

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA: DISEÑO DE PROCESO Y OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS

Juan Carlos Ixcaraguá Lima^{1,2}, Thomas Ingram, Kai Wärmeyer & Irina Smirnova²

¹Egresado del Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle de Guatemala,

²Instituto de Procesos Térmicos de Separación, Universidad de Tecnología de Hamburgo, Alemania

Resumen

El bioetanol es un biocombustible prometedor, con potencial para reducir la dependencia de la importación de petróleo y mejorar el desarrollo sostenible alrededor del mundo. Sin embargo, la producción actual de bioetanol a partir de cultivos no es suficiente para cubrir la demanda global. Para reducir esta brecha, los materiales lignocelulósicos son vistos como una fuente alternativa de carbohidratos, y son base para el bioetanol de segunda generación. La hidrólisis enzimática de la paja de centeno pretratada con agua caliente líquida (LHW por sus siglas en inglés) se optimizó utilizando dos diferentes tipos de enzimas: Celluclast 1.5 L y un complejo de celulosa de *Penicillium janthinellum*. El pretratamiento LHW se comparó con otros pretratamientos en términos de hidrólisis con estas dos enzimas. Después de la optimización de la carga enzimática, se efectuó la hidrólisis con una alta carga de biomasa, con el objetivo de producir un hidrolizado con una alta concentración de glucosa, adecuado para la fermentación a etanol. Se obtuvo un hidrolizado con una concentración de glucosa de 101 ± 6 g/l, uno de los más altos reportados en la literatura, correspondiente a una conversión de celulosa de 90%, con 14.5% de carga biomásica. La productividad predicha de etanol es 163 g etanol/kg paja de centeno, considerando solamente la glucosa del hidrolizado de la digestión de la lignocelulosa. Después de un cálculo de la fermentación de este hidrolizado, una concentración esperada de etanol de 6.0% (v/v) puede obtenerse, la cual supera el límite de eficiencia económica de la hidrólisis de lignocelulosa para producción de bioetanol.

Palabras clave: Hidrólisis enzimática, pretratamiento, *Trichoderma reesei*, *Penicillium janthinellum*, biorefinería, sacarificación.

Abstract

Bioethanol is a promising transportation biofuel, with potential to reduce dependency on oil imports and enhance sustainable development around the world. However, the current crop-based bioethanol production is not sufficient to fulfill the global demand. To reduce this gap, lignocellulosic materials are seen as an alternative source of carbohydrates, providing basis for second generation bioethanol. The enzymatic hydrolysis of Liquid Hot Water (LHW) pretreated rye straw is optimized using two different kinds of enzymes: Celluclast 1.5 L, and Cellulase complex from *Penicillium janthinellum*. LHW is compared with other pretreatments in terms of hydrolysis with these two enzymes. After optimisation of the enzyme loading, hydrolysis with high biomass loading is performed, with the goal to produce a hydrolysate with high glucose concentration, adequate for fermentation to ethanol. A hydrolysate with glucose concentration of 101 ± 6 g/l is obtained, one of the highest reported in the literature, corresponding to cellulose conversion of 90%, at 14.5% biomass loading. The overall predicted ethanol yield is 163 g ethanol/kg rye straw, considering only glucose from the hydrolysate of lignocellulose digestion. After calculated fermentation of this hydrolysate, a predicted ethanol concentration of 6.0% (v/v) can be obtained, which surpasses the limit of economical efficiency of lignocellulosic hydrolysis for bioethanol production.

Key words: enzymatic hydrolysis, pretreatment, *Trichoderma reesei*, *Penicillium janthinellum*, biorefinery, saccharification.

Introducción

Biorefinería

El término biorefinería representa un "sistema complejo y completamente integrado de tecnologías sostenibles y amigables con el ambiente y los recursos, para la utilización comprensiva de materiales y energía, así como la explotación de materias primas biológicas en forma de biomasa verde y residuos, a partir de la utilización regional sostenible de la tierra" (1). En la biorefinería de lignocelulosa, el material lignocelulósico pasa por una serie de procesos para convertir los polisacáridos y lignina biomásica, a productos

químicos y energéticos, tales como fenoles, sacáridos y luego etanol. Debe considerarse no solamente el tipo de biomasa, sino también la tecnología que se utilizará para la transformación (2).

Celulasa y otras enzimas

Las enzimas son catalizadores con una estructura proteínica, que actúan en sistemas biológicos. Similar a otros catalizadores, el equilibrio de reacción sucede más rápido que en ausencia de estos. La reacción se lleva a cabo en lugares específicos en la proteína llamados "sitios activos".

Por lo tanto, las enzimas son altamente específicas para los sustratos.

Para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, la celulasa más utilizada proviene del hongo *Trichoderma reesei*, debido a las ventajas que presenta la enzima: estabilidad bajo condiciones de hidrólisis enzimática, resistencia a inhibidores químicos y buena viabilidad económica de producción para aplicaciones industriales (3). La única desventaja de esta especie es la baja actividad que presenta con respecto a la β -glucosidasa, por lo cual usualmente se suplementa con enzima de *Aspergilli*.

Lignocelulosa

La celulosa es la fuente renovable de carbohidratos más abundante, con un estimado de 4×10^7 toneladas por año (4). Es un polímero constituido por unidades repetitivas de celobiosa.

El potencial de la biomasa lignocelulósica ha sido reconocido para la producción de bioetanol (5) y químicos (6). La sacarificación de celulosa, la velocidad de hidrólisis y disponibilidad también han sido comparados por Zhang (7). Esta materia prima representa un recurso más renovable que el petróleo.

