



PGTF
**THE PEREZ-GUERRERO TRUST FUND FOR ECONOMIC AND TECHNICAL
COOPERATION AMONG DEVELOPING COUNTRIES**

PROYECTO DE COOPERACIÓN SUR – SUR



“Producción de etanol a partir de sustratos alternativos”

INFORME FINAL

Entidad Ejecutora:

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Contraparte Extranjera:

Escola Estadual de Lorena, Brasil
Universidad Autónoma de Coahuila, México

Diciembre, 2016

ÍNDICE

I – CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.....	3
II – INFORME TÉCNICO.....	4
Avance del proyecto	
<u>Act. 01. Desarrollo de tecnologías para la producción de bioetanol a partir de fuentes renovables.</u>	
1. Bagazo de caña de azúcar.....	5
2. Residuos de producción de VIMANG®.....	8
3. Corteza de nopal.....	9
4. Sorgo dulce.....	11
5. Cáscara de plátano	13
<u>Act. 02. Desarrollo de tecnologías para la producción de bioetanol. Esquema tecnológico.</u>	
a. A partir de bagazo de caña de azúcar:	18
b. A partir de residuos de la producción de VIMANG.	19
<u>Act. 03. Gestión del conocimiento.....</u>	23
III – LECCIONES APRENDIDAS.....	23
IV – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE	
Resumen de la situación financiera.	24

I – CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.

1. Líneas de Acción.

Puestas en marcha de nuevas iniciativas para mejorar la eficiencia energética, el uso de las energías renovables y la adaptación al cambio climático.

2. Entidad local cubana responsable.

Nombre y Dirección: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Nombre del responsable y sus funciones:
Ing. Gustavo Saura, Coordinador general del proyecto

3. Objetivo General.

Búsqueda de materias primas alternativas para la producción de alcohol combustible. Los resultados de la investigación, pudieran recomendar la introducción en la industria alcohólica de algún sustrato viable desde el punto de vista técnico y económico. Adicionalmente, el personal de las fábricas será entrenado en la producción de etanol a partir de sustratos alternativos.

4. Objetivo Específico

1. Desarrollar procedimientos de obtención de alcohol de segunda generación a partir del estudio de la hidrólisis enzimática y producción de etanol en proceso Sacarificación-Fermentación simultánea. Se seleccionaran microorganismos productores de etanol y se evaluará su capacidad productiva en presencia de inhibidores físico/químicos mayoritarios derivados de los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica.
2. Ensayar la producción de etanol a partir de sorgo y compararla con el proceso tradicional a partir de jugo de caña de azúcar.

5. Presupuesto inicial 22,000.00 USD

Presupuesto ejecutado 19,684.00 USD

6. Temporalización

Fecha de inicio de proyecto: Junio 2014

Fecha de finalización de proyecto: Diciembre 2016

II – INFORME TÉCNICO

En la actualidad es cada más evidente que una economía dependiente del petróleo y sin reservas o reservas suficientes del mismo confronta una serie de debilidades. En los países importadores netos de petróleo la incertidumbre en el suministro y precio del petróleo provoca gran impacto sobre la política energética a seguir. Los países que basan su economía en el petróleo presentan dificultades para desarrollar modelos económicos sostenibles ya que el petróleo como otros combustibles fósiles (carbón y gas natural) no es una materia prima renovable. Sus reservas, son finitas y su formación, a partir de biomasa, exige millones de años. A su vez la economía basada en el petróleo es generadora neta de gases invernaderos propiciando implicaciones negativas en el medio ambiente dificultando en su conjunto el desarrollo de un modelo medioambiental sostenible. Lo anterior constituye razones más que suficiente para justificar la búsqueda de alternativas que disminuyan drásticamente la dependencia del petróleo. Reducir la alta dependencia energética de los productos petrolíferos, y aumentar la seguridad del suministro de un combustible sostenible es un objetivo prioritario de la estrategia energética de muchos países.

El término biocombustible engloba a todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal. Se trata por tanto, de combustibles de origen vegetal que tienen características parecidas a las de los combustibles fósiles. Para que los biocombustibles de origen agrícola sean una alternativa energética real se necesita que estos productos, no sólo presenten características equivalentes a los de procedencia fósil, sino también que, en el conjunto de los procesos de obtención, se consigan balances energéticos positivos y que lleguen al mercado a un coste similar al de los productos derivados del petróleo.

Actualmente, los biocombustibles líquidos se obtienen a partir de productos agrícolas tales como el azúcar, los cereales y semillas oleaginosas, que se producen principalmente para el sector alimentario. Estos biocombustibles denominados de "1ra generación" están limitados en su disponibilidad de sustitución del petróleo, de mitigar el cambio climático y el crecimiento económico. Su producción sustentable está bajo revisión ya que puede crear competencias por el uso de la tierra y el agua. Una posible excepción que parece ser un criterio muy aceptado es la producción de etanol de la caña de azúcar. Estas inquietudes han aumentado el interés por desarrollar la producción de biocombustibles de biomasa no alimentaria. Muchas de estas inquietudes podrían ser solucionadas con el desarrollo de los biocombustibles de "2da generación"

Para que los biocombustibles de origen agrícola sean una alternativa energética real se necesita que estos productos, no sólo presenten características equivalentes a los de procedencia fósil, sino también que, en el conjunto de los procesos de obtención, se consigan balances energéticos positivos y que lleguen al mercado a un costo similar al de los productos derivados del petróleo.

El biocombustible más importante es el etanol que puede servir como combustible o como material de partida en la producción de productos químicos como ácido acético, acetaldehído, butanol, etileno. Para mejorar la competitividad del bioetanol frente a los combustibles derivados del petróleo se deben reducir los costes de producción, y para ello se necesita reducir el precio de las materias primas, ya que estas suponen alrededor del 60% del coste final del etanol. Es necesario desarrollar nuevos cultivos y considerar la biomasa secundaria y los residuos orgánicos como recursos complementarios para la producción de biocombustibles. La utilización de biomasa lignocelulósica es, a medio plazo, la opción más

prometedora para la obtención de etanol combustible a bajos costos posibilitando que este producto pueda ser adoptado por la industria.

Avance del proyecto

Act. 01. Desarrollo de tecnologías para la producción de bioetanol a partir de fuentes renovables.

Este proyecto abarcó la puesta en marcha de nuevas iniciativas para mejorar la eficiencia energética, el uso de las energías renovables y la adaptación al cambio climático. La exploración fue dirigida hacia sustratos lignocelulósicos como residuos de producciones de fármacos a partir de plantas, corteza de tuna del nopal y bagazo de caña de azúcar.

Inicialmente se realizó una actualización en cuanto al estado del arte sobre la obtención de etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos, una alternativa muy estudiada en la actualidad en el mundo, con vistas a disminuir el costo del etanol combustible. Se reportan los principales materiales lignocelulósicos bajo estudio con énfasis en el bagazo de caña de azúcar. Se detallan las características del procesamiento a través de las plataformas bioquímica y termoquímica, que se mantienen bajo continuo desarrollo y evaluación pues ambos escenarios deben superar barreras tecnológicas.

Basados en la búsqueda bibliográfica y de patentes realizada, se ejecutaron estudios sobre la composición de la biomasa y la posibilidad de producción de bioetanol en cinco sustratos alternativos:

1. Bagazo de caña de azúcar
2. Residuos de producción de VIMANG®
3. Corteza de nopal
4. Sorgo dulce
5. Cáscara de banano.

1. Bagazo de caña de azúcar

Las experiencias con bagazo de caña de azúcar mostraron avances en la obtención de glucosa y xilosa como sustratos para la producción de etanol. Se ensayó la etapa de pretratamiento por hidrólisis alcalina a partir de NaOH al 3 %, en 3 ciclos con remoción del 80 % de la celulosa. Se determinó que el bagazo podía ser pre-tratado en forma molida o integral sin diferencias significativas en la remoción. El tamaño del hidro-módulo se consideró factible en 1:10 (peso de bagazo: peso de la NaOH 3%). El bagazo pre-tratado fue caracterizado en cuanto al contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. Se determinaron las características cinéticas de la hidrólisis enzimática, definiéndose la concentración de enzima y la temperatura del proceso en la cinética enzimática. Se definió una dosis de 1/90 para la concentración de enzima y temperatura de 30°C para un proceso de 16 horas. Se trabajó en dos ciclos de re-uso de la enzima y se obtuvo un rendimiento de 0.83 l de enzima (1:90)/kg de bagazo. Se comprobó que el proceso estudiado resultaba leve para la disolución de las hemicelulosas.

Estudios en la hidrólisis alcalina y enzimática del bagazo de caña para la producción de etanol celulósico.

Los mejores resultados en el pretratamiento del bagazo por hidrólisis alcalina fueron de remociones de más del 80 % de la celulosa a partir de NaOH al 3 % se obtuvieron con el uso de

3 ciclos. El tamaño del hidromódulo se consideró factible en 1:10 (peso de bagazo: peso de la NaOH 3%). El proceso de hidrólisis enzimática mostró resultados aceptables a dosis de 1/90 concentración de enzima y temperatura de 30 °C para un proceso de 16 horas. Se trabajó en dos ciclos de reuso de la enzima y se obtuvo un rendimiento de 9 mL de enzima (1:90)/kg de bagazo.

