikari, 2009).

Saccharomyces cerevisiae convierte la glucosa a etanol a través de la ruta de la glicólisis. Esta es una vía adecuada para el metabolismo de los monosacáridos. Por cada molécula de hexosa la convierte a piruvato, hay una producción neta de dos moléculas de ATP a partir de ADP + Pi y dos moléculas de NAD⁺ se reducen a NADH. La glicólisis se puede dividir en dos etapas: una de hexosas, en la cual el ATP es consumido, y una etapa de triosas, en la cual se obtiene una ganancia neta de ATP. En la fermentación alcohólica la producción de etanol se presenta en dos pasos: el piruvato es descarboxilado por la piruvato descarboxilasa hasta acetaldehído; este último es reducido a etanol por la alcohol deshidrogenasa, con liberación de NAD⁺ proveniente de la etapa de la glicólisis, que había oxidado el 3-fosfogliceraldehído a ácido 3-fosfoglicérico. El etanol y CO₂ son productos finales de la fermentación alcohólica y su ecuación es la siguiente:



La conversión de glucosa en etanol y CO₂ produce 2 moles de ATP por mol de glucosa transformada (Buitrago et al., 2007).

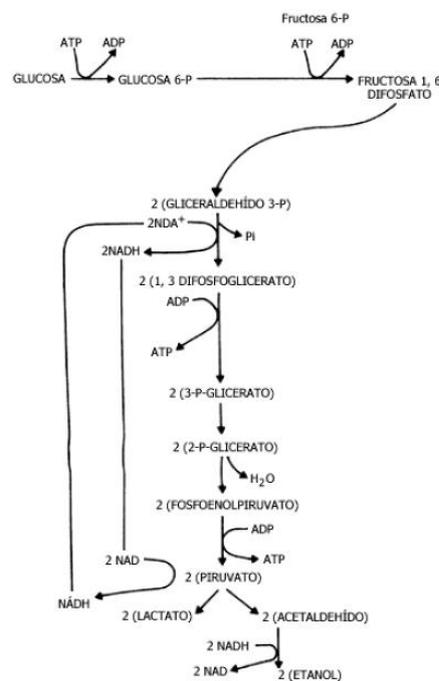


Figura 1.17: Ruta metabólica de conversión de la glucosa en etanol (Energía, Vida, Antonio, & Georges, 1997)

1.4 Biodegradación anaerobia para producción de biogás

La obtención de biogás se lleva a cabo mediante un proceso que se conoce como biodegradación anaerobia, un proceso bioquímico en ausencia de oxígeno, en el cual los microorganismos transforman los compuestos orgánicos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en metano, gas carbónico, gas sulfhídrico y amonio. Los microorganismos que participan en dicha digestión anaerobia actúan por medio de reacciones específicas secuenciales, las cuales cuentan con bacterias especializadas en cada una de ellas (Ortiz, 2011).

El inicio del proceso está caracterizado por una baja actividad biológica, relacionada con el crecimiento de las bacterias acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas como biomasa dispersa y adherida.

1.4.1 Etapas de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso muy complejo tanto por el número de reacciones bioquímicas que tienen lugar como por la cantidad de microorganismos involucrados en ellas. Por ello el proceso de digestión anaerobia es dividido en 4 fases como vemos en la Figura 1.18:

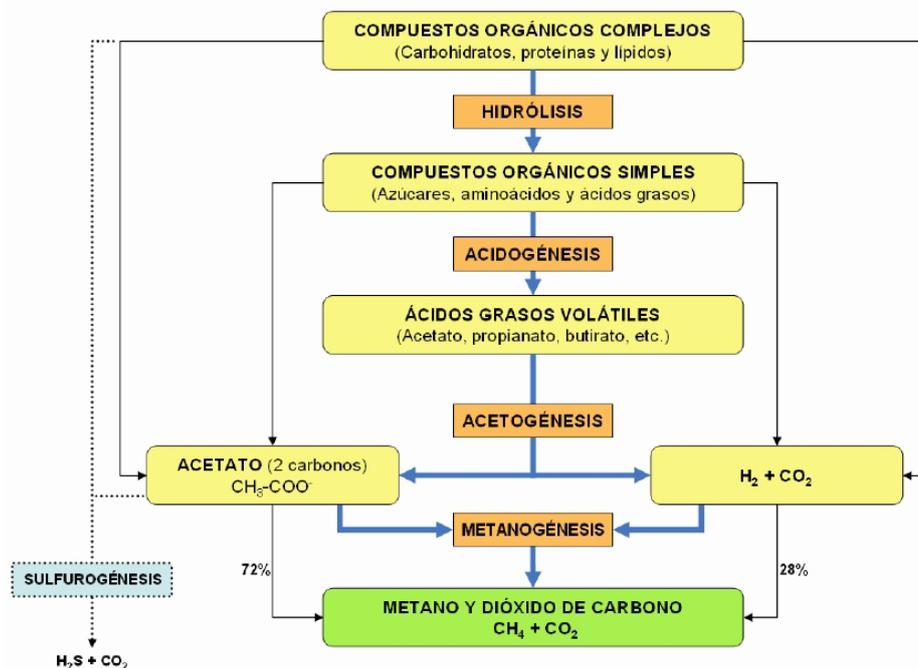


Figura 1.18: Esquema de reacciones de la digestión anaerobia (AGROWASTE, 2013)

1.4.1.1 Hidrólisis

La hidrólisis de la materia polimérica a compuestos solubles o monómeros es el paso inicial de la digestión anaerobia de sustratos orgánicos complejos, ya que los microorganismos únicamente pueden utilizar materia orgánica soluble que pueda atravesar su pared celular. La hidrólisis de estas moléculas complejas es llevada a cabo por la acción de enzimas extracelulares producidas por los microorganismos hidrolíticos. Además, la hidrólisis depende de la temperatura del proceso, de la composición del sustrato (porcentaje de lignina, carbohidratos, proteínas y grasas), del tamaño de partícula, del pH, de la concentración de NH_4^+ y de la concentración de los productos de la hidrólisis (Speece, 1983).

La hidrólisis es la etapa limitante del proceso de digestión anaerobia debido a la velocidad de degradación de los materiales ligninocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) es muy lenta. Esto es debido sobre todo a que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaerobios (Ortiz, 2011).

Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son la celobiosa y la glucosa y de la hemicelulosa son la pentosa, la hexosa y los ácidos urónicos (Ortiz, 2011).

1.4.1.2 Acidogenesis

Las moléculas orgánicas solubles formadas en la etapa anterior de hidrólisis son fermentadas por varios organismos fermentativos formando compuestos como el ácido acético, el ácido fórmico y el H_2 y compuestos orgánicos más reducidos como el ácido láctico, el ácido butírico, el ácido propiónico y el etanol. Las proporciones entre los productos de la fermentación varían en función del consumo de H_2 por parte de las bacterias que utilizan hidrógeno (Ortiz, 2011).

Fermentación de carbohidratos solubles

La principal ruta metabólica de degradación de glucosa para formar ácidos orgánicos es la de Embden-Meyerhof mostrada en la figura 1.19 donde el principal intermediario es el piruvato.

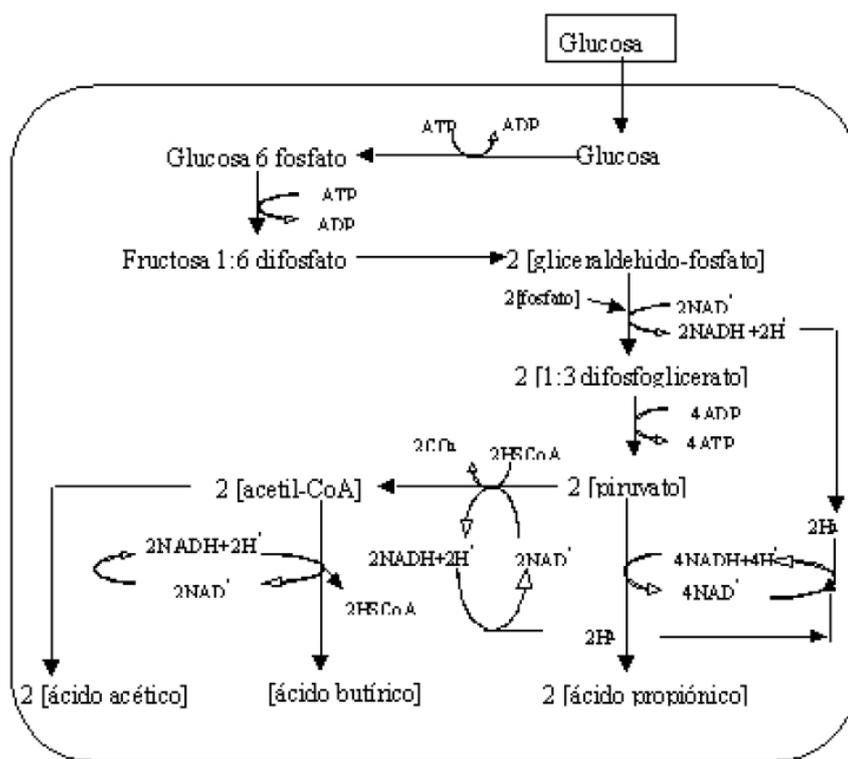


Figura 1.19: Simplificación de las rutas metabólicas de degradación de la glucosa por las bacterias acidogénicas (Ortiz, 2011).