Entre los cultivos potenciales para esta aplicación están el bagazo de maíz y residuos (8), bagazo de caña de azúcar (9), paja de arroz (5) y paja de centeno (10). Los desechos (6) y grano agotado (*distiller spent grain* en inglés) (11).

Hidrólisis de lignocelulosa

Para mejorar la disponibilidad de los hidratos de carbono de 6 carbonos (hexosas) de la biomasa lignocelulósica, deben tomarse en cuenta tres condiciones a cumplir:

- Remoción de la lignina y hemicelulosa
- Reducción de la cristalinidad de la celulosa
- Incremento en la porosidad (12) y área superficial (13)

El proceso de sacarificación de la biomasa combinado con un tratamiento térmico moderado es una alternativa para satisfacer estas condiciones, con una baja tasa de degradación de monómeros de carbono (14). Este proceso puede verse en la Gráfica 1.

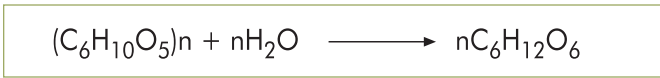
Pretratamiento de biomasa lignocelulósica

Uno de los objetivos principales del pretratamiento es la separación de la hemicelulosa presente en la biomasa. En la literatura pueden encontrarse varios pretratamientos, entre ellos explosión por vapor, agua caliente líquida (LHW por sus siglas en inglés), hidrólisis ácida, explosión de fibra con amoníaco (AFEX), hidrólisis alcalina, proceso organosolvente, entre otros (15), (2) (3) (12).

Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica

Después de que la biomasa lignocelulósica ha sido pretratada, la celulosa y hemicelulosa son removidas del complejo formado con la lignina (16). Las estructuras de celulosa se abren y los carbohidratos están disponibles en su forma simple para la fermentación. Esto puede hacerse utilizando enzimas tales como complejos celulásicos, que son selectivas para la reacción de celulosa a glucosa.

La reacción de hidrólisis que ocurre es la siguiente:



Parámetros de proceso

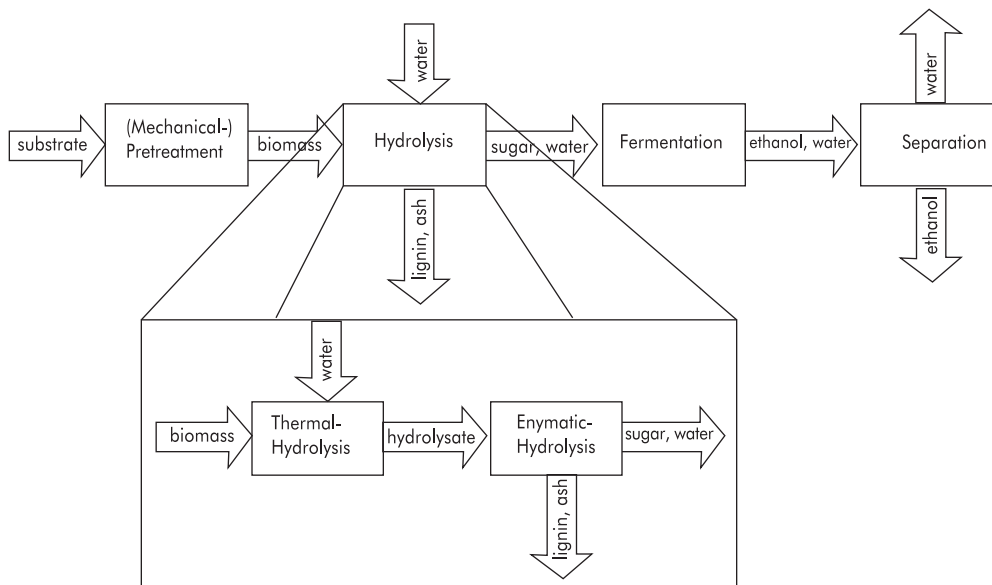
Los parámetros más importantes que controlan la actividad catalítica de una enzima son la temperatura y pH. Por lo tanto, los parámetros óptimos de la celulosa ya han sido establecidos en la literatura. Parámetros importantes son también la carga enzimática y carga biomásica.

La temperatura puede variar entre 45-50°C (3), aunque la temperatura óptima de la biomasa está alrededor de 5°C más bajos que en la celulosa pura (17). Para la celulosa de *T. reesei*, el pH debe estar entre 4.5 y 5 (3).

La esterilidad es un factor importante en la hidrólisis enzimática debido a que el producto es una solución diluida de azúcar, con el riesgo que existan contaminaciones microbianas, incluso a temperaturas alrededor de 50°C. Se recomienda realizar experimentos únicamente bajo condiciones estériles (18).

Se ha demostrado que al incrementar la concentración inicial de sustrato, la conversión de glucosa disminuye. Esto se conoce como el "efecto de sólidos" y no puede ser explicado por modelos actuales o el conocimiento de la interacción entre enzima y sustratos. El único efecto que parece tener cierta correlación es la proporción de celulosa adsorbida en la biomasa (19).

Gráfica 1. Diagrama de flujo de proceso de la síntesis de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, mostrando el pretratamiento térmico y enzimático como componentes de la hidrólisis. Reproducida a partir del trabajo de Ingram (14) con la debida autorización.