La comparación del efecto del uso de los reciclos de la enzima indicó los mejores resultados trabajando en dos ciclos donde el rendimiento fue de 9 mL (0,83 L/kg a dilución 1:90) de enzima/kg de bagazo.

Pretratamiento con explosión por vapor: Se obtuvo por encima de 50 g/L de azúcares disueltos y concentraciones de etanol de 0,43 g/g en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo. Fue un trabajo en colaboración con el Departamento de Biomasa del CIEMAT (España).

El estudio de la sacarificación- fermentación simultáneo tuvo lugar con una concentración de enzima de 20 UPF/g de sustrato de Novozymes 50013 (65 UPF/ml) de Novozymes 50010 (600 UI/ml) β - glucosidasa disueltas en tampón acetato 0.05 M pH 4.8 y de 75UI/g de sustrato de Novozymes 50030 550UI/ml disuelta en tampón acetato 0.05 M pH 4.8 a 50°C durante 8 horas a 150 rpm.

La concentración de etanol fue superior a 55 g/L trabajando a 20% de azúcares iniciales, con rendimientos superiores al 33%. Estos resultados son comparables al proceso industrial de Abengoa, Salamanca trabajando con paja de trigo. Lo cual indica la factibilidad del uso del bagazo de caña cubano para la producción de etanol celulósico.

Purificación de licores de hidrolizados de bagazo (en colaboración con la Universidad de Lorena, Brasil):

- Entre los métodos estudiados el método de tratamiento con carbón activado y con resinas de intercambio iónico son los que indicaron mejores resultados en la remoción de impurezas del hidrolizado.
- El tratamiento de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con carbón activado reduce en gran medida los componentes que pueden inhibir la etapa fermentativa posterior y clarifica el hidrolizado.
- El proceso de tratamiento del hidrolizado con resinas de intercambio iónico, elimina eficientemente los compuestos inhibidores del metabolismo microbiano ácido acético, HMF y furfural y minimiza la concentración de compuestos fenólicos y de compuestos coloreados, sin causar pérdidas de azúcares.

Selección de cepas *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas promisorias para la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos para la producción de alcohol.

Fueron evaluadas 5 cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, una aislada en destilería cubana a partir de muestras colectadas de fermentadores en proceso activo (19 horas) A3 y su mutante auxótrofo X-A31 Leu-, Ile-, Val- obtenido mediante radiación ultravioleta (UV) y las cepas CM, 381 y 373, seleccionadas en sistema de cultivo continuo todas pertenecientes a la Colección de Cultivos Industriales ICIDCA. El contenido de sales ha sido estimado en 200 g/L en licores sulfitados y de 20 g/L en hidrolizados enzimáticos. La Fig. 1 indica los resultados obtenidos en las tasas de sobrevivencia frente al estrés osmótico y concentración de inhibidores.

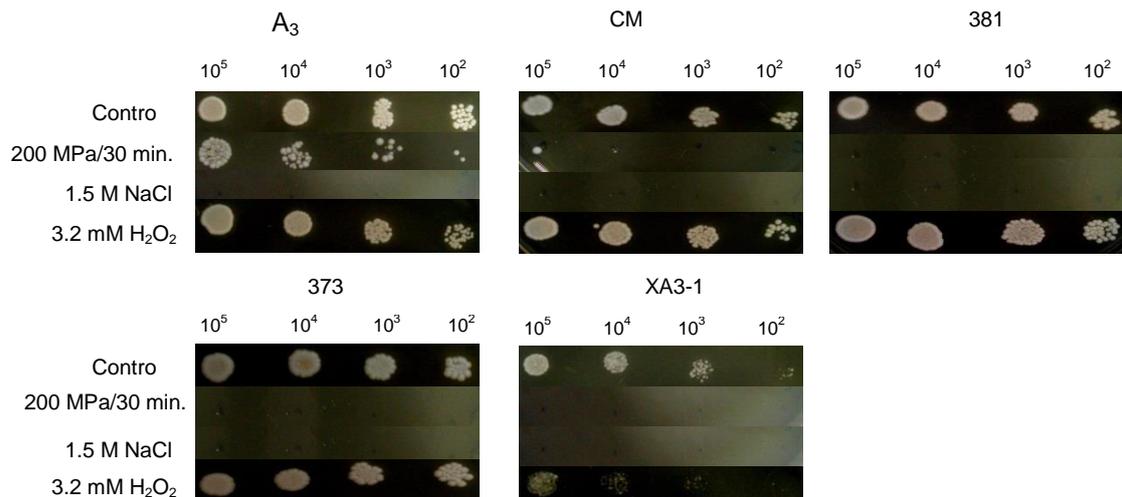


Fig. 1. Tasa de sobrevivencia de cepas *S. cerevisiae* comerciales bajo algunas condiciones de estrés mediante técnicas de spot test. Cultivos de 48 hrs, 28°C, agar YPD pH: 4.5 sin (control) y con tratamiento estresante

La enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH), clave en la fermentación alcohólica, interviene en la oxidación del etanol en presencia del nicotínadeninucleótido (NAD⁺) a acetaldehído y en hidrolizados que contienen furfural, es la encargada de reducir este a alcohol furfurílico en presencia de NADH, por lo que altas actividades de esta enzima indica mayor disposición de la cepa a asimilar concentraciones elevadas de furfural y otros inhibidores en el medio de cultivo. La fig. 2 muestra la evaluación de las cepas estudiadas en cuanto a su actividad ADH.

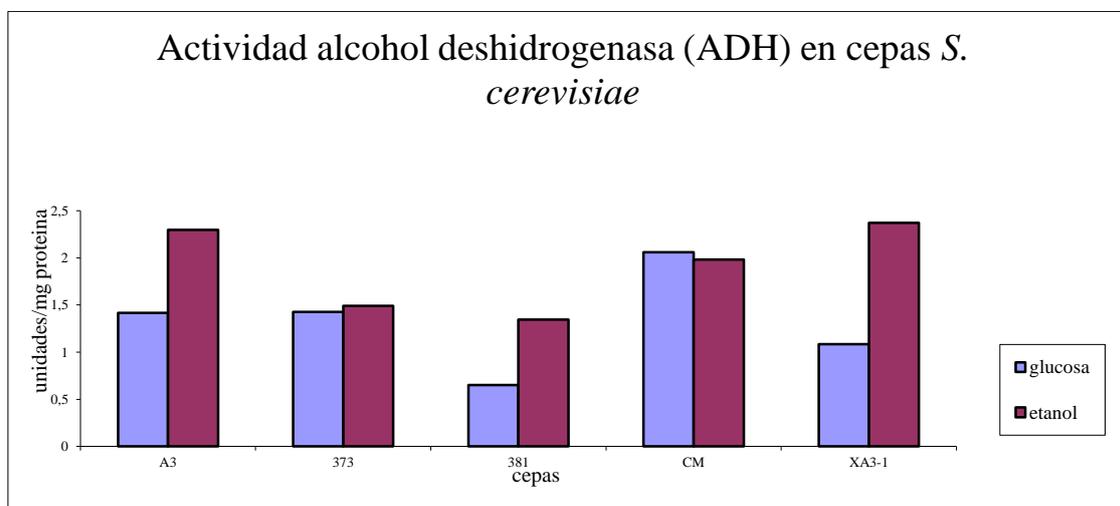


Fig. 2. Determinación de la actividad Alcohol Deshidrogenasa (ADH) en cepas *S. cerevisiae*. Crecimientos en YP glucosa 5% e YP etanol 5%, pH 4.5

Estos resultados indicaron una clara relación entre la resistencia a estrés y el comportamiento fermentativo en cepas *S. cerevisiae*. La cepa A3 resultó promisorio debido a la alta sobrevivencia que tuvo frente a la presión hidrostática, inhibidores y alta actividad AHD.

Selección de hongos celulolíticos, buscando productores del complejo enzimático.

Se realizó un muestreo de materiales celulósicos con indicios de degradación.

- Papel
- Bagazo enmohecido
- Corteza de árbol

Se seleccionaron las cepas de hongos 21 y 38 como los de mayor producción de celulasas. La FES fue el método de fermentación de mayor obtención de enzimas en ambas cepas.

El cambio de medio para la optimización supuso un aumento per se en las actividades celulasas a las 72 horas de fermentación, observándose una influencia positiva de la disminución en la concentración de KH_2PO_4 . La actividad CMCasa aumentó de 10^{-4} a 10^{-2} U/mL.

Se logró incrementar las respuestas de la cp. 21 en 6 unidades para la CMCasa y el doble de actividad beta-glucosidasa, respecto a las condiciones estándar. No hubo variación significativa en los valores de actividades enzimáticas de la cp. 38, no fue posible la exploración de las variables para la optimización de este microorganismo en este modelo estadístico para las condiciones estudiadas. Se comprobó la influencia positiva de la interacción de los niveles mínimos de pH y humedad, temperatura y humedad, pH y concentración de urea en los valores de actividades celulasas de cp. 21. Por lo que estas variables son de vital importancia en la optimización de las condiciones.

En la purificación de licores de hidrolizados de bagazo dieron los mejores resultados en la remoción de impurezas el tratamiento con carbón activado y con resinas de intercambio iónico. El carbón activado redujo en gran medida los componentes que pueden inhibir la etapa fermentativa posterior y clarifica el hidrolizado. El proceso de tratamiento del hidrolizado con resinas de intercambio iónico elimina eficientemente los compuestos inhibidores del metabolismo microbiano como ácido acético, HMF y furfural y se minimiza la concentración de compuestos fenólicos.