1.4.1.3 Acetogénesis

Mientras que algunos de los productos obtenidos en la etapa de acidogénesis pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos como el ácido acético, el CO_2 y el H_2 , los demás productos como el etanol, los ácidos grasos volátiles, ácido propiónico y el ácido butírico son transformados en productos más sencillos como el acetato, el CO_2 y el H_2 mediante las bacterias acetogénicas. En la siguiente tabla (Figura 1.20) se muestran las principales reacciones acetogénicas (Ortiz, 2011).

Reacciones acetogénicas	ΔG° (KJ)
Etanol y láctico	
$\text{Etanol} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato} + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9,6
$\text{Lactato}^{-1} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^{-1} + \text{H}^+ + 2\text{H}_2 + \text{HCO}_3^{-}$	-4,2
Acidos Grasos	
$\text{Acetato}^{-1} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + 4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^{-}$	+104,6
$\text{Propionato}^{-1} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^{-1} + \text{HCO}_3^{-} + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	+76,1
$\text{Butirato}^{-1} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acetato}^{-1} + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48,1
$\text{Valerato}^{-1} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{Acetato}^{-1} + 2\text{H}^+ + 4\text{H}_2$	+96,2
Aminoácidos	
$\text{Alanina} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^{-1} + \text{HCO}_3^{-} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+7,5
$\text{Aspartato}^{-1} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetato}^{-1} + 2\text{HCO}_3^{-} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-14,0
$\text{Leucina} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{isovalerato}^{-1} + \text{HCO}_3^{-} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+4,2
$\text{Glutamato}^{-1} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{propionato}^{-1} + 2\text{HCO}_3^{-} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	-5,8
$\text{Glutamato}^{-1} + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetato}^{-1} + 3\text{HCO}_3^{-} + \text{NH}_4^+ + 3\text{H}^+ + 5\text{H}_2$	+70,3

Figura 1.20: Principales reacciones acetogénicas (Ortiz, 2011)

1.4.1.4 Metanogenesis

Etapa más importante del proceso de biodegradación anaerobia en la que los microorganismos metanogénicos, considerados los más importantes dentro de los microorganismos anaerobios, se encargan de la transformación de los productos obtenidos en la etapa de acetogénesis como el acetato el CO_2 y el H_2 en metano. La mayoría de los organismos metanogénicos son capaces de utilizar el H_2 , como aceptor de electrones, mientras que solo dos especies son capaces de utilizar el acetato. A pesar de ello, en ciertos ambientes anaerobios, el H_2 es el principal precursor del metano. Por ello se pueden establecer dos grandes grupos de microorganismos en función del sustrato principal: los hidrogenofílicos que consumen hidrógeno y los acetoclásticos que consumen acetato. En la siguiente tabla (Figura 1.21) se muestran las principales reacciones metanogénicas (Ortiz, 2011):

<i>Reacciones hidrogenotróficas</i>	ΔG° (KJ)
$4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \rightarrow \text{Acetato} + 4H_2O$	-104.6
$4H_2 + 4S^0 \rightarrow 4HS^- + 4H^+$	-112
$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-133.6
$4H_2 + 4SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-151.9
$4H_2 + 4 \text{ fumarato} \rightarrow 4 \text{ succinato}$	-344.6
$4H_2 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$	-599.6
Interconversión formato-hidrógeno	
$H_2 + HCO_3^- \rightarrow \text{formato} + H_2O$	-1.3
Metanogénesis acetoclástica	
$\text{Acetato} + H_2O \rightarrow HCO_3^- + CH_4$	-31.0
Metanogénesis a partir de otros substratos	
<i>Fórmico</i>	
$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	
<i>Metanol</i>	
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	
<i>Trans etil-amoniaco</i>	
$4(CH_3)_3N + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$	
<i>Dim etil-amoniaco</i>	
$2(CH_3)_2NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$	
<i>Monometil-amoniaco</i>	
$4(CH_3)NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_3$	

Figura 1.21: Principales reacciones metanogénicas (Ortiz, 2011)

1.4.2 Factores que regulan la biodegradación anaerobia:

1. pH y alcalinidad: el pH debe mantenerse próximo a la neutralidad, variando entre 6,5 y 7,5. En cuanto a la alcalinidad debe mantenerse entre 0,3 y 0,4 siendo controlado por la relación de alcalinidad entre los ácidos grasos volátiles (AGV) y el bicarbonato (AGROWASTE, 2013).

2. Potencial redox: con valores recomendados inferiores a -350 mV (AGROWASTE, 2013).

3. Nutrientes: con valores que no aseguren el crecimiento de los microorganismos. Las principales fuentes de alimento son el carbono (C) y el nitrógeno (N₂) por lo que la relación entre ellos (C/N₂) tiene una gran importancia, siendo recomendable entre 20 y 30 (AGROWASTE, 2013).

4. Tóxicos e inhibidores: Las sustancias inhibitoras que se forman o están ya presentes durante el proceso de digestión anaerobia reducen el rendimiento de dicha digestión, por ejemplo a determinados niveles de AGV se generan serios problemas de inhibición combinados con bajos niveles de pH o los problemas

causados por el amonio, el ácido sulfhídrico o los ácidos de cadena larga (AGROWASTE, 2013).

5. **Temperatura:** A medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos y se acelera el proceso de digestión dando lugar a mayores producciones de biogás. Se distinguen dos rangos fundamentales: el rango mesófilo (25°C y 45°C) que es el más utilizado y el rango termófilo (45°C y 65°C) que cada que se está usando más ya que permite conseguir una mayor velocidad del proceso y una mejor eliminación de los organismos patógenos aunque suele ser más inestable a cualquier cambio en las condiciones de operación y presenta mayores problemas de inhibición a compuestos como el amoniaco (AGROWASTE, 2013).

6. **Agitación:** Es necesario transferir un determinado nivel de energía necesario para favorecer la transferencia de sustrato a la población de bacterias siendo necesario un buen equilibrio entre una buena homogeneización y la correcta formación de agregados bacterianos (AGROWASTE, 2013).

1.5 Integración del proceso

En la actualidad existe un gran esfuerzo para lograr la viabilidad económica del uso de la biomasa ligninocelulósica como una nueva fuente de azúcares para la producción de biocombustibles. La no viabilidad se debe sobre todo al coste de los enzimas y al no aprovechamiento de los coproductos que se generan en el pretratamiento de la biomasa. Además dicha biomasa, tiene un gran potencial para trabajar de forma integrada con otros procesos, esto conduce a un complejo productivo de mayor eficiencia técnica, económica y ambiental, y una reducción de los consumos de energía. El objetivo es el uso eficiente de la biomasa ligninocelulósica como materia prima para la producción integrada de combustibles, energía y productos químicos, para ello se lleva a cabo la integración del proceso (González et al., 2014).

La integración del proceso nos permite la minimización de los requerimientos energéticos, la minimización de la generación de residuos, la maximización de la eficiencia del proceso o la optimización del proceso o de una etapa de éste (González et al., 2014).

El proceso que tiene lugar consiste en la producción de bioetanol de segunda generación a partir de bagazo de azúcar, el cual es sometido primero a una etapa de pretratamiento que mejore la digestibilidad de la materia prima. Una vez que el bagazo ha sido pretratado se somete a una etapa de hidrólisis enzimática donde los polisacáridos son transformados en sus unidades monoméricas. Luego tendría lugar la etapa de fermentación donde los azúcares fermentables presentes en los hidrolizados son convertidos a etanol mediante microorganismos y por último una

etapa de aprovechamiento de los residuos de la fermentación para producir biogás mediante biodegradación anaerobia.(Bolado-Rodríguez et al., 2016) [10].

El inconveniente de este proceso es que se requiere una gran cantidad de energía. Sin embargo la posibilidad de utilizar el material ligninocelulósico en su totalidad vinculando así la producción de bioetanol con la coproducción de combustibles, podría reducir los costes de producción y reutilizar el material en exceso y los subproductos generados. Por ello los residuos generados en el proceso de producción de bioetanol pueden ser utilizados como sustrato para la biodegradación anaerobia, dando lugar en presencia de un determinado inóculo y unas determinadas condiciones a biogás formado por metano, dióxido de carbono e hidrógeno (Rabelo et al., 2011).