MATERIALES

Enzimas

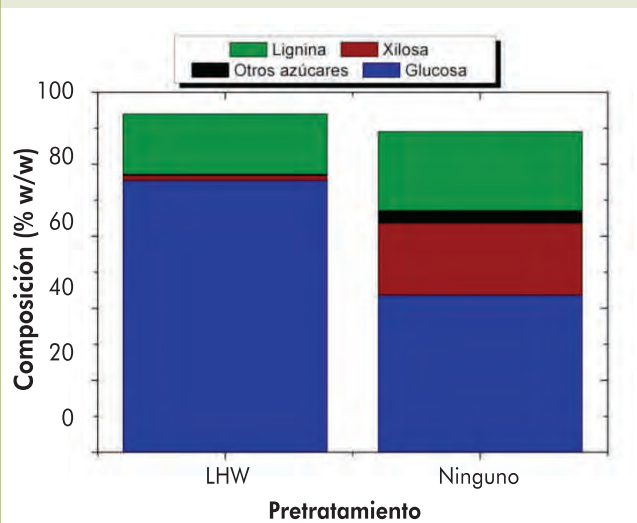
Celluclast 1.5 L producido por Novozymes Dinamarca se compró de Sigma-Aldrich. En dos lotes medidos, las actividades fueron 52 FPU/ml y 60 FPU/ml. El contenido de proteína medido con el test de Bradford fue 42.1 y 43.4 mg/ml respectivamente. La actividad de celobiasa fue de 68.9 CBU/ml. La enzima Novozyme 188 producida por Novozymes Dinamarca, contiene mayormente glucosidasa, que corta el enlace glicoidico 1-4 de la celobiasa. La actividad de Celobiasa es de 791 CBU/ml y el contenido de proteína es 31.5 mg/ml.

La enzima S se obtuvo como liofilizado de la fermentación de *Penicillium janthinellum*, la cual contiene 163.5 mg proteína/g liofilizado y actividades enzimáticas de 453 FPU/g y 166 CBU/g de glucosidasa.

Biomasa pretratada con LHW

La paja de centeno se compró con un distribuidor local. La composición típica se muestra en la . El contenido de humedad es 5.4% en base seca. Para la mayoría de experimentos, la biomasa fue tratada con agua subcrítica, como se describe en otra publicación (10). Las condiciones de pretratamiento son 210°C, 30 bar y tiempo variable de residencia. Este tiempo de residencia es determinado por un flujo de 4 ml/min y un uso de agua de 10 veces la biomasa, después que la presión deseada ha sido alcanzada. El residuo sólido después de ser analizado por hidrólisis ácida completa, resultó con una composición de glucosa de 76.6%.

Gráfica 2. Composición típica de paja de centeno con y sin pretratamiento térmico.



MÉTODOS

El desempeño del tratamiento con Agua Caliente Líquida (LHW) se estudió y optimizó para la producción de xilosa a partir de hemicelulosa (10) y lignina (2). El presente trabajo se enfoca en la utilización de la celulosa como fuente de glucosa para posterior fermentación a etanol, en el marco de la biorefinería.

Carga biomásica

La carga biomásica se define de la siguiente manera:

$$B = \frac{\text{masa seca (g)}}{\text{hidrolizado (g)}} * 100\%$$

Para diferentes cargas de biomasa seca, la cantidad de líquido se mantiene constante. Este valor se tomó por la facilidad que supone en el trabajo experimental y para los cálculos. Adicionalmente, la composición de la suspensión puede calcularse, asumiendo una densidad relativa de 1.00:

$$B_s = \frac{\text{masa seca (g)}}{\text{hidrolizado (g)}} * 100\% = \frac{B}{100\% + B}$$

Carga enzimática

La carga enzimática está representada en relación con la biomasa, en vez de la concentración en la suspensión. Cuando la cantidad de biomasa varía, la cantidad de enzima varía también, a manera de mantener BE constante. BE es la relación entre cantidad de biomasa y enzima, y es útil para procedimientos de laboratorio. Para caracterizar la carga de Celluclast se define:

$$E_{PB} = \frac{\text{mg proteína}}{\text{g biomasa}} \quad E_{AB} = \frac{\text{FPU}}{\text{g celulosa}}$$

Como se menciona previamente, las enzimas contenidas en Celluclast 1.5L no son suficientes para la hidrólisis completa de celulosa a glucosa. Por ello, glucosidasa debe ser agregada en forma de Novozyme 188. Esta adición se realiza en una razón específica, usando una razón de 5 ml Celluclast por 1 ml Novozyme, que corresponde a 5.6 g Celluclast/1 g Novozyme.

Condiciones del proceso

Parte de la biomasa se seca y tritura antes de la hidrólisis, mientras que otra parte se mantiene húmeda y se hidroliza justo después del pretratamiento térmico. En este caso, la biomasa es homogeneizada para obtener el mismo contenido de humedad.

Debido a que la esterilidad juega un factor importante en el análisis del hidrolizado, azida de sodio (NaN_3) se agrega a los preparados en una concentración de 0.02%, lo cual previene el crecimiento de microorganismos. La temperatura de hidrólisis es de 50°C y las muestras son agitadas en incubadores circulares a 120 rpm.

Arreglo experimental

Al trabajar con enzimas Celluclast 1.5L y Novozyme 188, éstas deben diluirse estas para asegurar una mejor medición volumétrica. Ambas se diluyen en solución buffer en la razón deseada. Para asegurar que los parámetros de proceso B y E son constantes, la cantidad de buffer debe ser ajustada al peso de biomasa. Cuando se utiliza biomasa húmeda, se realiza una corrección debido al contenido de agua. Es muy importante informarse acerca del contenido de humedad de la biomasa antes y después del pesar todas las

muestras, por lo que se toman dos muestras más para determinar la humedad: una al principio y otra al final.