Otro esquema de pre-tratamiento evaluado para el bagazo de caña fue la explosión con vapor de cuyas condiciones evaluadas se seleccionó la variante a temperatura de 215°C durante 5 min. A partir de la fracción líquida se ejecutó un proceso de fermentación y sacarificación simultánea (FSS) utilizando 20% de sólidos y añadiéndole xilanasa al coctel enzimático preparado con enzimas comerciales de la Novozymes (50013, 50010, y 50030) a 50°C durante 8 horas a 150 rpm. La fermentación a nivel de laboratorio ocurrió en medio sintético trabajando con una cepa *Saccharomyces cerevisiae* de la Colección de la Unidad de Biomasa del CIEMAT, a una relación de inoculación 4% (v/v) y a 35°C a 150 rpm. Como resultado del proceso de conversión de la celulosa del bagazo pre-tratado a etanol mediante proceso en una etapa (SFS), se logró una concentración de etanol superior a 55 g/L trabajando a 20% de azúcares iniciales, con rendimientos superiores al 33%. Estos resultados se consideraron comparables al proceso industrial de Abengoa, en Salamanca/España trabajando con paja de trigo, lo cual indica la factibilidad del uso del bagazo de caña cubano para la producción de etanol celulósico.

2. Residuos de producción de VIMANG®

El fármaco cubano VIMANG® se obtiene a partir de la corteza de árbol de mango (*Mangifera indica*) y este residuo de naturaleza lignocelulósica posee un contenido en celulosa de un 61,7 %, por ciento superior al contenido en bagazo de caña.

A esta biomasa se le aplicaron diferentes pre-tratamientos para incrementar la biodegradabilidad de su fracción orgánica. Se realizó la caracterización química del material sin tratar y pre-tratado con H_3PO_4 (ácido) y NaOH (básico) a altas temperaturas. El estudio se realizó según un diseño de experimentos 2^3 para cada pretratamiento, analizando las variables temperatura, tiempo de pretratamiento y la relación peso de material/volumen de reactivo a

dos niveles, empleando las técnicas estandarizadas por el *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) para determinación de carbohidratos por HPLC.

Se seleccionó la mejor alternativa de ambos diseños y se compararon los efectos del pretratamiento con respecto al material sin tratar en cuanto al incremento de azúcares simples liberados después de la hidrólisis. De los pretratamientos estudiados, el básico durante 15 minutos a 120°C en una relación 1/10 logró incrementar en un 24% y 23,7% el contenido de glucosa y xilosa respectivamente. Se demostró que la variable relación peso /volumen no tiene influencia sobre las variables respuesta porcentaje de glucosa, xilosa y lignina.

COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES CONFIGURACIONES DE PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE CORTEZAS DE ÁRBOLES DE MANGO.

Metodología. Se colocaron en los reactores el material pretratado al 20% de carga de sólidos y fue mezclado con una solución de tampón de citratos (pH 4.8). Se adicionaron las preparaciones enzimáticas (celulasas y β -glucosidasa) de acuerdo a la dosificación requerida en cada experimento. En la HFS, la hidrólisis se realizó durante 24 horas a 50°C y la fermentación se realizó a 30°C y 150 rpm hasta las 96 horas. Se inoculó el cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y el medio fue enriquecido con extracto de levadura (2.5 g/L) y peptona (5 g/L) (1). La mezcla de reacción en la SFS se incubó a 38°C y 150 rpm durante 96h (2). En la PSSF se añadió una porción de las enzimas y se realizó una presacarificación durante 16 horas a 50°C, luego se siguió el mismo procedimiento que en la SFS. Se realizaron dos réplicas de todos los experimentos y se cuantificó la producción de etanol por cromatografía de gases (3).

Resultados. Los residuos sólidos fueron sometidos a un pretratamiento alcalino con solución de NaOH al 3% másico, durante 15 minutos a una temperatura de 120°C, logrando un aumento de un 15.5% en el contenido de glucano, con respecto al material sin tratar. La concentración de glucosa en la hidrólisis enzimática del proceso HFS a las 24 horas fue 89.45g/L para un rendimiento de 51.37%. La posterior fermentación resultó en 26.21 g de etanol / L, que corresponde a un rendimiento de etanol de 52.87% en comparación con el rendimiento teórico (tabla 1). A partir de la fracción de glucosa contenida en una tonelada de los residuos pretratados es posible producir 158 L de etanol.

Tabla 1: Comparación entre las configuraciones de procesos

Parámetros (20% <i>m/V</i>)	HFS	SFS	PSSF
C (Etanol) (g/L)	26.21	34.65	39.12
Rendimiento de etanol (%)	52.87	58.17	65.67
Etanol (L)/ T material	158.18	209.13	236.10
Productividad (g/(L*h))	0.55	0.72	0.82

En cuanto a los otros dos procesos SFS y PSSF es posible obtener 209 y 236 L de etanol / tonelada de residuo respectivamente, que es equivalente a 58.17 y 65.67% del rendimiento de etanol producido a partir de la glucosa potencial en la materia prima. La productividad aumenta al emplear los procesos SFS y PSSF. Estos resultados coinciden con lo reportado por Mesa y col. (2011) (4) y Avelino y col. (2014) (2). En el proceso de SFS no se detectó acumulación de glucosa al final de los experimentos y en la PSSF, después de inocular la

levadura, la concentración de glucosa disminuyó aceleradamente hasta prácticamente desaparecer, por lo que ambos procesos son eficientes.

Conclusiones. De las configuraciones estudiadas para la producción de etanol, se obtuvieron los resultados más altos cuando se incluye un paso de presacarificación, logrando rendimientos de 236 litros de etanol por tonelada de residuo y concentraciones de 39.12 g /L.

Bibliografía.

1. Dowe N, McMillan J. (2008) Technical Report NREL/TP-510-42630
2. Avelino F, Ruiz H, Costa C, Silvino E, Teixeira J, Ribeiro G. (2014) Fuel. 131: 66–76.
3. Gon S, Yeoup B, Gyo Y, Joo D, Bae H. (2011) Bioresour. Technol. 102: 5788–5793.
4. Mesa L, González E, Romero I, Ruiz E, Cara C, Castro E (2011) Chem. Eng. J. 175: 185– 191

3. Corteza de nopal

El nopal proviene de un cactus mexicano que ha ganado fama mundial, gracias a sus propiedades. El uso medicinal de este fruto se amplía para bajar de peso, también para problemas relacionados con la diabetes, con la digestión y con el colesterol. Las tunas silvestres se dedican principalmente al consumo fresco y en una proporción relativamente pequeña, a la producción artesanal de queso de tuna, melcocha y ocasionalmente colonche, que son productos típicos con un mercado reducido debido a la dificultad de conservación que impide traslados prolongados. Una de las principales características de los frutos es el alto contenido de azúcares, principalmente de glucosa y fructosa que hacen del fruto una fuente potencial de sustrato para la producción de bioetanol. Con el objetivo de estudiar la factibilidad de utilizar la corteza de la tuna para determinar su potencial para la obtención de biogás, se realizó un análisis granulométrico para determinar el tamaño de partículas predominantes de nopal, se presentó el proceso de caracterización físico-química de la biomasa y se muestra el diseño de experimentos empleado para analizar la influencia de algunas variables sobre la aplicación de un pretratamiento básico con hidróxido de sodio, determinándose las mejores condiciones de operación, mediante el análisis de variable respuesta. La experimentación se realizó en los laboratorios del Instituto de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y el laboratorio de biotecnología perteneciente al Centro de Ingeniería de Procesos (CIPRO) del Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, CUJAE.

Estudio para la caracterización y tratamiento de las hojas y tallos del nopal

Caracterización física

En este acápite se pretende determinar el contenido de humedad, la densidad de bulto y porosidad como parte de una caracterización física. Además se analizara la granulometría a través de un estudio de tamizado en el que se determinara el tamaño de partícula predominante.

En las corridas experimentales se observa que el 62,56% de las muestras fueron retenidas en el tamiz de 0,841mm, el 30,97% en el tamiz de 0,160mm y el 6,47% son partículas con diámetros inferiores a 0,160mm, siendo el tamaño predominante de las muestras el de 0,841mm.

Caracterización química

Estudiar la composición química que presenta el material permite obtener la información necesaria para establecer las relaciones sólido-reactivo empleadas en el diseño experimental,

además de constituir un punto de partida para realizar comparaciones y determinar la eficiencia de los procesos de pretratamiento.

Determinación de sólidos totales y volátiles

El contenido de sólidos volátiles juega un papel importante en los procesos de obtención de bioetanol por vía fermentativa. Su mayor o menor proporción influye sobre el rendimiento del material en la producción pues constituye la fracción de la biomasa que puede ser procesada enzimática y/o microbiológicamente para su final conversión bioquímica en bioetanol.

Diseño de experimentos:

Con el objetivo de analizar la influencia de la temperatura, tiempo de pretratamiento y relación peso/volumen (P/V) sobre el proceso de pretratamiento del residual sólido como etapa fundamental de los procesos de obtención de bioetanol se propone un diseño experimental obtenido con la ayuda del programa computacional Sthatgraphics-Centurion XV. Se decide analizar cada variable a dos niveles. Se realizó una réplica para cada corrida con el objetivo de obtener datos fiables.