La producción del biogás nos permite recuperar la mayoría de la energía que ha sido utilizada durante el proceso, haciendo dicho proceso económicamente viable y ambientalmente sostenible. Además los residuos de la biodegradación anaerobia también podrían ser utilizados posteriormente como fertilizante en suelos agrícolas (Rabelo et al., 2011).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es estudiar la producción integrada de etanol y metano a partir de bagazo de caña de azúcar pretratado mediante los pretratamientos térmico, ácido y básico. Para ello se han llevado a cabo los siguientes objetivos específicos:

- 1. Estudio de la influencia de los pretratamientos térmico, ácido y básico sobre la estructura del bagazo de caña de azúcar, mediante análisis de pérdida de masa y de los principales componentes estructurales (celulosa, xilano y lignina).**
- 2. Análisis de la etapa de hidrólisis enzimática para evaluar la capacidad de los pretratamientos estudiados en aumentar la digestibilidad de bagazo de caña de azúcar.**
- 3. Evaluar la fermentabilidad de los hidrolizados producidos por *Saccharomyces cereviae* para producción de etanol.**
- 4. Evaluar la capacidad de producción de biogás por biodegradación anaerobia de los residuos de fermentación.**
- 5. Realizar un balance preliminar del potencial de energía que podría ser producida a partir de la producción integrada de etanol y biogás del bagazo pretratado, hidrolizado y fermentado.**

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

El material ligninocelulósico que se utilizó durante este estudio ha sido el bagazo de caña de azúcar procedente de la fábrica de azúcar y etanol Usina Vale, de la ciudad de Onda Vale, Estado de São Paulo (Brasil). El bagazo recogido en la factoría se lavó para la eliminación del material particulado, se secó en un horno ventilado a 37°C y se molió en un triturador agrícola hasta un tamaño entre 3-5 mm (Travaini et al., 2013).



Figura 3.1: Bagazo de caña de azúcar [15]

La composición del bagazo utilizado se recoge en la Tabla 2.1 (Travaini et al., 2013):

Componente (% m/m)*	Bagazo de caña de azúcar
Celulosa	46,21±0,10
Hemicelulosa	20,86±0,05
Lignina ácida insoluble	19,54±0,03
Lignina ácida soluble	3,13±0,04
Cenizas	1,19±0,10
Resultados en porcentaje de masa en base seca.	

Tabla 3.1: Composición de la materia prima

3.2 Pretratamientos

Se han elegido los siguientes pretratamientos para pretratamiento de la biomasa: térmico, ácido, utilizando HCl y básico, utilizando NaOH como catalizador cuyas condiciones han sido establecidas por Bolado-Rodríguez et al. (2016) Hernández-Salas et al. (2009), y Toquero & Bolado, (2014). Una, denominada caso bajo, con buenos resultados de azúcares y con la menor generación de inhibidores y otra, denominada caso alto, con la mayor generación de azúcares, independiente de los inhibidores encontrados por los autores. Las condiciones detalladas se describen a continuación:

3.2.1 Térmico

En el pretratamiento térmico, 10% (w/w, base seca) de bagazo se suspendieron en agua destilada botellas de borosilicato de 250 mL selladas. Las botellas conteniendo bagazo y agua se introdujeron en el autoclave, y se les mantuvo a la presión de 1 bar y a la temperatura de 121°C durante 1 hora para el caso bajo, y 2 horas para el caso alto (Bolado-Rodríguez et al., 2016) (Cardona et al., 2010). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada condición estudiada.

3.2.2 Ácido

En el pretratamiento ácido, 10% (w/w, base seca) de bagazo se suspendieron en una disolución de HCl de concentración 0,34% (m/m), para el caso bajo, y en otra disolución de 1,50% (m/m) de HCl, para el caso alto. Los ensayos fueron realizados en botellas de borosilicato de 250 mL selladas, y el pretratamiento ocurrió en autoclave durante 1 hora a la presión de 1 bar y a la temperatura de 121°C (Bolado-Rodríguez et al., 2016) (Hernández-Salas et al., 2009). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada condición estudiada.

3.2.3 Básico

En el pretratamiento básico, 10% (w/w, base seca) de bagazo se suspendieron en una disolución de NaOH 1% (m/m), para el caso bajo, y en disolución de 2% (m/m), para el caso alto. Ambos ensayos fueron realizados en botellas de borosilicato de 250 mL selladas. Luego dichas disoluciones se introdujeron en el autoclave para el pretratamiento durante 1 hora para el caso alto, y 2 horas para el caso bajo, a la presión de 1 bar y a la temperatura de 121°C (Bolado-Rodríguez et al., 2016) (Hernández-Salas et al., 2009). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada condición estudiada.

Después de cada pretratamiento, el autoclave era abierto y las botellas sacadas a enfriar, y una vez a temperatura ambiente la mezcla obtenida separaba mediante filtración a vacío para recuperación del sólido.

3.3 Hidrólisis enzimática

Los sólidos pretratados obtenidos se hidrolizaron enzimáticamente en matraces Erlenmeyer de 100 mL a un 6% (m/m) de materia seca en disolución tampón de citrato de sodio 0,1 M y pH=4,8, con un volumen final de 25 mL. Se les agregó enzimas comerciales, en la cantidad de 10 FPU/g celulosa y 30 CPU/g celulosa. Se ha tenido en cuenta la cantidad de celulosa en el bagazo *in natura*, descrito por Travaini et al. (2013). La hidrólisis se llevaron a cabo durante 48 horas a 50°C y 300 rpm, y los hidrolizados obtenidos se centrifugaron a 20000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de filtros de 0,22 µm y se les almacenaron congelados hasta el momento del análisis por cromatografía para cuantificación de azúcares (Travaini, Barrado, & Bolado-Rodríguez, 2016).

Para los cálculos de rendimiento, la masa de azúcares liberados se dividió por la masa inicial del polímero de azúcar correspondiente en la materia prima y se le multiplicó por 100. (Travaini et al., 2016a).

3.4 Fermentación

3.4.1 Microorganismo y medio de crecimiento

La fermentación de los hidrolizados se realizó utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* bakery que se encontraba almacenada en placas de Petri con medio YEPD a 4°C. (Travaini, Barrado, & Bolado-Rodríguez, 2016).

La levadura fue traspasada desde las placas a medios de cultivo YEPD para preparación del pre-inoculo previamente esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C. El microorganismo se transfirió en condiciones de esterilidad desde la placa petri al medio de cultivo y se le incubó durante 24 horas a 175 rpm y 30°C en erlenmeyers de 250 mL con tapón de algodón (Travaini et al., 2016a).

3.4.2 Experimentos de fermentación

Los sólidos pretratados e hidrolizados se transfirieron a *penicillin flasks* de 100mL , y se les suplementó con disolución de sales y nutriente(4 g/L de extracto de levadura 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, 2 g/L de KH₂PO₄ y 0,75 g/L de MgSO₄*7 H₂O, (Wanderley et al., 2013)) y se inocularon con 5,5% v/v del pre-inóculo crecido.

Las fermentaciones se realizaron en forma semi-anaeróbica (con oxígeno presente en el espacio no ocupado por líquido de los *penicillin flasks*), a 30°C y 175 rpm durante 24 horas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Una vez finalizadas las fermentaciones, se les centrifugaron a 20.000 xg durante 5 minutos para separación del sólido. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0,22 µm y se analizaron por cromatografía para analizar su contenido en cuanto a azúcares y etanol (Travaini et al., 2016a).

3.4.3 Cálculo del rendimiento de etanol

Los resultados de producción de liberación de glucosa y de etanol producido en g/L, obtenidos por cromatografía (método descrito en el apartado 3.6.3), fueron utilizados para calcular los rendimientos de conversión respecto al máximo teórico, como descrito en la Ecuación 1.

$$\% \text{ rendimiento glucosa en etanol} = \frac{\frac{\text{g}}{\text{L}} \text{ etanol obtenidos}}{\frac{\text{g}}{\text{L}} \text{ glucosa inicial}} * 0,511 * 100 \text{ eq(1)}$$

3.5 Biodegradabilidad anaerobia

Las pruebas para determinar el potencial bioquímico de metano (BMP) se llevaron a cabo para estudiar la biodegradabilidad de la materia prima pretratada en el caso del pretratamiento térmico, y de los residuos procedentes de la hidrólisis y

fermentación, para los pretratamientos ácido y básico. Los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados presentados son la media obtenida.