Análisis

Determinación de composición de biomasa

La determinación de la composición de biomasa se realiza de acuerdo a los procedimientos publicados por NREL (20). Debe notarse que la glucosa producida es una indicación de la composición de celulosa, pero no es la cantidad exacta de ello. A partir de esta información, la composición de la biomasa puede calcularse.

Actividad enzimática y carga de proteína

Una unidad de actividad enzimática se define en U/ml como:

$$U = \frac{\text{cantidad de producto producido}}{\text{tiempo}}$$

Donde U está en [mol/s]. Por lo tanto la actividad enzimática se define como:

$$U = \frac{\text{unidad de actividad enzimática}}{\text{volumen}}$$

Para la medición de actividad de celulosa, el método de FPU (Filter Paper Unit) es utilizado. Este es el test de actividad celulósica más ampliamente utilizado, y es el método recomendado por IUPAC. Este método ha sido publicado por NREL (21). Debe tomarse en cuenta que la actividad enzimática no es una función lineal de la cantidad de enzima. Por lo tanto, una cantidad estándar debe ser seleccionada. Sin embargo, se ha observado linealidad en el intervalo de 0-45 FPU/ml, resultando aproximadamente en 0.4 FPU/mg proteína (22).

La actividad de β -glucosidasa se mide a través de la liberación de p-nitrofenol (PNP) a partir de nitrofenil-D-glucosidasa (PNPG). Se utiliza un buffer de 50 mM de acetato de sodio/ KH_2PO_4 /Tris, ajustando el pH a 5.0 con NaOH o HCl. Luego de 20 min de incubación, se agrega Na_2CO_3 , y la cantidad de PNP liberada se determina espectrofotométricamente a 405 nm. Una unidad de β -glucosidasa libera 1 μmol de PNP por minuto bajo las condiciones indicadas.

RESULTADOS

En el marco de la biorefinería, se optimizó la hidrólisis enzimática de biomasa tratada con Agua Caliente Líquida (LHW). Luego que la carga enzimática y otros factores de proceso fueron optimizados utilizando una baja carga biomásica, ésta se incrementó para obtener una alta concentración de glucosa. Esto es deseable para obtener hidrolizado adecuado para la posterior fermentación a etanol.

Varios autores han descrito y optimizado varios parámetros de la hidrólisis enzimática (12) (5) (7) (3). Sin embargo, algunos parámetros dependen directamente del sustrato y del pretratamiento. Uno de estos parámetros es la carga enzimática ideal, la cual es importante para tener un valor óptimo, en términos técnicos y económicos.

La carga biomásica está directamente relacionada con el fin de la hidrólisis enzimática, el cual es la obtención de un hidrolizado alto en glucosa para la fermentación. Por esta razón, se necesita una alta concentración de biomasa. También se resalta la diferencia entre la biomasa húmeda y la biomasa seca, la cual difiere por un fenómeno llamado hornificación. Este fenómeno es el endurecimiento de la estructura polimérica que ocurre en los materiales lignocelulósicos cuando se seca o se remueve agua y parece estar asociado con los puentes de hidrógeno perdidos al remover el agua (23).

A lo largo de todo el estudio, el parámetro más importante es la concentración de glucosa en el hidrolizado. Con este valor, es posible calcular la conversión de acuerdo con la reacción de hidrólisis. La glucosa producida se compara con aquella que se produciría luego de una hidrólisis completa de la biomasa. Valores más altos que 100% de conversión se pueden explicar debido al error en la hidrólisis ácidaⁱ; en este caso, conversión total debe ser considerada.

Carga enzimática

Las enzimas catalizan la sacarificación de la celulosa a glucosa. Al igual que en otros procesos químicos, la cantidad óptima de catalizador es un valor de alto interés y debe conocerse. En general, una mayor carga enzimática debe llevar a una velocidad de reacción más alta y por lo tanto, a una mayor conversión. La carga de enzima está relacionada directamente con la carga de biomasa. Por ello, para caracterizar la carga de enzima, se prefiere definir el valor E_{AC} . Para la comparación de la carga enzimática, hay dos límites importantes. Estos parámetros pueden definirse para describir las Curvas de Carga Enzimática (CCE) ζ_{max} , conversión máxima alcanzada, limitada a 100 FPU/g celulosa. Se relaciona con la capacidad de la enzima: 1) para atacar toda la celulosa y degradarla y 2) para adsorber, desorber y volver a adsorber, dadas ciertas condiciones (tiempo y secado). La conversión es una característica importante de la interacción de biomasa-enzima, pues esto indica hasta qué punto la biomasa puede ser utilizada. El uso de la lignina después de la hidrólisis enzimática es importante para la biorefinería, por lo cual una alta conversión es deseada. E_{min} es la carga mínima enzimática para alcanzar cierta conversión deseada. Como patrón de comparación, se establece una carga mínima enzimática para alcanzar una conversión $\zeta=90\%$.