Tabla 2: Diseño de experimentos empleando Sthatgraphics-Centurion XV

Muestra	Temperatura(°C)	Tiempo (min)	Relación P/V
1	120	30	1/10
2	80	15	1/20
3	80	15	1/10
4	120	30	1/20
5	80	30	1/10
6	120	15	1/20
7	120	15	1/10
8	80	30	1/20
9	120	30	1/10
10	80	15	1/20
11	80	15	1/10
12	120	30	1/20
13	80	30	1/10
14	120	15	1/20
15	120	15	1/10
16	80	30	1/20

Pretratamiento básico del residuo

Los materiales lignocelulósicos son resistentes a los ataques enzimáticos y microbiológicos por la composición que presentan, siendo esta la razón por la que el proceso de obtención de bioetanol por vía fermentativa requiere de una etapa de pretratamiento. Con el objetivo de incrementar la biodegradabilidad de la biomasa se propone un pretratamiento básico con NaOH como agente alcalino, ya que según la bibliografía consultada este resulta ser el más efectivo.

Para realizar el pretratamiento siguiendo el diseño de experimentos, se fija una concentración de NaOH de un tres por ciento másico.

Determinación de monosacáridos por High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Método NREL (Nacional Renewable Energy Laboratory)

El procedimiento consta de dos etapas de hidrólisis ácida para fraccionar la biomasa en componentes simples. En el proceso una fracción de la lignina se solubiliza en ácido y puede ser determinada por espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis). La fracción restante al no ser soluble en ácido puede ser determinada por un método gravimétrico.

Durante la hidrólisis los poliméricos solubles en la solución ácida se hidrolizan a formas monoméricas que pueden determinarse por HPLC.

Tabla 3: Datos y resultados de la determinación del contenido de RIA y LAI

No.	Peso de la muestra (g)	%RIA	%LAI	%LAS	%LT	% Lignina removida
4	0,5067	11,5500	0,9141	3,6514	15,2015	52,55
1	0,5022	11,9800	1,5788	1,7155	13,6955	57,22
6	0,5045	14,3200	1,4771	1,0819	15,4019	51,92
8	0,5075	11,6600	1,1639	4,7666	16,4266	48,72
2	0,5030	17,9500	1,6734	1,6146	19,5646	38,93
7	0,5087	12,4400	1,7385	2,0993	14,5394	54,61
5	0,5050	13,7500	0,6382	2,4852	16,2353	49,32
3	0,5088	13,7100	0,1937	3,5977	17,3077	45,97
Sin tratar	0,5014	23,9330	0,1166	8,1039	32,0370	

Se determinó las cantidades de lignina presentes en las muestras tratadas y sin tratar, concluyendo que los valores totales de lignina para las muestras tratadas son menores que las muestras sin tratar, observándose que el pretratamiento fue efectivo para todos los casos estudiados, removiendo alrededor del 50 % de la lignina presente. Este resultado es superior en efectividad al encontrado para otras biomásas, como por ejemplo el bagazo de caña en similares condiciones de pretratamiento.

El mejor resultado de tratamiento de la muestra se realizó con hidróxido de sodio al 3%, en la autoclave a 120°C, durante 30 minutos realizando lavados con agua hervida, hasta pH neutro).

CONCLUSIONES:

- El contenido de humedad de la muestra fue de 21,86%
- Se realizó un análisis granulométrico a la muestra a través de un estudio de tamizado y se determinó que el tamaño de partícula predominante es de 1,29mm.
- Se determinó el contenido de sólidos volátiles (65,5%) siendo esta la fracción de la biomasa que puede ser procesada enzimática y microbiológicamente para su final conversión bioquímica en bioetanol.
- Se realizó un estudio de las variables que tienen influencia sobre el proceso de pretratamiento de la muestra, siguiendo un diseño experimental con la ayuda del programa computacional Statgraphics Centurión. Se realizó el análisis de cada variable a dos niveles.
- La mejor condición de pretratamiento resultó 120 OC, 30 minutos y con una relación 1:10 en donde se remueve el 57 % de la lignina.

En resumen, en cuanto a la **planta de nopal** (corteza de la tuna) se realizó un diseño de experimentos a dos niveles para analizar la influencia de temperatura, tiempo de pretratamiento y relación peso/volumen (p/v) sobre la aplicación de un pretratamiento básico con NaOH, determinándose las mejores condiciones de operación y volúmenes de la base, mediante el análisis de variable respuesta. Fueron determinados los monosacáridos mediante HPLC por el método NREL. La mejor condición de pretratamiento fue a una temperatura de 120°C, durante 30 minutos y con una relación 1:10, lográndose una remoción de un 57 % de la lignina.

4. Sorgo dulce

Otro de los sustratos alternativos evaluados en esta tarea por su gran potencial biológico para aprovechar en la producción de etanol fue el **sorgo dulce** (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Se

ha reportado internacionalmente su alto rendimiento en azúcar y biomasa, por lo que pueden ser aprovechados para estos fines su jugo (en tallos), residuos sólidos y grano.

CARACTERÍSTICAS Y SUBESPECIES DE SORGO

El sorgo o zahína (*Sorghum spp*) es un género botánico perteneciente a la familia de las gramíneas, del que existen unas 20 especies; tiene su origen en África del este y primero divergió de las variedades salvajes en Etiopía, hace 5 000 años. Se adapta bien al crecimiento en áreas áridas o semiáridas cálidas. Tolerancia al calor, la sal, y las inundaciones.

Se trata como planta anual, aunque es hierba perenne y en los trópicos puede cosecharse varias veces al año; tiene una altura aproximada de 1 a 3 metros en dependencia de la subespecie. Es el quinto cereal más importante del mundo y se cultiva en más de 42 MM de hectáreas en 99 países.

El sorgo se conoce con varios nombres: mijo grande y maíz de Guinea en África Occidental, kafir en África Austral, duro en Sudán, mtama en África Oriental, iowar en la India y kaoliang en China.

Las diferentes subespecies cultivadas usualmente se dividen en cuatro grupos: sorgo grano (alimentación animal y forraje), sorgo forrajero (para pastoreo y henificar), sorgo dulce (etanol, jarabes del sorgo, alimento animal) y sorgo escoba (para la confección de escobas y cepillos).

Otra clasificación los divide por tipos: grano, dual (grano y forraje) y tallo dulce (combustible, alimento animal, forraje)

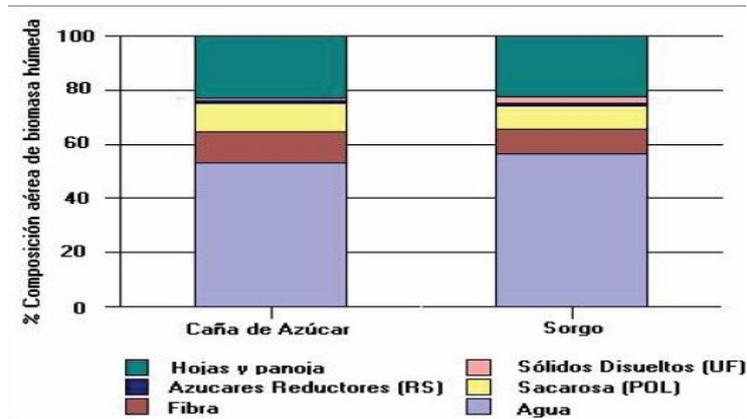
Se cultivan en África, Europa, América (América Central, EEUU, América del Sur) y Asia Meridional. En Latinoamérica y el Caribe, se cultiva en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Uruguay y Venezuela. (Wikimedia Foundation, Inc. 2008).

PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE

El auge de los biocombustibles, su crecimiento acelerado y muchas veces desmedido, hace que el mundo se replantee los caminos a seguir para su producción.

La subespecie sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L) Moench) es la que en la actualidad está ganando la atención mundial como una de las materias primas alternativas para la producción de etanol. Estas variedades azucaradas de sorgo, se desarrollan bien en terrenos alcalinos con presencia de carbonato cálcico en el suelo, lo que aumenta el contenido en sacarosa en tallos y hojas.

El sorgo dulce es un cultivo con un tallo rico en azúcares fermentables (16-23% Brix), por lo que es comparable con la caña de azúcar. En la Fig 2 se muestra la composición de la biomasa aérea de la caña de azúcar y el sorgo dulce (Gianella y Monder 2007), El sorgo dulce es una cosecha multipropósito que puede ser utilizada para la alimentación del ganado, la alimentación humana y la producción de energía y azúcar (Fig. 3). Dado que este cultivo produce alimento además de combustible es llamado "cultivo inteligente". También se le denomina "el camello de los cultivos" por su gran producción de masa verde con mínimos requerimientos generales, tolerancia a enfermedades, sequía e inundaciones.



El estudio indicó un agotamiento del sustrato en los casos de utilización de jugo de sorgo, lo que tiene importancia no sólo económica al inducir un mayor aprovechamiento de los azúcares, sino también ecológica por el hecho de disponer de vinazas con un menor grado de contaminación.