Los ensayos tuvieron lugar en condiciones mesófilas (35-40°C) en botellas de borosilicato de 120 mL de volumen, en posición vertical agitadas orbitalmente a 200 rpm. Las muestras fueron añadidas y suplementadas con macronutrientes y micronutrientes, tamponadas con bicarbonato de sodio (Rabelo et al., 2011) y finalmente inoculadas con fango activo, y luego desoxigenadas con corriente de He. El inóculo utilizado para los ensayos fue cogido de un digester anaerobio mesófilo de una planta de tratamiento de aguas residuales. El inóculo fue pre incubado 4 días para minimizar el contenido en materia orgánica residual (Ferreira et al., 2013).

El inóculo se añadió en una relación sustrato/inóculo de 0,5 g SV_s/g SV_l. El volumen de trabajo fue de aproximadamente 40 mL, con el objetivo de tener suficiente espacio para la producción de gas. Una prueba de control sin sustrato también se llevó a cabo, para restar la cantidad de metano producida por este (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

La producción de biogás en el espacio superior de la botella se midió de forma periódica con un transmisor de presión manual (PN5007, rango 0-1 bar, IFM Electronics) durante un período de 35 días. La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases. El rendimiento específico de metano se expresa como el volumen de CH₄ en condiciones normales, es decir, a 25 grados y a 1 atmósfera para los gases, por gramos de SV de sustratos alimentados en el ensayo (N ml CH₄/g SV); como define la Unión Internacional de Química Aplicada (IUPAC) (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 ST y SV

Los sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) son medidos mediante los procedimientos establecidos en los métodos estándares para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA-AWWA-WEF, 2005).

3.6.2 Caracterización

Para determinar la composición del sustrato en términos de cenizas, lignina, celulosa (como glucosa) y hemicelulosa (como xilosa) en el bagazo pretratado se siguieron los métodos analíticos del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de EE.UU, según protocolo específico (Sluiter et al., 2012).

3.6.3 Análisis de azúcares y etanol por HPLC

Mediante cromatografía líquida de alta resolución fueron medidos cuantitativamente glucosa, xilosa y etanol. El cromatógrafo utilizado fue un HPLC Waters Alliance e2695 con una columna Phenomenex HPLC Rezex™ RPM-Monosaccharide 300x7,8 mm a 80°C con agua MilliQ como eluyente a un flujo de 0,6 mL/min, equipado con un detector de índice de refracción (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

3.6.4 GC (gas chromatography)

La composición del biogás (CO₂, H₂S, O₂, N₂, CH₄) se midió por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo Varian CP-177 3800 GC-TDC equipado con una columna CP-Pora BOND Q utilizando helio como gas portador (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

3.7 Determinación de los parámetros cinéticos

Los datos de producción de metano acumulado de los experimentos fueron ajustados a un modelo de primer orden (eq(2)), a la ecuación de Gompertz modificada (eq(4)). La ecuación de primer orden se aplica cuando la etapa de hidrólisis es la etapa limitante del proceso. La ecuación de Gompertz se aplica cuando se observa un comportamiento inhibitorio del sustrato, suponiendo que la producción de metano es función del crecimiento bacteriano (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

$$B = B_0 * [1 - \exp(-k_H * t)] \quad (eq(3))$$

$$B = B_0 * \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_m * e}{B_0}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (eq(4))$$

B: Producción de metano acumulado (mL CH₄/ g SV)

B₀: Potencial de producción de metano (mL CH₄/ g SV relacionado con la biodegradabilidad del sustrato)

t: Duración del ensayo (días)

k_h : Coeficiente de hidrólisis (días^{-1})

R_m : tasa máxima de producción de biogás ($\text{mL CH}_4/\text{g SV} \cdot \text{d}$)

λ : tiempo de retraso (días)

4. Resultados y discusiones

4.1 Pérdida de masa

Durante el pretratamiento se produjeron pérdidas de masa en el sólido pretratado, debido a la solubilización de componentes estructurales del bagazo en el líquido de pretratamiento.

En la Tabla 4.1 se muestra la pérdida de masa del bagazo para cada pretratamiento:

Pretratamiento	Pérdida de masa (%)
Térmico caso bajo	10,68
Térmico caso alto	15,38
Ácido caso bajo	27,50
Ácido caso alto	32,82
Básico caso bajo	12,72
Básico caso alto	23,95

Tabla 4.1: Pérdidas de masa

En el caso del pretratamiento térmico, las pérdidas de masa son las menores (11-15%) de los tres pretratamientos testados. Esto es debido a que este pretratamiento posee baja capacidad de ataque a la biomasa lignocelulósica, ya que actúa abriendo los poros de materia y solubilizando los componentes menos recalcitrantes por hidrólisis (Cho et al., 2013).

En el pretratamiento básico la pérdida de masa en el caso alto es casi el doble que en el caso bajo, demostrando que las condiciones de operación han influenciado fuertemente en el pretratamiento (Sambusiti et al., 2012).

La mayor pérdida de masa se obtiene con el pretratamiento ácido (28-33%). Al contrario del pretratamiento básico, donde las pérdidas de masa fueron influenciadas por las condiciones de operación, un aumento de 4 veces en la cantidad de ácido ha llevado a apenas un ligero aumento en la solubilización del bagazo en la fase líquida (Cheng et al., 2008; Sun and Cheng, 2005).

4.2 Caracterización del bagazo pretratado

En la Tabla 3.2 se muestra la composición del bagazo, en porcentaje de los polímeros de azúcares (celulosa y xilano) y de las ligninas (ácida insoluble y ácida soluble).

Muestra	LAI	LAS	Celulosa	Xilano
In natura	19,50	3,13	46,21	20,86
Térmico caso bajo	17,32	4,04	46,87	20,02
Térmico caso alto	17,25	3,86	46,02	20,23
Básico caso bajo	11,35	6,06	46,98	21,87
Básico caso alto	10,34	7,08	49,97	20,56
Ácido caso bajo	22,05	3,96	43,59	15,15
Ácido caso alto	24,53	4,95	38,92	10,43

Tabla 4.2: Caracterización del bagazo *in natura* y pretratado por proceso térmico, ácido y básico.

Como se puede ver cada uno de los pretratamientos influye de manera diferente en la materia prima, provocando una alteración en sus componentes estructurales.

El pretratamiento térmico, con una reducida pérdida de masa total, produce una pequeña disminución de la lignina ácida insoluble con respecto a la materia prima sin tratar, de 19,5% a 17,32% para el caso bajo y a 17,25% para el caso alto. Esto quiere decir que una parte de la lignina se degrada o bien se solubiliza en el líquido. La cantidad de azúcares se mantiene más o menos constante, revelando un ataque bajo a estos, aproximadamente del mismo orden que la pérdida de masa total.

En el caso del pretratamiento básico se produce una disminución del porcentaje de lignina ácida insoluble muy notable para los dos casos debido a que se produce una digestión de la matriz de lignina (Sambusiti et al., 2012). Para el caso bajo hubo una disminución del 40% en el contenido de lignina y del 50% para el caso alto. Estos valores, unidos a las pérdidas de masa totales, corroboran el fuerte efecto de las condiciones de operación, encontrados para las pérdidas de masa. Los aumentos encontrados en la cantidad de lignina ácida soluble se deben a la transformación de la lignina ácida insoluble en soluble (García-Cubero et al., 2012). El pequeño cambio en los porcentajes de azúcares revela que el pretratamiento ha generado bajo ataque a estos.

En el caso del pretratamiento ácido, al revés de los demás, se produce una disminución notable en los porcentajes de polímeros de azúcares, con valores más acentuados para el caso alto. Se observó sobretodo una disminución en las cantidades de xilano, debido a su mayor solubilidad en ambiente ácido (Hernández-Salas et al., 2009). El aumento relativo en las cantidades de lignina en el sólido pretratado es debido a la disminución en los polímeros de azúcares.

4.3 Hidrólisis

El pretratamiento del bagazo de caña incrementa los rendimientos de hidrólisis en comparación con el bagazo sin tratar. Esto es resultado de los cambios sufridos tras el pretratamiento, en los que la estructura tridimensional de la biomasa y su cristalinidad sufren una alteración que favoreciendo al ataque enzimático (Sun and Cheng, 2002). En la Tabla 4.3 se presentan los rendimientos de conversión de celulosa y xilano en glucosa y xilosa, respectivamente. Se presentan los valores de conversión en porcentaje respecto al sólido pretratado y también al bagazo de caña de azúcar *in natura*. Para los rendimientos de hidrólisis respecto al sólido pretratado, se ha tenido en cuenta la pérdida de masa (Tabla 4.1) y la composición del sólido pretratado (Tabla 4.2); mientras que, para el rendimiento respecto al bagazo *in natura*, se ha tenido en cuenta la cantidad de polímeros de azúcares en el bagazo inicial.