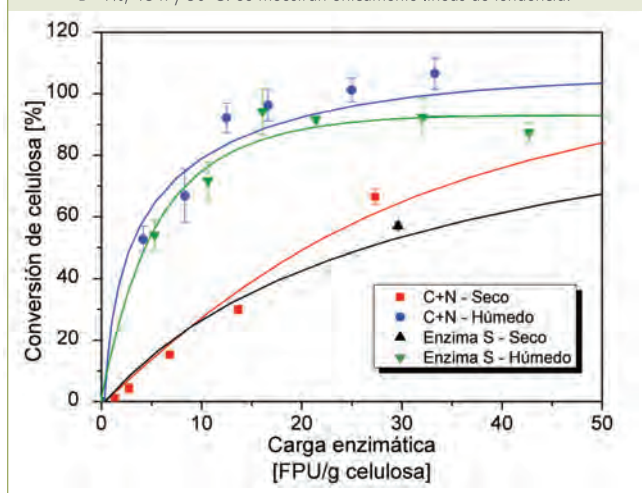
Curvas de saturación

Luego del pretratamiento, la biomasa está húmeda. Esta puede secarse y triturarse luego. Al comparar la biomasa seca y húmeda respecto a la carga enzimática, la última tiene un mejor desempeño, como puede verse en la Gráfica 3, pues se alcanzan mayores conversiones con una carga enzimática considerablemente más baja que con biomasa seca. Con una carga enzimática constante, la diferencia en glucosa producida entre biomasa seca y húmeda (expresada como conversión en las CCE) es una indicación de la celulosa disponible afuera de los poros, es decir, biomasa seca que no ha sido dañada por la rigidez de la biomasa, comparada con la celulosa a disposición dentro de los

ⁱ Durante la hidrólisis ácida para la determinación de composición de biomasa, ésta se hidroliza completamente. Sin embargo, pequeñas desviaciones en la determinación o la hidrólisis incompleta indeseada de la biomasa pueden hacer variar los valores de conversión (por ejemplo mayor a 100%).

poros en la biomasa húmeda. En la literatura puede encontrarse más estudios al respecto de este fenómeno llamado hornificación (24).

Gráfica 3. Curva de carga enzimática con biomasa seca y húmeda. B=1%, 48 h y 50°C. Se muestran únicamente líneas de tendencia.



Otros autores reportan la carga enzimática más baja en la literatura (6 mg enzima/g biomasa) con el tratamiento LHW (25), (26). Estos estudios reportan conversiones de 95% y 86% respectivamente, luego de 72 h de hidrólisis. Con este trabajo se alcanzó una conversión del 90% durante 48 h utilizando 7 mg enzima/g biomasa utilizando Celluclast y 4 mg enzima/g biomasa utilizando Enzima S, mostrando resultados comparables con la literatura. El hecho que la enzima S presenta un mejor desempeño en cuanto a carga de proteína, muestra el potencial del complejo de celulosa de *P. janthinellum*. Al comparar la actividad enzimática considerando E_{90} , Celluclast necesita una carga menor en términos de FPU/g celulosa para alcanzar 90% de conversión comparado con la Enzima S. La comparación de ζ_{max} también favorece a Celluclast sobre la Enzima S. Las causas para conversión incompleta y/o diferencias entre las diferentes enzimas pueden ser las siguientes:

- Baja actividad β -glucosídica. La Enzima S tiene una actividad β -glucosídica relativa de 0.36 CBU/FPU (1 CBUⁱⁱ/mg enzima), mientras que una mezcla de Celluclast con Novozyme en relación CN=5 tiene 3.6 CBU/FPU.

- Otras enzimas están presentes en Celluclast y Novozyme, y no está presente en la Enzima S. Estas enzimas pueden ser pectinasa y xilanasa. La actividad de xilanasa por FPU es igualmente baja en ambas enzimas (entre complejo C+N y Enzima S).

- La actividad de FPU refleja solamente un estimado de la actividad en un sustrato similar. Si la proporción de celulasasⁱⁱⁱ en la Enzima S es diferente de aquella de Celluclast, se obtiene una cantidad diferente de azúcares reductores.

- No todas las enzimas de la Enzima S pueden adherirse a la celulosa disponible, especialmente en la biomasa recalcitrante.

- Hay una adsorción preferencial en la lignina, lo cual produce una competencia improductiva.

Las cargas enzimáticas con biomasa húmeda en este trabajo muestran resultados comparables con la carga enzimática inferior presentada en la literatura, la cual se encuentra en un rango entre 5.5-75 mg enzima/g biomasa. En este trabajo se presenta el concepto de Curva de Carga Enzimática (CCE), para evaluar la carga enzimática óptima.

Carga biomásica

Después que el análisis de la Curva de Carga Enzimática (CCE) se completó y se obtuvieron valores óptimos para la carga enzimática, debe incrementarse la carga de biomasa de 1% a una carga mayor. Debe considerarse la capacidad de procesar la suspensión, la conversión final y la concentración final de glucosa. En la se muestra la conversión y concentración final de glucosa correspondiente luego de 48 h de hidrólisis usando la enzima C+N^{iv} y biomasa pretratada con LHW, como función de la carga de celulosa^v.

La carga de celulosa se varió, manteniendo el volumen constante. El límite superior está alrededor de $B_S=15\%$, tal como lo recomienda la literatura (19). En la gráfica 4, el eje y al lado izquierdo corresponde a la conversión final, la cual se muestra en barras. El eje y a la derecha muestra la concentración de glucosa alcanzada, la cual se muestra en puntos. El eje x corresponde a la carga de celulosa. Tal como se espera, la concentración de glucosa incrementa mientras la cantidad de biomasa incrementa. La hidrólisis alcanza conversión total, pero luego de $B_C=4\%$, la conversión decrece. Esto se conoce como el efecto de sólidos, como se define en la literatura (19). De acuerdo

Tabla 1. Parámetros característicos de Curvas de saturación enzimática.