Se analizaron las características de la extracción del jugo de sorgo y la posibilidad de rendimiento de extracción para futuros trabajos a niveles de Planta Piloto. Se cosecharon de forma manual 241 kg de la variedad BJ 209 de un campo sembrado de 3 meses. La extracción se efectuó mediante dos pases en molino de tres masas y dadas las condiciones experimentales de este ensayo, los valores de rendimiento no fueron significativos de lo que pudiera ocurrir industrialmente. Sin embargo, se lograron obtener algunos parámetros referentes a las características del cultivo y cosecha del sorgo en la región de Villa Clara como por ejemplo:

- Rendimiento de jugo: 0.22 kg de jugo/ kg de planta molida
- % de extracción: 0,303 kg jugo/ kg de tallo limpio
- Rendimiento en jugo: 20,7 ton/Ha con una cosecha (considerando tres cosechas potenciales = 62,1 ton)

Los resultados indicaron elevados rendimientos agrícolas y aceptables características azucareras relacionadas con el Bx (15.39°), la pol (11.2), la pureza (72.77 %), los azúcares reductores (14.4 g/L) y otros parámetros que lo sitúan comparable a los jugos de caña de azúcar.

Si bien las cañas de sorgo pueden ser cosechadas y transportadas con el equipamiento empleado para la caña de azúcar, el tratamiento industrial requiere adaptar y adecuar las fábricas de azúcar para la extracción del jugo, tanto desde el punto de vista de manipulación como de preparación y molienda. Para una experiencia a nivel de Planta Piloto se debe evaluar la posibilidad de purificación del jugo para garantizar su fermentabilidad óptima.

Se recomienda que durante la prolongación de esta tarea se continúe valorando de forma integrada con otras instituciones cubanas, la factibilidad del cultivo, de la cosecha mecanizada, de su industrialización y evaluar, además, su impacto en la disminución de la contaminación ambiental, la compatibilidad alimento-energía, así como el costo y la calidad del etanol obtenido a una capacidad a partir de 50 Litros.

A partir de los resultados de laboratorio obtenido, se estima para el peor de los escenarios una producción de 17 L de etanol por tonelada de sorgo (15.5 Hl/Ha en una cosecha). Aun estas condiciones y considerando 3 cosechas anuales, en un área experimental de 20 Ha, se obtendría una producción piloto de 930 Hl/a, para una producción de 280 L/d.

Se alcanzó una concentración de etanol en el medio fermentado entre 5,5 y 5,9 % p/v en todas las variantes. Se pudo observar un comportamiento prácticamente similar para las variantes que mezclaron jugo de sorgo con miel final con respecto al patrón también para un importante indicador del desempeño fermentativo ($Y_{p/s}$: hasta un 57 %). A pesar de que el jugo de sorgo con o sin sales nutrientes alcanzó la misma producción de etanol, las fermentaciones con estas variantes se desarrollaron a más baja velocidad, sugiriéndose la necesidad de suplementar el jugo de este sustrato alternativo con fuentes de prebióticos y vitaminas, en este caso aportados por la miel.

Fue notoria la reducción en los destilados obtenidos a partir de la variante jugo de sorgo: miel (75:25) del alcohol isoamílico en aproximadamente un 72 % con respecto a la variante patrón. Este compuesto es el alcohol superior mayoritario en la fracción aromática y por tanto este resultado potencia las posibilidades del empleo de este sustrato alternativo dentro de un surtido de alcoholes que contemple alcoholes finos, rectificadas y aguardientes.

Por su parte la caracterización de los efluentes del proceso a nivel experimental evidenció una menor presencia de carga orgánica de acuerdo a los valores de algunos indicadores como DQO (44 g/L) y sólidos totales (68 %), en la medida que aumenta el aporte de jugo de sorgo en las mezclas de medio de fermentación. Estos resultados son similares a los obtenidos a partir de fermentaciones con jugos de caña mezclados en lugar de con melazas.

5. Cáscara de plátano

El objetivo del estudio fue demostrar la posibilidad de obtener el bioetanol a partir de la cáscara de plátano utilizando el complejo de las células de levadura *Kluyveromyces marxianus* las nanopartículas superparamagnéticas de magnetita/maghemita recubiertas con quitosán (NPM-Q). La levadura *Kluyveromyces marxianus* previamente aislada del semi-desierto mexicano fue capaz de fermentar tanto glucosa como fructosa. El sistema nano-bioestructurado protege las células contra efectos inhibitorios de fructosa presente en hidrolizados de la cáscara de plátano obtenidos utilizando las celulasas (Celluclast, Sigma). Las células inmovilizadas en NPM-Q fueron capaces de efectuar la fermentación de hidrolizado de alta carga de la cáscara, mientras que la cepa libre no creció bajo estas condiciones lo que se confirmó con poco consumo de azúcares fermentables y despreciable producción de etanol. Además, al final de ciclo de producción de etanol, la biomasa inmovilizada en NPM-Q fue separada con ayuda de un imán para ser reutilizada en dos ciclos más de la fermentación. La cáscara de plátano es una fuente perspectiva para ser aplicada en la obtención de bioetanol de segunda generación. El uso de sistemas nanoestructurados magnéticos representa una alternativa para producción de este biocombustible con la posibilidad de ser resistente a condiciones adversas y ser reutilizados en varios ciclos de la fermentación.

La cáscara de banano es un residuo de la fruta, es considerado un material lignocelulósico y representa el 30-40 % del peso total de la misma [2]. Los contenidos de hidratos de carbono, proteínas y fibras en cantidades significativas y sus pequeñas cantidades de lignina [3] permiten considerar a este material como posible sustrato para la producción de productos

con alto valor agregado, como el bioetanol. De punto de vista de la industria de alimentos es un desecho que presenta los problemas ambientales al no ser tratado. Por lo tanto, es de gran importancia la valoración de su aplicación en el proceso de obtención de etanol.

La interacción entre sistemas biológicos y nanoestructurados puede ser aplicada en la búsqueda de las soluciones alternativas biotecnológicas para la obtención de bioetanol. La inmovilización de levaduras en sistemas nanoestructurados para su reuso y adaptación a las condiciones de fermentación es una novedosa aportación de nanobiociencia.

La levadura *Kluyveromyces marxianus* es el microorganismo que puede realizar la fermentación alcohólica a las temperaturas mayores de 40°C. La termotolerancia es una ventaja de esta levadura al compararla con otras. La obtención de inóculo es el proceso que adsorbe una parte considerable del proceso de obtención de bioetanol, de tal manera que se utilizan los métodos de separación de biomasa para ser reutilizada en los procesos de la fermentación. Sin embargo, los métodos comunes son tardados, laboriosos y costosos. Tal es el caso de filtración, centrifugación y separación por decantación después de un tiempo de sedimentación de varias horas. La aplicación de nanopartículas magnéticas como agentes que facilita el proceso de separación de biomasa es una alternativa promisoría que está en la etapa de valoración y presenta el objetivo del presente trabajo.

En el presente estudio se propuso demostrar la posibilidad de obtener el bioetanol a partir de la cáscara de plátano utilizando las células de levadura *Kluyveromyces marxianus* inmovilizadas en nanopartículas superparamagnéticas de magnetita/maghemita recubiertas con quitosán (NPM-Q).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos y reactivos

Los plátanos (variedad Tabasco) a partir de los cual se obtuvo la cáscara utilizada como materia prima para la obtención de bioetanol de segunda generación provenía de Mercado de Abastos de la ciudad Saltillo, Coah. La cepa de *Kluyveromyces marxianus* L9 fue proporcionada por Dr. Raúl Rodríguez Herrera y pertenecía a la colección de microorganismos previamente aislados de las muestras provenientes de semi-desierto de Estado de Coahuila, México. Todos los reactivos utilizados fueron provenientes de la compañía Sigma-Aldrich. El imán de neodimio (12.300 gauss) fue adquirido en la empresa INNOVATEC, SA DE CV (Monterrey, Nuevo León).

Obtención de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán (NPM-Q)

NPM-Q fueron obtenidas mediante la técnica descrita en el trabajo previamente publicado [4]. Ésta consiste en la precipitación simultánea de magnetita/maghemita y quitosán, utilizando para esto NH₄OH, a partir de la solución de las sales de Fe (II) y Fe (III) y quitosán a 0.125% (p/v).

Inmovilización de *Kluyveromyces marxianus*

Al obtener el inóculo de *Kluyveromyces marxianus* mediante la propagación en el caldo YPD, se realizó el conteo de las células en la cámara de Neubauer. Se tomaron 0.051 mL de la suspensión que contenía 1.3E+08 células. Este volumen fue mezclado con 0.1 mL de la suspensión de NPM-Q. Mediante conteo de las células en la fase líquida después de la separación del complejo bionanomagnético se comprobó que todas las células fueron inmovilizadas en NPM-Q y precipitadas al aplicar magneto externo.

Pretratamiento y fermentación de la cáscara de plátano

Las cáscaras de plátano (previamente desecadas) fueron pulverizadas manualmente, resuspendidas en agua a 20% (p/v) y sometidas al pretratamiento térmico en una autoclave a

121 ° C por 15 min. Posteriormente a la suspensión se le adicionó acetato a 100 mM ajustando el pH a 5 y el preparado de celulasas (Celluclast 1.5 L) a 15 FPU/(g sustrato seco). La hidrólisis enzimática se realizó durante 72 h a 50 °C manteniendo la agitación a 150 rpm. Posteriormente el hidrolizado fue separado del residuo no hidrolizado mediante la centrifugación y aplicado en la fermentación alcohólica después de adicionar los nutrientes enlistados en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición del medio utilizado en el pre-tratamiento y la fermentación de la cáscara de plátano.