Muestra	Celulosa		Xilano	
	Rendimiento sólido pretratado (%)	Rendimiento bagazo <i>in natura</i> (%)	Rendimiento sólido pretratado (%)	Rendimiento bagazo <i>in natura</i> (%)
Térmico caso bajo	7,76	7,02	6,99	5,98
Térmico caso alto	8,60	7,28	12,36	10,12
Básico caso bajo	47,56	35,06	54,76	41,63
Básico caso alto	53,12	38,59	65,88	43,58
Ácido caso bajo	27,16	22,34	73,48	46,54
Ácido caso alto	43,86	28,08	95,60	49,38

Tabla 4.3: Rendimientos de conversión de celulosa y xilano tras los pretratamientos, respecto al sólido pretratado y al bagazo *in natura*.

Como se esperaba, tras los cambios estructurales obtenidos, el pretratamiento térmico se reveló poco eficiente en aumentar la digestibilidad del bagazo. Los valores obtenidos, respecto al sólido pretratado y al bagazo *in natura*, son muy parecidos al 6,64% de conversión de celulosa y al 2,05% de xilosa obtenidos por Travaini et al. (2013) con bagazo sin pretratamiento.

El pretratamiento básico por otro lado, fue el que produjo un sólido con mejor capacidad de ser hidrolizado, con los mayores rendimientos de glucosa obtenidos. Pese a que las dos condiciones de operación testadas han producido cambios estructurales muy diferentes, los rendimientos para ambas condiciones son muy parecidos. Eso puede haber sido debido o bien a una baja modificación en la cristalinidad de los polímeros de azúcares reminiscentes en el sólido pretratado, o bien por inhibición de las enzimas utilizadas (Kim et al., 2012; Roncero et al., 2003).

Los bajos rendimientos obtenidos con el bagazo pretratado por ácido, respecto al bagazo *in natura*, fueron debido a la alta solubilización de los polímeros de azúcares en el líquido de pretratamiento (Hernández-Salas et al., 2009; Rezende et al., 2011). Eso se comprueba por los rendimientos respecto al sólido pretratado, ya que este ha sido satisfactoriamente hidrolizado. Para el xilano, los mayores rendimientos si se tiene en cuenta la conversión respecto al sólido pretratado, probablemente debido a que este se ha vuelto muy hidrolizable tras el pretratamiento.

4.4 Fermentación

Las fermentaciones de los hidrolizados se condujeron utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* bakery, capaz apenas de aprovechar la fracción glucosa. El pretratamiento térmico no fue utilizado para fermentación debido a los bajos rendimientos de azúcares obtenidos tras la hidrólisis enzimática.

En la Tabla 4.4 se muestran las cantidades iniciales y finales de glucosa en las fermentaciones, el porcentaje que se ha consumido, los g/L de etanol producidos y el rendimiento de la fermentación, respecto al máximo teórico.

GLUCOSA DEL BAGAZO SIN LAVAR					
Muestra	Glucosa inicial (g/L)	Glucosa final (g/L)	Consumo (%)	Etanol producido (g/L)	Rendimiento respecto al máximo teórico (%)
Básico caso bajo	9,72	1,72	80,37	3,01	60,65
Básico caso alto	10,70	2,18	70,02	3,04	55,10
Ácido caso bajo	6,20	1,41	74,85	1,76	55,72
Ácido caso alto	7,79	1,35	80,73	2,33	58,58

Tabla 4.4 Etanol y rendimiento producido tras la fermentación

Se puede ver que los porcentajes de consumición de glucosa para los dos pretratamientos son muy similares, moviéndose entre el 70-80%, una alta tasa de aprovechamiento que indica escaso efecto inhibitor por los pretratamientos empleados.

En el caso del pretratamiento básico la cantidad etanol que se ha producido es de 3 g/L para ambos casos, siendo el más eficiente de los pretratamientos gracias a la mayor liberación de glucosa durante la etapa de hidrólisis. Datos similares para dicho pretratamiento fueron encontrados por Hernández-Salas et al. (2009), con la diferencia de que se obtiene mayor cantidad de etanol (12-13 g/L) debido a una mayor cantidad de azúcares de partida.

En el caso del pretratamiento ácido, la cantidad de etanol producida para el caso alto es de 2,3 g/L y para el caso bajo es de 1,76 g/L. Estos rendimientos más bajos son debido a la menor cantidad de glucosa disponible tras la hidrólisis enzimática, ya que se ha producido una gran solubilización de la celulosa en el líquido de pretratamiento al igual que ocurre en Hernández-Salas et al. (2009).

En cuanto al rendimiento de etanol se han obtenido rendimientos muy similares para todos los ensayos, siendo para el básico del 55-61% y para el ácido del 55-59%. Esto confirma una vez más que no hubo inhibición, y que los bajos rendimientos son debidos a la baja cantidad de azúcares de la que se partió para las fermentaciones (Travaini et al., 2016a, 2016b). Los rendimientos obtenidos son mayores que en el caso de Hernández-Salas et al. (2009), donde al partir de mayor cantidad de azúcares sus rendimientos están entre 38-50% para el pretratamiento básico y entre 29-35% para el ácido.

4.5 Producción de biogás

El estudio de biodegradabilidad anaerobia se ha llevado a partir de la fracción sólida procedente del pretratamiento térmico y a partir de los residuos generados durante la fermentación del bagazo pretratado de forma ácida y básica. Cada uno de los pretratamientos se llevan a cabo bajo con dos condiciones de operación diferentes, como anteriormente descrito (sección 3.2), cuyos resultados experimentales son representados de forma conjunta.

La influencia de dichos pretratamientos sobre la materia prima ha sido estudiada en términos de la producción de metano, teniendo en cuenta 3 parámetros:

1. el rendimiento de metano, definido como el volumen de gas metano producido por gramo de sólido volátil alimentado en los BMPs;

2. la biodegradabilidad, definida como la relación entre la producción de metano por gramo de sólido volátil a partir del sustrato pretratado y el rendimiento teórico de metano del sustrato *in natura*;
3. la producción de metano normalizada (NP), definida como la relación entre la producción de metano por gramo de sólido volátil a partir de sustratos tratados y no tratados.

El bagazo de caña de azúcar *in natura* tiene una producción máxima de metano acumulada de 218,4 mL CH₄/g SV, y una biodegradabilidad del 52%, con una cinética de primer orden (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

Las curvas de producción de metano acumulado a partir de la fracción sólida de bagazo pretratado aplicando el pretratamiento térmico para el caso bajo (1) y para el caso alto (2) se representan en la Figura 4.1:

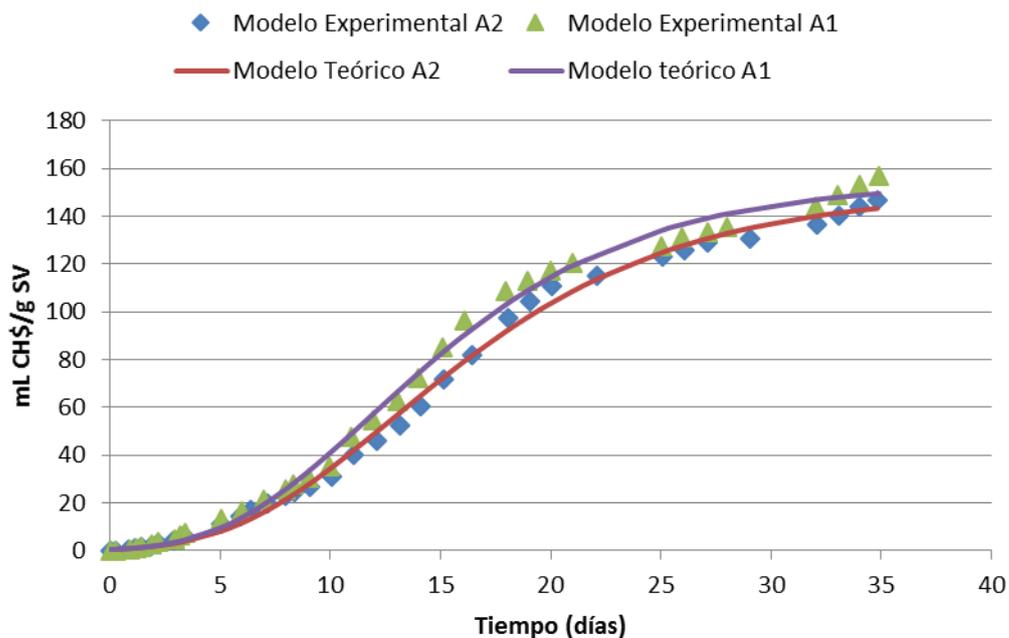


Figura 4.1 Producción acumulada de metano a partir de la fracción sólida de bagazo pretratado aplicando el pretratamiento térmico

El pretratamiento térmico proporcionó una producción de metano acumulada de 157 mL CH₄/g SV para el caso bajo y de 147 mL CH₄/g SV para el caso alto. En cuanto a la biodegradabilidad para el caso bajo fue del 37% y para el caso alto del 35%. Por último, el NP para el caso bajo es de 0,72 y para el caso alto es de 0,67.