Enzima	Secado de biomasa	Tiempo de hidrólisis	ζ_{max} [%]	E_{90} [FPU/g celulosa]	E_{90} [mg enzima/g biomasa]
C+N	seca	48	104	70	41
C+N	húmeda	48	104	15	7
C+N	húmeda	72	102	15	7
S	seca	48	96	>100	29
S	húmeda	48	94	15	4
S	húmeda	72	72	14	4

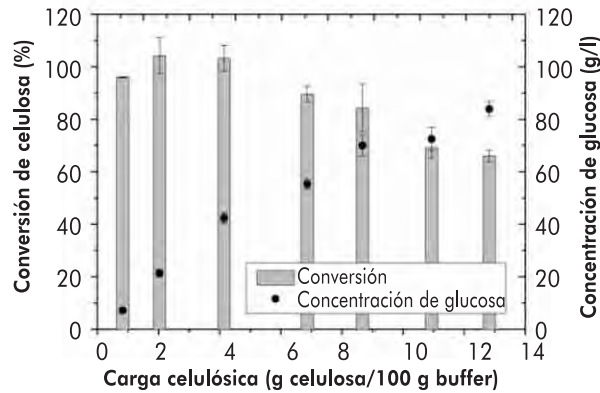
ⁱⁱ Unidades de celobiosa.

ⁱⁱⁱ Endoglucanasas y exoglucanasas, las cuales tienen efectos distintos y complementarios para la hidrólisis de celulosa a glucosa.

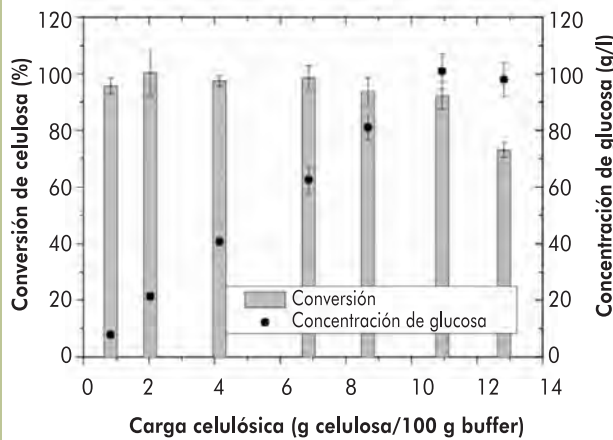
^{iv} Complejo Celluclast y Novozyme.

^v Se escogió la carga de celulosa en vez de la carga biomásica, para comparaciones con otros pretratamientos.

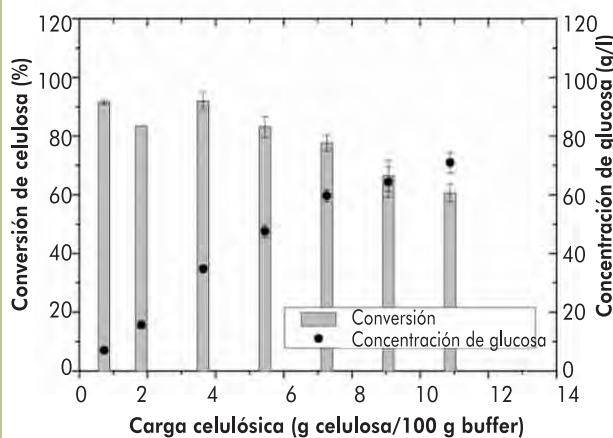
Gráfica 4. Curva de carga celulósica. Celuclast y Novozyme con $E_{AC}=13$ FPU/g celulosa. 48 h de hidrólisis.



Gráfica 5. Curva de carga celulósica. Celuclast y Novozyme con $E_{AC}=13$ FPU/g celulosa. 72 h de hidrólisis.



Gráfica 6. Curva de carga celulósica. Enzima S con $E_{AC}=13$ FPU/g celulosa. 48 h de hidrólisis.



con el autor, la razón principal para este efecto es la adsorción incompleta de la enzima en la biomasa, en altas cargas biomásicas. Este efecto puede verse a partir de cargas de celulosa de 6%.

Como se mencionó anteriormente, el complejo de Celluclast y Novozyme produjo mejores resultados que la enzima S respecto a la carga enzimática. Sin embargo, la enzima S parece ser atractiva utilizando otros pretratamientos (resultados no publicados). Como puede verse en la gráfica 6, la enzima S también permite utilizar una mayor carga de celulosa para hidrolizados con alta concentración de glucosa, incluso comparables con aquellos mostrados en la con C+N.

Efecto del tiempo

Hasta ahora se han mencionado resultados de hasta 48 h de hidrólisis. Sin embargo, se sabe que algunas celulasas aún son activas después de 48 h, si aún hay celulosa disponible^{vii}. Tiempos de reacción más largos representan una oportunidad de mejora para alcanzar conversiones más altas y por lo tanto, concentraciones más altas de glucosa. Algunos procesos industriales ya establecidos operan en hidrólisis en lote por 5 días, para alcanzar una alta conversión (1).

Efecto en carga biomásica

Como se describió en la sección anterior, tiempos más largos de reacción pueden producir conversiones más altas. Esto se muestra especialmente para biomasa tratada con LHW, donde dos experimentos se llevaron a cabo para evaluar el potencial de un tiempo de reacción más largo. En el primer experimento, la glucosa se midió después de 48 h y 72 h en una solución conteniendo $BC=8.8\%$ de carga de celulosa, con concentración de glucosa y conversión de 70 g/l (82%) y 81 g/l (91%) respectivamente. La curva de carga de celulosa después de 72 h se encuentra en la gráfica 5.

Los resultados muestran claramente que la biomasa tratada con LHW puede seguirse hidrolizando después de 48 h para producir más glucosa y obtener una conversión más alta. Esto es importante para la utilización de toda la biomasa, mostrando el potencial de una hidrólisis más larga. La Gráfica 4 muestra el perfil de conversión y la concentración de glucosa como función de la carga de celulosa. Esta es una gráfica similar a Gráfica 5, pero medida después de 72 h. El incremento en la concentración de glucosa y conversión, especialmente para una alta carga biomásica es evidente.