Componente	Concentración	
Extracto Levadura	0.72	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.36	g/L
KH ₂ PO ₄	0.18	g/L
Mg SO ₄ x 7 H ₂ O	0.05	g/L

*Ajuste de pH a 6 con solución de hidróxido de sodio a 0.5 N

La fermentación se realizó en los reactores de 25 mL por triplicado, repitiendo el ensayo posteriormente bajo las mismas condiciones. En la Tabla 2 se definen los volúmenes de componentes adicionados en los reactores. Se demuestra (Tabla 5) que se realizaron dos sistemas considerados como control en los cuales se implementó la levadura no inmovilizada con 1.3E+08 células y el doble de esto (al duplicar el volumen de inóculo aplicado en el reactor).

Tabla 5: Volúmenes de componentes del sistema adicionados en reactores del ensayo de la fermentación del hidrolizado de la cáscara de plátano sin (sistemas denominados como Controles 1 y 2) y con levadura inmovilizada (sistema denominado como Problema).

Componente		Control 1	Control 2	Problema
Hidrolizado de Cáscaras de Plátano	mL	9.949	9.847	9.849
NPM-Q	mL	0	0	0.100
Inóculo (<i>K. marxianus</i> L9)	mL	0.51	0.102	0.510
Volumen Final	mL	10	10	10

La fermentación se realizó por 36 h a 41°C monitoreando la concentración de glucosa, fructosa y etanol cada 12 h en el equipo de HPLC y GC, respectivamente [7]. Al final de este periodo, la biomasa inmovilizada fue separada con el imán y sometida en el segundo y posteriormente en tercer ciclo de fermentación bajo mismas condiciones aplicadas en la primera fermentación.

Caracterización del sistema inmovilizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las células de levadura y su complejo con BPN-Q fueron liofilizadas y sometidas a análisis por SEM en el microscopio electrónico de barrido Philips XL-30 ESEM Ambiental acondicionado con un espectrómetro de Apolo Marca EDAX. Cada muestra se fijó en un soporte de espejo de bronce pulido con una gota de muestra dispersada en etanol y luego se recubrió con 0.001 g de cobre (99,97% de pureza) utilizando un alto vacío del evaporador Marca JEOL y modelo JEE400 en 0.00002 Mbar, 18 mA por 15 seg. Las micrografías se tomaron en condiciones a una distancia de 39 mm, tamaño de punto de 4.5 y la energía a 20 o 40 Kev (Kiloelectron-voltios) según sea el caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas de magnetita-maghemita se obtuvieron con alto rendimiento ($\approx 97\%$), de acuerdo al método reportado en nuestro estudio anterior [4]. Las características de nanomaterial obtenido se describieron previamente [4]. De acuerdo con las mediciones de microscopía electrónica y análisis de rayos X, las nanopartículas contenían la capa quitosano muy fina y un núcleo de magnetita-maghemita de 9.5 nm de diámetro aproximadamente [4]. Estas nanopartículas se aplicaron como un soporte para la inmovilización de las células de levadura *Kluyveromyces marxianus*.

Se llevó a cabo la fermentación alcohólica de hidrolizado de cáscara de plátano a 20% (peso/volumen). El análisis de éste mediante HPLC demostró que el hidrolizado aplicado en la fermentación fue un medio rico de azúcares reductores: glucosa a 30 g/L y fructosa a 22 g/L (Figuras 3 y 4). Los resultados correspondientes a control se presentan en la Figura 3. Se aprecia que las células de levadura libre no consumieron de manera significativa las fuentes de carbono (la concentración de fructosa y glucosa no disminuyó), por lo tanto, la producción de etanol fue mínima. Este comportamiento se observó en presencia de ambas cantidades de inóculo: Control 2 en dos veces mayor que Control 1 (Tabla 2).

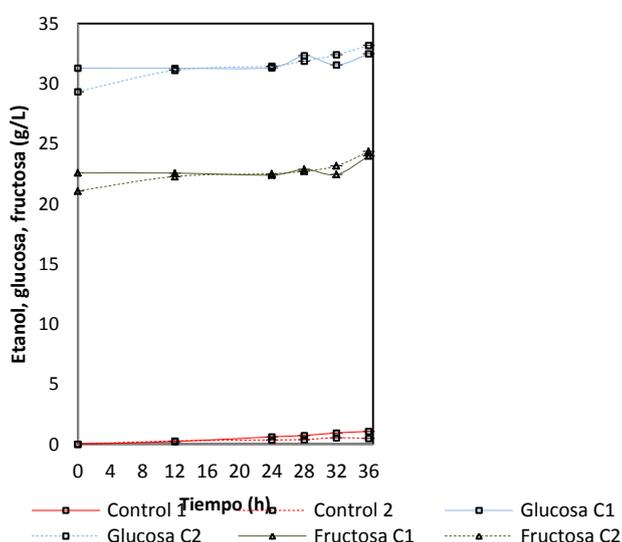


Figura 3: Niveles de fructosa, glucosa y etanol detectados durante la fermentación de hidrolizado de la cáscara de plátano con las células de *Kluyveromyces marxianus* libres (no inmovilizadas).

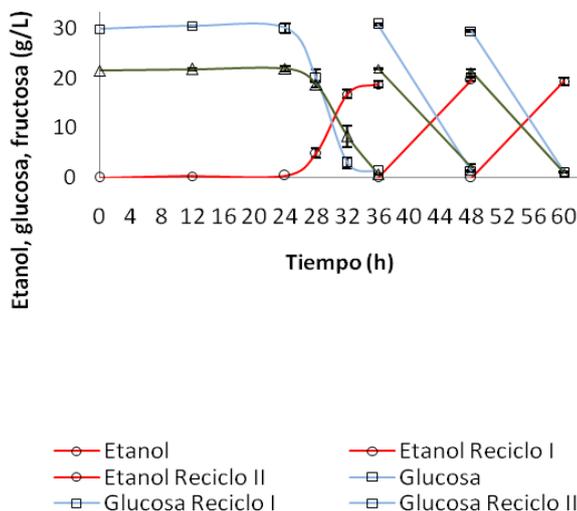


Figura 4: Niveles de fructosa, glucosa y etanol detectados durante la fermentación de hidrolizado de la cáscara de plátano con las células de *Kluyveromyces marxianus* inmovilizadas en nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán.

Los resultados de la fermentación en presencia de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán se presentan en la Figura 4. Se aprecia que en el primer ciclo de la fermentación la levadura inmovilizada inició el consumo de fructosa y glucosa después de 24 h de la fermentación, logrando producción de máximo nivel de etanol a 20 g/L después de 36 h de fermentación. En el caso de reúso de biomasa, el mismo nivel de etanol y consumos de glucosa y fructosa fueron alcanzados ya después de 12 h de cada fermentación. De este modo, las células inmovilizadas fueron capaces de crecer y producir etanol, mientras que células libres no mostraron esta capacidad bajo las mismas condiciones de la fermentación.

Es el primer reporte en el cual se demuestran los resultados de la fermentación de hidrolizado de las cáscaras de plátano con levadura *Kluyveromyces marxianus* libre e inmovilizada en NPM-Q. Los resultados obtenidos significan que la interacción de NPM-Q con las células conduce a la inducción de la capacidad de levadura para fermentar la mezcla de glucosa y fructosa del hidrolizado de la cáscara de plátano. En nuestros trabajos previos se demostró que la misma cepa de *Kluyveromyces marxianus* fermenta la glucosa en un medio sintético a una concentración de hasta 50 g/L. Cabe mencionar, que el hidrolizado fue sometido en la evaluación de la presencia de los inhibidores de la fermentación (furfural y sus derivados como hidroximetilfurfural) mediante el HPLC, sin encontrar la evidencia de ésta (datos no presentados debido a resultado negativo). Además, la levadura libre fue capaz de fermentar la cáscara de plátano al usar el hidrolizado con menor carga de la materia vegetal (resultado no mostrado). Por lo tanto, se puede asumir que la inhibición de la fermentación observada en el caso del microorganismo libre puede deberse a la presencia de altas concentraciones de fructosa (comportamiento similar a la represión catabólica). Se sabe que la inmovilización de levaduras en soportes macroscópicos es capaz de proteger el microorganismo contra los inhibidores de la fermentación [8]. Probablemente el mismo efecto tuvo lugar en el sistema levadura/NPM-Q.

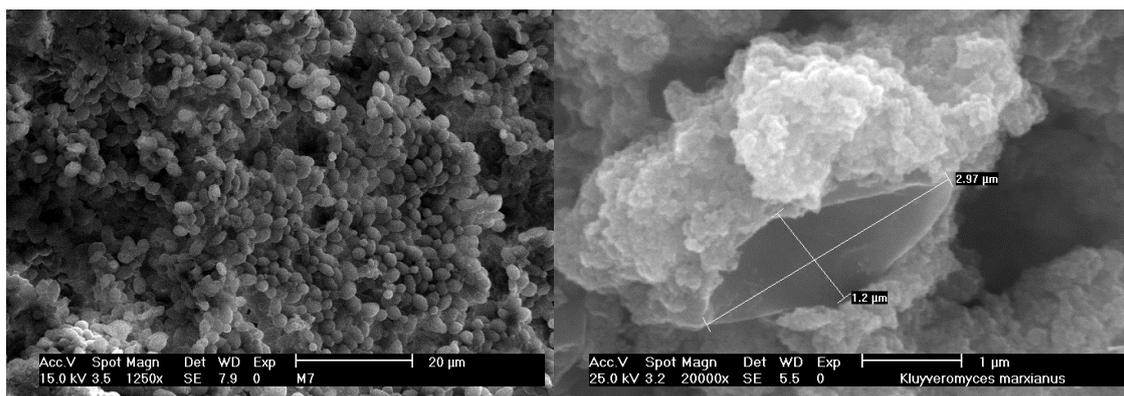


Figura 5: Microfotografía (SEM): izquierda,- de las células de levadura libre (no inmovilizadas); derecha,- del complejo células de levadura *Kluveromyces marxianus* y sistema superparamagnético nanoestructurado recubierto con quitosán (NPM-Q).