Los valores obtenidos para la producción de metano acumulada y la biodegradabilidad son inferiores a los del bagazo *in natura*, descritos por Bolado-

Rodríguez et al. (2016) y Costa et al. (2014). Eso es debido a la solubilización de sólidos volátiles biodegradables en el líquido de pretratamiento, como se ha visto en el apartado de cambios estructurales.

Si se comparan los dos pretratamientos térmicos, vemos que los dos adquieren la misma forma en cuanto a su evolución cinética, observándose un pequeño periodo de adaptación (4-5 días) de los microorganismos al sustrato que se conoce como fase lag, una vez pasado ese tiempo la producción de biogás aumenta de manera más o menos lineal hasta llegar un momento en el que se estabiliza.

Las curvas de producción de metano acumulado a partir del residuo resultante del proceso de pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación, aplicándose el pretratamiento ácido para el caso bajo (1) y para el caso alto (2), se representan en la Figura 4.2:

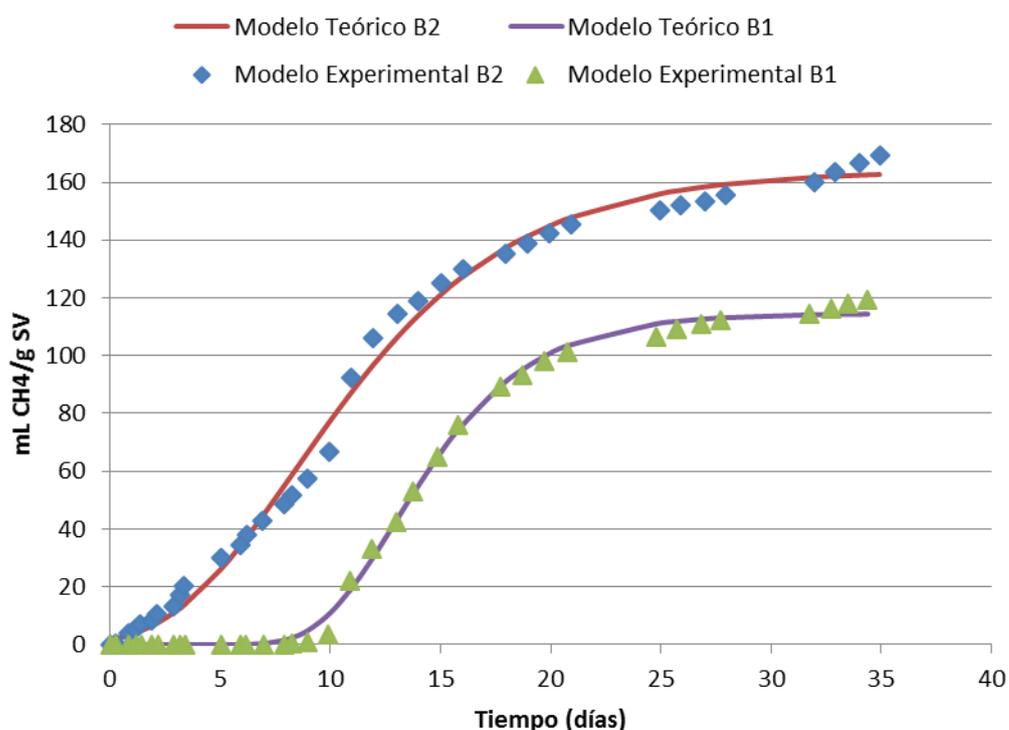


Figura 4.2: Producción de metano acumulada a partir del residuo de bagazo fermentado y pretratado aplicando el pretratamiento ácido

El residuo de fermentación del pretratamiento ácido proporciona una producción de metano acumulada de 119 mL CH₄/g SV para el caso bajo y de 170 mL CH₄/g SV para el caso alto. En cuanto a la biodegradabilidad para el caso bajo es del

28% y para el caso alto del 40%. Por último, el NP para el caso bajo es de 0,55 y para el caso alto es de 0,78.

Como se ve en los dos casos los valores obtenidos para la producción de metano acumulada y para la biodegradabilidad, son inferiores a los del bagazo *in natura* de Costa et al. (2014). Esta baja actividad metanogénica se debe a que los SV que han quedado en el sólido son menos biodegradables. Los azúcares, que son la fracción más biodegradable, parte se han solubilizado durante el pretratamiento y otra parte se han utilizado para producir etanol durante las etapas de hidrólisis y fermentación, restando mayoritariamente lignina y polímeros de azúcares de difícil degradación (Costa et al., 2014). Entretanto, la cantidad de metano obtenida es más alta que en Bolado-Rodríguez et al. (2016) utilizando solamente el sólido pretratado por ácido, eso probablemente es debido al aumento de la biodegradabilidad de determinados compuestos durante las etapas de hidrólisis y fermentación, y también a las células de levaduras producidas, que son de fácil biodegradabilidad.

Al comparar los dos pretratamientos ácidos, se ve una clara diferencia entre las dos curvas cinéticas, para el caso bajo existe una fase lag de aproximadamente 10 días, en cambio, para el caso alto no existe fase lag. Esto es debido a que el residuo de fermentación del caso alto es más biodegradable que el del caso bajo, probablemente porque los azúcares restantes en el sólido estén menos accesibles en el último caso, aumentando el tiempo para su conversión.

Las curvas de producción de metano acumulado a partir del residuo de bagazo pretratado, hidrolizado y fermentado, aplicándose el pretratamiento básico para el caso bajo (1) y para el caso alto (2) se representan en la Figura 4.3:

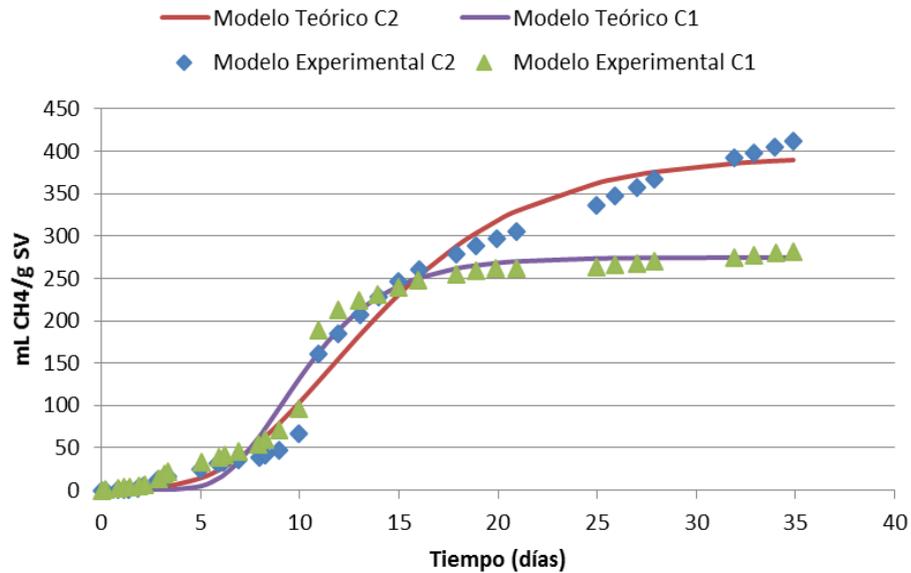


Figura 4.3: Producción de metano acumulada a partir del residuo de bagazo fermentado y pretratado aplicando el pretratamiento básico.

El pretratamiento básico proporciona una producción de metano acumulada de 281,34 mL CH₄/g SV para el caso bajo y de 412,48 mL CH₄/g SV para el caso alto. En cuanto a la biodegradabilidad para el caso bajo es del 67% y para el caso alto del 98%. Por último, el NP para el caso bajo es de 1,29 y para el caso alto es de 1,89.

Como se ve en los dos casos los valores obtenidos para la producción de metano y para la biodegradabilidad son mayores que los obtenidos con el bagazo *in natura* descritos por Bolado-Rodríguez et al. (2016). Esto se debe, a que la mayoría de la lignina es solubilizada durante el pretratamiento, y que las etapas de fermentación e hidrólisis no removido todo el contenido de azúcares, resultado en un sólido de fácil conversión (Costa et al., 2014).