A manera de resumen se muestra en la Gráfica 7 la comparación entre la biomasa tratada con Enzima S luego de 48 h, la biomasa tratada con Complejo C+N luego de 48 h y la biomasa tratada con complejo C+N luego de 72 h. En la se muestra la concentración máxima alcanzada de glucosa y su respectiva conversión (101 g/l correspondiente a 90% de conversión) después de 72 h.

Modelo matemático de cinética de hidrólisis

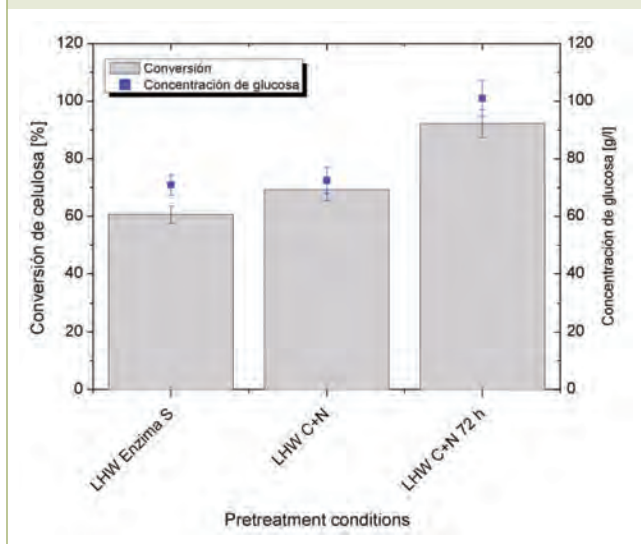
El perfil del tiempo de hidrólisis se utiliza para examinar la conversión alcanzada través del tiempo. Dependiendo del propósito de la hidrólisis, ésta puede ser por un largo tiempo en el orden de los días, o por un corto tiempo en el orden de horas. Por lo tanto, el conocimiento del tiempo de reacción es importante.

^{vi} La relación entre B_S y B_C es definida por la composición de celulosa de la biomasa pretratada. B_C representa la carga de celulosa en la suspensión. Para el caso mencionado en este artículo, $B_C=0.76B_S$.

^{vii} En el caso de una conversión incompleta por ejemplo.

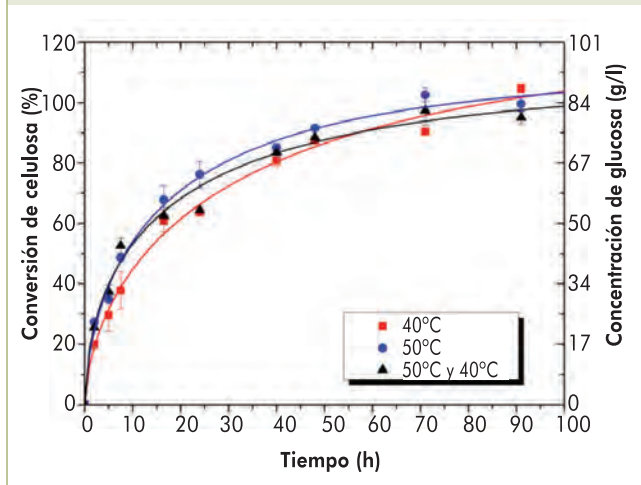
Gráfica 7.

Conversión de glucosa y concentración de azúcar buscando una alta concentración de glucosa. 50°C, 48 h hidrólisis si no se indica lo contrario. Para Celluclast y Novozyme $E_{AC}=13$ FPU/g celulosa, para Enzima S $E_{AC}=26$ FPU/g celulosa.



Gráfica 8.

Perfil de hidrólisis de biomasa húmeda hidrolizada con C+N. $E_{AC}=13$ FPU/g celulosa. Se ajustaron las líneas de tendencia con el modelo previamente mencionado.



Utilizando el complejo C+N y dos temperaturas de 40°C y 50°C, se obtuvieron los resultados mostrados en la Gráfica 8. La carga biomásica es de $B=10\%$ que corresponde a $B_C=7.7\%$ y la carga enzimática es de $E_{AC}=13$ FPU/g celulosa. Tal como se espera, la velocidad de hidrólisis en la primera hora

es alta. Gran parte de la enzima aún está activa, la celulosa amorfa es abundante y está disponible. A medida que transcurre el tiempo, las enzimas se vuelven inactivas debido a la inactivación térmica o a la adsorción irreversible en la lignina y celulosa, y cada vez hay menos celulosa disponible.

De acuerdo al modelo cinético fractal propuesto por Välijamäe, (27) se ajustaron los datos de la Tabla 2 en MATLAB a la siguiente ecuación, obteniendo los siguientes resultados mostrados en la Gráfica 8.

$$\zeta = \zeta_0 (1 - \exp(-kt^{1-f}))$$

Donde:

- $\zeta(t)$ conversión
- ζ_0 conversión máxima alcanzable con desactivación enzimática y sustrato ilimitado
- k constante empírica, análoga a la constante de decaimiento
- f constante empírica, mostrando la reducción de la velocidad constante con el tiempo debido a un sistema fractal.

La conversión máxima alcanzable ζ_0 , es un parámetro para ajustar la información, pero indica el alcance de las enzimas para la conversión si no hubiera escasez de sustrato, dada cierta tasa de retardo de reacción.