En la Figura 5 se presentan las fotografías obtenidas por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se aprecia que las células de levadura tienen una forma ovalada (Figura 5, izquierda). En la interacción con las NPM-Q, el microorganismo está recubierto con el material que posee la capacidad magnética. Es evidente que el soporte forma de cierto modo una barrera entre la célula y el medio de la fermentación. Esto probablemente evita el contacto directo de la célula con altas concentraciones de glucosa y fructosa. Sin embargo, la barrera es permeable para éstas ya al pasar los 24 h se aprecia el consumo de ambos azúcares y la formación de etanol. Probablemente se forma un gradiente de azúcares en contacto con células y afuera del sistema inmovilizado, lo que ayuda a evitar la represión catabólica.

CONCLUSIONES

La cáscara de plátano es una fuente rica en azúcares fermentables que tiene el potencial para ser aplicada en los procesos de obtención de bioetanol de segunda generación. Se demostró que las nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán es un soporte apropiado para la inmovilización por adsorción de las células de levadura *K.marxianus*. El preparado inmovilizado efectúa el proceso de fermentación de hidrolizado de las cáscaras de plátano, aún bajo las condiciones cuando las células libres no son capaces de llevar a cabo este proceso, proporcionando la ventaja de poder reusar las células inmovilizadas en varios ciclos de la fermentación removiéndolas con el campo magnético externo.

Act. 02. Desarrollo de tecnologías para la producción de bioetanol. Esquema tecnológico.

a. A partir de bagazo de caña de azúcar:

A niveles de Planta Piloto fue evaluado el pretratamiento de explosión por vapor para la bioconversión del **bagazo de caña de azúcar** a etanol, realizándose el balance de masa del pretratamiento a la fracción sólida (celulosa, hemicelulosa, lignina,) y fracción líquida conformada mayoritariamente por azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa), ácidos carboxílicos (ácido acético y fórmico) y compuestos de degradación de los azúcares y la lignina (hidróximetilfurfural, furfural, benzaldehído, vainillina, siringaldehído, ácidos cumárico y ferúlico). Los compuestos fueron analizados mediante HPLC.

El pretratamiento de explosión a vapor se realizó mediante tecnología Masonite en una Planta Piloto equipada con un reactor de 2 litros de capacidad diseñado para alcanzar una presión de

operación máxima de 42 kg/cm² y un ciclón de 50 litros en el que se recoge el material pre-tratado. El reactor se cargó con 200 g de material seco de bagazo seco y se inyectó vapor saturado hasta alcanzar la temperatura deseada. Una vez transcurrido el tiempo de proceso, el material se descargó de manera súbita en un ciclón, eliminándose los volátiles. El estudio del pretratamiento se realizó durante 5 minutos variando la temperatura a 200, 215 y 230 grados.

La mejor condición para el rendimiento de glucosa en la fracción sólida del bagazo pre-tratado mediante el proceso de explosión por vapor fue a temperatura de 238°C y tiempo de 8 minutos. En la fracción sólida del bagazo pre-tratado se recupera el 86% y 84% de la celulosa y lignina disponible en el material no tratado. El 85% de las hemicelulosas se solubilizan por efecto del tratamiento. En el proceso de hidrólisis enzimática el 89% de la celulosa se convierte en glucosa para una concentración de 55 g/L de glucosa.

Se validó para este nivel la condición de pretratamiento de 215°C/ 5 min del bagazo de caña por explosión por vapor

b. A partir de residuos de la producción de VIMANG.

La Figura 6 muestra el esquema tecnológico de la producción a escala de banco. El residuo de la producción de VIMANG es alimentado en el tanque de pretratamiento con un agitador tipo turbina que mezcla la materia prima con la solución de NaOH que actúa como agente de pretratamiento.

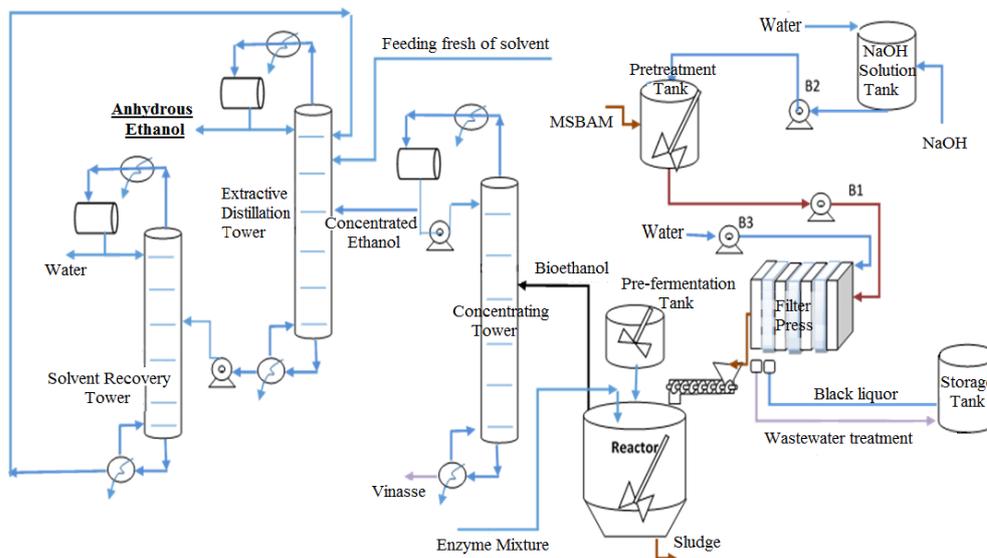


Figura 6: Esquema tecnológico de una planta de producción de bioetanol a partir de residuos de la producción de VIMANG a escala de banco.

Para calentar y mantener la temperatura del tanque de pretratamiento a 120 ° C, el depósito está provisto de una resistencia eléctrica con control de temperatura.

Después de terminar el tiempo de pretratamiento, la mezcla se bombea desde el tanque a una prensa de filtro donde se separa en dos vapores: MSBAM pretratada y el licor alcalino negro. Los efluentes se envían a un depósito de recogida y se mezclan con las aguas residuales del lavado de los sólidos de prensa de filtro. El MSBAM pretratada se debe lavar con agua para eliminar los restos de solución de NaOH hasta obtener un pH neutro.

La torta pretratada de MSBAM se transporta a través de un tornillo en reactor mezcla perfecta, donde ocurre el proceso de SSF por las enzimas y los microorganismos hasta 48 h. El reactor de mezcla completa tiene una capacidad de 30 litros. Dispone de un sistema de agitación y aireación y la adición de la instrumentación apropiada para el control de las variables. Además, una camisa para la circulación de agua para calentamiento o enfriamiento según sea necesario. Tiene una entrada de aire inferior que alimenta la cantidad de oxígeno disuelto necesario para el proceso de fermentación.

La preparación del inóculo de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Turbo (Quimizuk SA, México) y el medio de cultivo se preparan en el tanque de pre-fermentación. Los lodos generados se extraen del reactor y el bioetanol se envía al sistema de deshidratación de etanol.

El primer paso para la obtención de alcohol anhidro es la destilación convencional elevando la concentración de etanol en el caldo de 45 a 50% (w / w). Posteriormente, se obtuvo un destilado con una concentración de 90 a 92% (w / w) usando una columna de rectificación. Debido a las propiedades físico-químicas de las mezclas de alcohol-agua, es imposible eliminar completamente el agua a presión atmosférica debido a la formación de una mezcla azeotrópica.

Entre las principales tecnologías para la deshidratación de etanol se encuentran: destilación al vacío, adsorción mediante tamices moleculares, destilación azeotrópica y destilación extractiva. La técnica de destilación extractiva en comparación con el anterior es atractivo por su bajo: los costos de consumo de energía, inversión inicial y de operación.

En la técnica de destilación extractiva, se añade un tercer componente también conocido como agente disolvente. El disolvente se caracteriza por ser no volátil, miscible alto punto de ebullición, y no forma azeótropo adicional. El disolvente afecta el coeficiente de actividad en el componente en fase líquida, de modo que la mezcla se puede separar de manera eficiente en los productos puros.

En la columna de extracción el disolvente se añade en una etapa, cerca de la parte superior de la columna y el componente más volátil en alta pureza, en este caso etanol se obtiene generalmente como producto de cabeza, y como productos de fondo, se obtiene componente menos volátil con el disolvente. Esta corriente se alimenta a otra columna denominada columna de recuperación en el que el segundo componente se obtiene en la parte superior y en la parte inferior el disolvente que está de nuevo alimentada de nuevo en la primera columna. Un esquema de destilación extractiva de etanol azeotrópica con el disolvente homogéneo.

Se propone que la columna de destilación extractiva sea una columna de relleno con una altura de nueve metros dividida en 6 secciones, cada sección de 1,5 m (véase la figura 7).