Al comparar los dos pretratamientos básicos, se ve que inicialmente las 2 curvas cinéticas son casi iguales, teniendo las dos una fase lag de aproximadamente 5-6 días. El caso bajo se comienza a estabilizar a partir de los 15 días, en cambio, el caso alto hasta los 25 días no lo hace, esta diferencia se debe a que el pretratamiento básico en el caso alto es más fuerte al ser mayor la concentración de NaOH provocando que la digestión de la matriz de lignina sea mayor y más eficiente y se genere mayor cantidad de metano acumulado.

Las curvas de producción de metano a partir de bagazo de caña de azúcar para los AGV's se representan en la Figura 4.4:

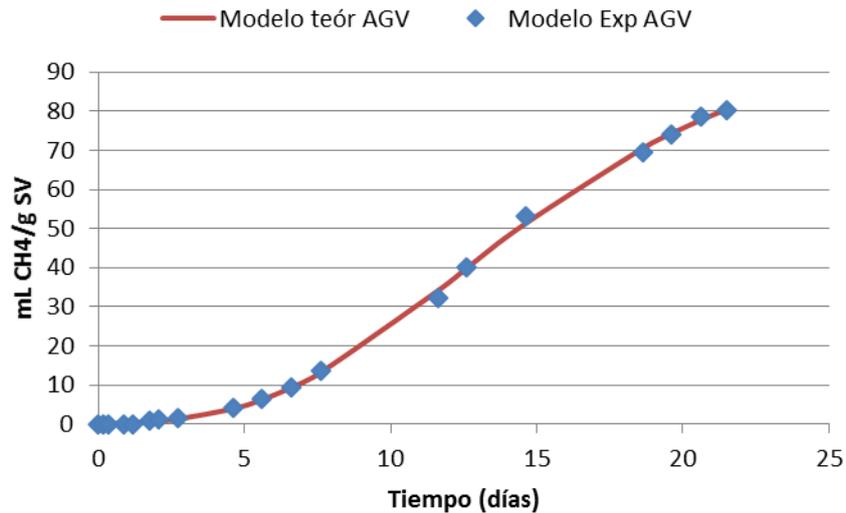


Figura 4.4: Producción de metano acumulada a partir de una disolución de ácidos grasos volátiles (AGV)

En este ensayo, se lleva a cabo con una disolución que contiene 3 ácidos grasos volátiles (AGV): ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico. Si estos ácidos son transformados a metano rápidamente por los microorganismos presentes en el inóculo, se asegura que el inóculo utilizado estaba en buenas condiciones.

Como se observa en la gráfica de la Figura 4.4, la cantidad de metano acumulada crece de manera mucho más rápida que en cualquiera de los pretratamientos utilizados anteriormente, ya que la etapa de acidogénesis no se produce al tener los ácidos directamente en la disolución, además de que los microorganismos necesitan muy poco tiempo para adaptarse (2-3 días).

4.6 Cinéticas

La producción de metano para el pretratamiento térmico se ajustó con la cinética de Gompertz modificada ya que la ecuación considera la adaptación de los microorganismos al sustrato, que constituye la etapa limitante del proceso. A diferencia de lo que ocurre en Bolado-Rodríguez et al. (2016) donde se ajustó con una cinética de primer orden ya que no existía dicha fase de adaptación.

La producción de metano para el residuo de fermentación del pretratamiento ácido se ajustó también mediante la cinética de Gompertz modificada, hecho que se puede apreciar sobre todo en el caso bajo. Estos resultados son diferentes de los que presenta Bolado-Rodríguez et al. (2016), para el sólido solamente pretratado por ácido, donde no existe fase de lag y se ajustó con una de primer orden. Estas diferencias deben de ser debido principalmente a la baja cantidad de azúcares presente en el sólido utilizado, ya que los microorganismos tendrían que

adaptarse para utilizar la parte más recalcitrante de la lignina restante tras hidrólisis e fermentación.

Por último la producción de metano para el pretratamiento básico, al igual que para los otros dos pretratamientos, se ajustó con la cinética de Gompertz modificada. En este caso, cuando comparado con Bolado-Rodríguez et al. (2016), donde el ajuste ha sido de primer orden, probablemente hubo inhibición de los microorganismos por compuestos secundarios producidos durante el pretratamiento.

El proceso de adaptación de los microorganismos es evidente en los tres pretratamientos estudiados para el sustrato utilizado, pero con diferente intensidad. Además, observando el ratio de producción de metano máximo, existe una notable diferencia entre los pretratamientos térmico y ácido, y el básico, ya que éste produce una mayor cantidad de metano diaria.

En la Tabla 4.5 se puede ver un resumen de los parámetros cinéticos de cada modelo en función del pretratamiento aplicado:

Pretratamiento	Módulo	B ₀	K _H	λ	R _m	R ²
Bagazo sin pretratar	Primer orden	222,00	0,083	-	-	0,9884
Térmico caso bajo	Gompertz modificado	154,46	0,149	5,17	22,98	0,9962
Térmico caso alto	Gompertz modificado	150,47	0,137	5,56	20,66	0,9969
Ácido caso bajo	Gompertz modificado	114,62	0,291	9,49	33,32	0,9979
Ácido caso alto	Gompertz modificado	164,09	0,180	2,85	29,59	0,9940
Básico caso bajo	Gompertz modificado	274,61	0,343	6,16	94,24	0,9862
Básico caso alto	Gompertz modificado	395,26	0,182	6,09	71,98	0,9873
AGV's	Gompertz modificado	101,77	0,156	5,78	15,87	0,9994

Tabla 4.5: Modelos cinéticos y parámetros de ajuste de las ecuaciones de producción de metano acumulada a partir de materia prima pretratada utilizando la fracción sólida del pretratamiento.

B₀: Potencial de producción de metano (mL CH₄/ g SV relacionado con la biodegradabilidad del sustrato)

k_H: Coeficiente de hidrólisis (días⁻¹)

R_m: tasa máxima de producción de biogás (mL CH₄/ g SV*d)

λ : tiempo de retraso (días)

4.7 Potencial de energía a partir del metano producido

La cantidad de energía generada por el metano a partir del pretratamiento térmico y de los residuos procedentes de la fermentación de los pretratamientos ácido y básico se muestran en la Tabla 4.6:

Pretratamiento	NmL CH ₄ /g SV	MJ/kg bagazo
Térmico caso bajo	156,80	5,05
Térmico caso alto	146,73	4,49
Ácido caso bajo	119,21	1,91
Ácido caso alto	169,53	2,35
Básico caso bajo	281,34	3,58
Básico caso alto	412,48	3,36

Tabla 4.6: Energía generada por el metano.

El pretratamiento térmico es el que mayor cantidad de energía a partir del metano producido genera, obteniéndose 5 MJ CH₄/kg bagazo para el caso bajo y 4,5 MJ CH₄/kg bagazo para el caso alto, esto se debe a que el bagazo no ha sufrido el proceso de hidrólisis y fermentación, a diferencia de los pretratamientos ácido y básico, por lo tanto todos los azúcares están en el bagazo y permiten una gran obtención de energía, lo mismo que ha observado Costa et al. (2014) en un estudio similar.

El pretratamiento básico produce mayor cantidad de energía a partir del metano que el pretratamiento ácido, debido a la gran eficiencia del básico en la digestión de la matriz de lignina, generando un sólido con alto contenido de azúcares y de fácil accesibilidad. Esta energía extra obtenida en cada caso puede ser utilizada para satisfacer parte de las necesidades energéticas del proceso de producción de etanol.

4.8 Balance energético del proceso

Para conocer la producción total de energía generada en cada caso, se calcula la cantidad teórica de energía que sería obtenida a partir de la combustión del etanol y del metano.

En la Tabla 4.7 se puede ver la energía total generada por cada pretratamiento:

Pretratamiento	MJ EtOH/kg bagazo	MJ CH ₄ /kg bagazo	MJ Energia/kg bagazo
Térmico caso bajo	-	5,05	5,05
Térmico caso alto	-	4,49	4,49
Ácido caso bajo	0,79	1,90	2,69
Ácido caso alto	1,04	2,35	3,39
Básico caso bajo	1,34	3,56	4,90
Básico caso alto	1,35	3,37	4,72

Tabla 4.7: Producción de energía a partir del etanol

El pretratamiento básico para los dos casos genera mayor cantidad de energía a partir del etanol que el pretratamiento ácido, esto se debe a la mayor liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática y por tanto mayor producción de etanol en la fermentación (Hernández-Salas et al., 2009).

El pretratamiento térmico, solo genera energía a partir del metano producido durante el proceso de biodegradabilidad anaerobia, porque como se ha destacado antes, la liberación de azúcares durante la hidrólisis es muy baja haciendo ineficaz el proceso de producción de etanol.

Los pretratamientos térmico y básico permiten obtener la mayor cantidad de energía, 5 MJ/kg bagazo y 4,9 MJ/kg bagazo, respectivamente. La diferencia radica en que el térmico solo lo hace a partir del proceso de biodegradación anaerobia y el básico lo hace a partir del proceso de fermentación seguido del de biodegradación anaerobia.

Esta cantidad de energía obtenida permitiría satisfacer gran cantidad de la energía requerida durante el proceso global.

5. Conclusión

En este estudio, entre los pretratamientos, térmico, ácido y básico, este último se reveló el más eficiente para tratar el bagazo de caña de azúcar para la producción integrada de etanol y metano. Es donde se han obtenido también los mayores rendimientos de azúcares (39% y 44% de conversión de glucosa y xilosa) tras la hidrólisis enzimática y etanol tras la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* bakery (alrededor de 55% de rendimiento respecto al máximo teórico). El pretratamiento ácido resultó en menos rendimientos debido a la solubilización de azúcares durante el pretratamiento, y el pretratamiento térmico no se utilizó para fermentación debido a la baja conversión de azúcares durante la hidrólisis.

En cuanto a la producción de biogás a partir de la fracción sólida procedente de las fermentaciones, el pretratamiento básico proporcionó la mayor cantidad de metano con 412,6 NmL CH₄/g SV. El pretratamiento térmico y el ácido dieron cantidades de metano menores, debido a la poca solubilización de azúcares en el caso en el primer caso y debido a la formación de inhibidores en el segundo caso. Entretanto, el proceso de pretratamiento, hidrólisis y fermentación produjo un residuo con buenas características para producción de metano, y con alto potencial de biodegradabilidad.

El análisis energético preliminar reveló que el pretratamiento térmico aplicado solamente a la producción de biogás aportaría la mayor cantidad de energía final (5,0 MJ/kg bagazo), debido principalmente a las escasas pérdidas de masa durante el pretratamiento. Por otro lado, aplicando el pretratamiento básico para la producción integrada de etanol y metano, la cantidad de energía producida sería muy parecida (4,9 MJ/kg bagazo). Entretanto, el aprovechamiento de los compuestos solubilizados en el líquido del pretratamiento básico podría llevar a un proceso con un balance más favorable.

6. Bibliografía

- [1] <http://www.jmarcano.com/educa/curso/energia.html>
- [2] <http://www.jmarcano.com/educa/curso/energia2.html>
- [3] http://www.ecured.cu/Bagazo_de_ca%C3%B1a
- [4] <http://www.miliarium.com/Bibliografia/Monografias/Biocombustibles/Bioetanol.asp>
- [5] <http://erenovable.com/biogas-el-gas-combustible-alternativo/>
- [6] <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223123848002>
- [7] <http://www.innoversia.net/rfp/investigacion-880-1.html>
- [8] <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>
- [9] http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612015000200010
- [10] <http://www.datuopinion.com/bagazo>

AGROWASTE, 2013. Digestión Anaerobia 1–10.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, a J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59, 927–34. doi:10.2166/wst.2009.040

APHA-AWWA-WEF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C.

Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2011. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.* 102, 10868–10874. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.128

Bolado-Rodríguez, S., Toquero, C., Martín-Juárez, J., Travaini, R., García-Encina, P.A., 2016. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 201, 182–190. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.047

Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15, 550–583. doi:10.1039/c2gc36364j

- Buitrago, J., Tenjo, D., Hidalgo, B.Q., 2007. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae*. *Fac. Ciencias Microbiología*, 120.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C., 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 101, 4754–4766. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.097
- Cheng, K.-K., Cai, B.-Y., Zhang, J.-A., Ling, H.-Z., Zhou, Y.-J., Ge, J.-P., Xu, J.-M., 2008. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochem. Eng. J.* 38, 105–109. doi:10.1016/j.bej.2007.07.012
- Cho, S., Park, S., Seon, J., Yu, J., Lee, T., 2013. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresour. Technol.* 143, 330–6. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.017
- Costa, A.G., Pinheiro, G.C., Pinheiro, F.G.C., Dos Santos, A.B., Santaella, S.T., Leitão, R.C., 2014. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. *Chem. Eng. J.* 248, 363–372. doi:10.1016/j.cej.2014.03.060
- Energía, L.A., Vida, Y.L.A., Antonio, A., Georges, P., 1997. La energía y la vida.
- Ferreira, L.C., Donoso-Bravo, a, Nilsen, P.J., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2013. Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 143, 251–7. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.065
- García, A., Martínez, Á., 2012. Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion 1–263.
- García-Cubero, M.T., Palacin, L.G., Gonzalez-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M., 2012. An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone. *Bioresour. Technol.* 107, 229–34. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.010
- González, M., Castellanos, L., Albornas, Y., González, E., 2014. La integración de procesos en el esquema de una biorrefinería. *Afinidad Barcelona LXXII*, 4.
- Hernández-Salas, J.M., Villa-Ramírez, M.S., Veloz-Rendón, J.S., Rivera-Hernández, K.N., González-César, R.A., Plascencia-Espinosa, M.A., Trejo-Estrada, S.R., 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresour. Technol.* 100, 1238–1245. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.062
- Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2012. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2012.10.130
- Lee R. Lynd, Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, I.S.P., 2002. *Microbial Cellulose*

Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577. doi:10.1128/MMBR.66.3.506

Miguel, B.C., 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. 1 – 24.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–86. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025

Oliva, J., 2003. Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. doi:10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L

Ortiz, V., 2011. Puesta a punto de una metodología para la determinación de la actividad metanogénica específica (AME) de un fango anaerobio mediante el sistema OXITOP. Influencia de las principales variables experimentales. 112.

R.C. Saxena, D.K. Adhikari, H.B.G., 2009. Bioetanol De Paja De Trigo: Estrategias De Integración De Las Etapas Del Proceso., *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.

Rabelo, S.C., Carrere, H., Maciel Filho, R., Costa, a. C., 2011. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* 102, 7887–7895. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.081

Rakopoulos, D.C., Rakopoulos, C.D., Kakaras, E.C., Giakoumis, E.G., 2008. Effects of ethanol–diesel fuel blends on the performance and exhaust emissions of heavy duty DI diesel engine. *Energy Convers. Manag.* 49, 3155–3162. doi:10.1016/j.enconman.2008.05.023

Rezende, C.A., de Lima, M.A., Maziero, P., Deazevedo, E.R., Garcia, W., Polikarpov, I., 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 4, 54. doi:10.1186/1754-6834-4-54

Roncero, M.B., Colom, J.F., Vidal, T., 2003. Cellulose protection during ozone treatments of oxygen delignified Eucalyptus kraft pulp. *Carbohydr. Polym.* 51, 243–254. doi:10.1016/S0144-8617(02)00212-6

Sánchez, Óscar J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–5295. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013

Sambusiti, C., Ficara, E., Malpei, F., Steyer, J.P., Carrère, H., 2012. Influence of alkaline pre-treatment conditions on structural features and methane production from ensiled sorghum forage. *Chem. Eng. J.* 211-212, 488–492. doi:10.1016/j.cej.2012.09.103

Sánchez Riaño, A.M., Gutiérrez Morales, A.I., Muñoz Hernández, J.A., Rivera Barrero, C.A., 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos Bioethanol Production from agroindustrial

- lignocellulosic byproducts. *Tumbaga* 5, 61–91.
- Sims, R., Taylor, M., Jack, S., Mabee, W., 2008. From 1st to 2nd Generation Bio Fuel Technologies: An overview of current industry and RD&D activities. *IEA Bioenergy* 1–124.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory (NREL) - Golden, Colorado, USA.
- Speece, R.E., 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment a description of several installations. *Environ. Sci. Technol* 17, 416A–427A. doi:10.1139/I96-121
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- Sun, Y., Cheng, J.J., 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 96, 1599–606. doi:10.1016/j.biortech.2004.12.022
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms9091621
- Toquero, C., Bolado, S., 2014. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresour. Technol.* 157, 68–76. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.090
- Travaini, R., Barrado, E., Bolado-Rodríguez, S., 2016a. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 214, 150–158. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.102
- Travaini, R., Barrado, E., Bolado-Rodríguez, S., 2016b. Effect of ozonolysis parameters on generation of inhibitory compounds and on production of ethanol by *Pichia Stipitis* and Acetona-Butanol-Ethanol by *Clostridium* from ozonated and water washed sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* In press.
- Travaini, R., Otero, M.D.M., Coca, M., Da-Silva, R., Bolado, S., 2013. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresour. Technol.* 133, 332–339. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.133
- Wanderley, M.C.D.A., Martín, C., Rocha, G.J.D.M., Gouveia, E.R., 2013. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 128, 448–453. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.131