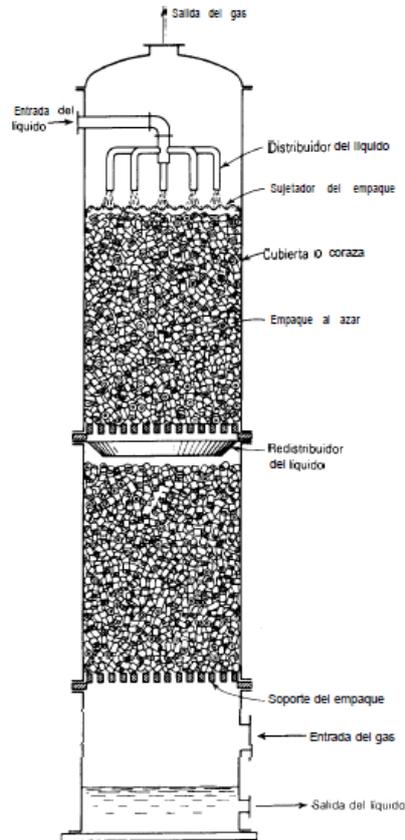


Figura 7: Esquema de la torre empacada.

El tipo de anillo es el # Nutter 0,7 en acero inoxidable 316. El disolvente se alimenta entre las secciones 1 y 2, y el flujo de la mezcla de etanol-agua azeotrópica, entre las secciones 4 y 5 de la columna. El rehervidor tiene una capacidad de 50 L, con una camisa para entrada de vapor de calefacción cuando la energía requerida se suministra para la separación. Además existen tres intercambiadores de calor para el calentamiento de las corrientes de etanol, la alimentación de disolvente y el calentamiento a reflujo, hasta que las entradas de temperatura en la etapa correspondiente de la columna. Estos intercambiadores son de tubo y carcasa, donde por la coraza, fluye el vapor como medio de calentamiento. El material de construcción de todo el equipo es de acero inoxidable 304 para evitar problemas de corrosión.

El disolvente es 100% glicerol, que se bombea y se calienta a 70 ° C. La presión de operación de la columna es la presión atmosférica (760 mmHg) en Cuba. Operando a estas condiciones, se puede trabajar con el agua como refrigerante y vapor de agua de refrigeración como medio de calentamiento en el rehervidor.

Tabla 6: Valores estimados de las variables del proceso

Variables del proceso	Valor estimado
Flujo de bioetanol (Fb)	20 L/d
Temperatura	30°C
Presión	101.325 kPa
Tiempo en el reactor de mezcla completa	48 h
Presión de operación	101.325 kPa

Temperatura de operación (Tr)	35°C
Temperatura inicial en el tanque de pretratamiento (To)	30°C
Temperatura final (Tf)	120°C

Conclusiones

A pesar de que existe un alto grado de incertidumbre en la predicción del rendimiento de una planta de etanol de celulosa, los costos de producción estimados y, sobre todo, sus indicadores de viabilidad económica se consideraron un paso esencial en la investigación.

El diseño de una planta a escala de banco de los resultados experimentales obtenidos a escala de laboratorio permite mayores niveles de información para el diseño de ingeniería de las escalas más grandes. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder sacar conclusiones definitivas. Se propuso esquema y diseño de una planta propuesta en escala de banco para procesar bioetanol 25L todos los días de la MSBAM tratado previamente con NaOH. Se desarrolló un algoritmo para calcular una primera aproximación de los costes de producción de energía. El valor del coste del bioetanol producido es de 1,23 USD / L con un tiempo de residencia en el reactor de SFS de dos días y el tiempo de pretratamiento de 30 minutos.

REFERENCIAS

1. GALBE, M.; ZACCHI, G. "A review of the production of ethanol from softwood". Applied Microbiology and Biotechnology. 2002, vol. 59, núm. 6, pp. 618–628.
2. HAPPI EMAGA, T., ROBERT, C., RONKART, S.N., WATHELET, B., PAQUOT, M. "Dietary fibre component and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties". Bioresource Technology. 2008, vol. 99, núm. 10, pp. 4346–4354.
3. MOHAPATRA, Debabandya; MISHRA, Sabyasachi; SUTAR, Namrata. "Banana and its by-product utilization: an overview". Journal of Scientific and Industrial Research, 2010, vol. 69, pp. 323-329.
4. OSUNA, Yolanda; GREGORIO-JAUREGUI, Karla Monseratt; GAONA-LOZANO, José Gerardo; GARZA-RODRIGUEZ, Iliana; ILYNA, Anna; BARRIGA-CASTRO, Enrique Dias; SAADE, Hened; LOPEZ, Raul Guillermo. "Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles with Low Chitosan Content Prepared in One-Step". Journal of Nanomatirials, 2012, Article ID 327562, pp. 1 - 7.
5. OSUNA, Yolanda; SANDOVAL, Jose; SAADE, Hened; LÓPEZ, Raul Guillermo; MARTINEZ, Jose Luis; COLUNGA, Edith; CRUZ, Gabriela; SEGURA, Elda Patricia; ARRÉVALO, Fernando; ZON, María Alicia; FERNÁNDEZ, Héctor; ILYINA, Anna. "Immobilization of Aspergillus niger lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent binding methods". Bioprocess and Biosystem Engineering, 2015, vol. 38, pp. 1437-1445.
6. PALACIOS PONCE, Arturo Sócrates; PÉREZ GUZMÁN, Ana Karina; CORTÉS ARGANDA, José Francisco; ILINÁ, Anna; RAMOS GONZÁLEZ, Rodolfo; RUIZ LEZA, Héctor Arturo; MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, José Luis; SEGURA CENICEROS, Elda Patricia; AGUILAR GONZÁLEZ, Cristóbal Noé; AGUILAR GONZÁLEZ, Miguel Ángel; HERNÁNDEZ FLORES, Homero; MARTÍNEZ ENRÍQUEZ, Arturo Isaías. "Sistema superparamagnético nanoestructurado recubierto de quitosán para inmovilización de microorganismos, su eliminación de medio líquido o aplicación en procesos de fermentación". 2106, Solicitud de patente MX/E/2016/041879.
7. NEGRO, M.J.; ÁLVAREZ, C.; BALLESTEROS, I.; ROMERO, I.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E.; MANZANARES, P.; MOYA, M.; OLIVA, J.M. Ethanol production from glucose and xylose

obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresource Technology*, 2014, vol. 153, pp.101-107.

8. BANGRAK, Phoowit; LIMTONG, Savitree; PHISALAPHONG, Muenduen. "Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers". *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, vol. 42, núm. 2, pp. 676–684.

Act. 03. Gestión del conocimiento

Se defendió la tesis de doctorado *Obtaining of bioethanol from lignocellulosic residues of process production of VIMANG® in Cubade* la estudiante Danay Carrillo en la Universidad Autónoma de Coahuila, la cual realizó estancias de entrenamiento en el ICIDCA.

Carrillo, D.; Zumalacárregi, L.; Sánchez, O.; Michelena, G.; Yznaga, H.; Martínez, J.L. y Noé, C. Pretreatments employed in lignocellulosic materials for bioethanol production: an overview *Revista ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar* (2014). Vol. 48 (1): 71-79.

Se realizó una estancia de estudios de doctorado de esta universidad en el CIEMAT, en el marco del proyecto para estudiar el comportamiento de la cáscara de banano para la producción de bioetanol.

Se han publicado los resultados en revistas, boletines y eventos internacionales. Se envió a publicar el artículo: "A Comparison of Banana Peels Physicochemical Pretreatments for Bioethanol Production" Submission ID: WAVE-D-16-00571, ***Waste and Biomass Valorization***.

Algunos resultados obtenidos se han dado a conocer dentro del Boletín de Azúcar y Derivados y Boletín de Novedades, circulados internamente en formato digital por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.

III – LECCIONES APRENDIDAS

- Debe establecerse una estrecha coordinación de las tareas comprometidas con el PNUD con la Entidad Nacional de Ejecución (ICIDCA) y organismos superiores al que se adscribe (Grupo Empresarial AZCUBA). Esto garantizara una correcta disponibilidad de recursos logísticos como transportación, dietas, etc., así como la redistribución de recursos ante situaciones de riesgo.
- Explorar y poner en acción estrategias alternativas para una ejecución exitosa dentro del cronograma establecido como medios de comunicación más versátiles y económicos, protocolos de investigación con equipamientos y material gastable de fácil adquisición.
- Los resultados obtenidos deben ser divulgados de forma sistemática no solo con la comunidad científica a través de artículos técnicos en revistas especializadas, sino también a beneficiarios de los resultados (productores, empresas locales, etc.), para su correcta implementación.

IV – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE

1. Resumen de la situación financiera.

No.	Nombre del proyecto	Total del proyecto	Acumulado 2015	A ejecutar en el año 2016	Ejecución acumulada en el año	% EJECUCIÓN en el año	Ejecución total	% de ejecución
					UM: MCUC			
1	Proyecto Pérez Guerrero: Bioetanol a partir de sustratos alternativos	22,000.00	16,277.28	5,722.72	3,491.30	49.87	19,768.58	89.85

*El proyecto solo requiere ejecutar el 10% restante que se habilitará luego de la entrega del informe final.

Nombre: Ing. Gustavo Saura Laria
Jefe de Proyecto

Firma: 
Fecha: 02/12/2016

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