Tal como se esperaba, ζ_0 es más alto a 40°C que a 50°C, pues las enzimas a 40°C han sufrido una desactivación más leve que a 50°C. Además de eso, k (que representa la constante de velocidad de reacción) es un valor más alto para 50°C que para 40°C. Esto confirma la desactivación más severa a 50°C. El valor $1-f$, que indica la "tasa de retardo en el tiempo" (27) es igual en ambas temperaturas. Inicialmente se pensó en hacer uso de la alta velocidad de reacción al principio de la hidrólisis usando 50°C, y luego dando más estabilidad térmica a las enzimas para actuar a 40°C luego de 8 h de hidrólisis. Esto daría una mayor conversión que únicamente a 40°C ó 50°C. Sin embargo, esta estrategia no presentó ninguna ventaja sobre una única temperatura.

Discusión – potencial de la biorefinería para etanol

Luego de la optimización de la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, un análisis del proceso total de hidrólisis (térmica y enzimática) es necesario. A partir de los resultados del estudio previo (14) usando LHW como pretratamiento, pueden producirse hasta 256 g etanol/kg paja utilizando todos los sacáridos (glucosa y xilosa) y asumiendo una eficiencia de fermentación del 92%.

Si únicamente se utiliza la glucosa con una eficiencia de hidrólisis del 100%, la producción de etanol aún es alta, 198 g etanol/kg paja. Utilizando biomasa

Tabla 2. Parámetros de modelamiento de perfil en tiempo.

Temperatura	ζ^0 [%]	K [h^{-1}]	$1-f$ [-]	R^2 [-]
40°C	122.8	0.1103	0.614	0.9794
50°C	110.2	0.1638	0.614	0.9864
50°C y 40°C	108.2	0.1871	0.5581	0.9774

pretratada con LHW y carga biomásica de $B_C=11.1\%$, hidrolizada durante 72 h con Celluclast y Novozyme, puede producirse un hidrolizado con 101 g glucosa/l y 90% conversión. Esto representa una eficiencia de 162 g etanol/kg paja, con una concentración estimada de etanol de alrededor de 6.0% v/v. Esto corresponde a un 80% de la utilización de glucosa. La recuperación comparada con la biomasa y concentración final de bioethanol son los valores más altos encontrados en la literatura, lo cual muestra la aplicación de este método.

Esta es la segunda concentración más alta de glucosa a partir de hidrólisis de lignocelulosa encontrada en la literatura, después de la reportada por Lu (28). Sin embargo, Lu alcanzó únicamente 72.5% e conversión usando $B_S=30\%$.

Como se ha mencionado, la tecnología e investigación de la hidrólisis enzimática debe adecuarse a cada tipo de sustrato y pretratamiento, lo cual contribuye a la sostenibilidad de este proceso para producción de energía en muchas regiones del mundo. En esta publicación se presentan resultados sobre la paja de centeno por ser abundante en el norte de Alemania, pero pueden ser reproducidos para otros cultivos como el bagazo de caña o de maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Kamm, Birgit, Gruber, Patrick und Kamm, Michael. *Biorefineries*. Weinheim: Wiley, 2006.
- Wörmeyer, Kai. *Ligninproduktion in der bioraffinerie* Institute for Thermal Separations. Hamburg, Germany : University of Technology Hamburg-Harburg, 2009.
- Taherzadeh, Mohammad und Karimi, Keikhosro. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2007, Bd. 2, 3, S. 707-738.
- Kubicek, Christian. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. [Buchverf.] T. Coolbear. *Enzymes and products from bacteria fungi and plant cells*. Berlin : Springer, 1992, S. 1-27.
- Balat, Mustafa, Hawa Balat und Öz, Cahide. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, Bd. 34, 5, S. 551-573.
- Clark, James H. und Deswarte, Fabien E. I. *Introduction to Chemicals from Biomass*. Chichester : Wiley, 2008. S. 184.
- Zhang, Yi-Heng Percival und Lynd, Lee R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, Bd. 88, 7, S. 797-824.
- Varga, Enikő, Szengyel, Zsolt und Réczey, Kati. Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, Bde. 98-100, 1, S. 73-87.
- Martín, Carlos, et al. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, Bde. 98-100, 1, S. 699-716.
- Ingram, Thomas, et al. Semi-continuous liquid hot water pretreatment of rye straw. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2008, Bd. 48, 3, S. 238-246.
- Mussatto, Solange I., Dragone, G. und Roberto, Inês C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*. 2006, Bd. 43, 1, S. 1-14.
- Sun, Ye und Cheng, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002, Bd. 83, 1, S. 1-11.
- Yu, Yun, Lou, Xia und Wu, Hongwei. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*. 2008, Bd. 22, 1, S. 46-60. Nicht vorhanden.
- Ingram, Thomas. *Thermal and thermal-enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of bioethanol*. Institute of thermal and separation processes. Hamburg, Germany : University of Technology Hamburg-Harburg, 2008. Diplomarbeit.
- Mosier, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, Bd. 96, 6, S. 673-686.
- Hüssing, Bärbel, et al. *Biotechnologische Herstellung von Wertstoffen unter besonderer Berücksichtigung von Energieträgern und Biopolymeren*. Karlsruhe: Umweltbundesministerium, 2002. Bd. 64.
- Olsson, Lisbeth und Ahring, Birgitte. *Biofuels*. Berlin: Springer, 2007. 3540736506.
- Dowe, N. und McMillan, James D. *SSF Experimental Protocols*. [Hrsg.] National Renewable Energy Laboratory. Colorado : National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- Kristensen, Jan Bach, Felby, Claus und Jørgensen, Henning. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, Bd. 2, 11.
- Sluiter, A., et al. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. [Hrsg.] National Renewable Energy Laboratory. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- Adney, B. und Baker, J. *Measurement of cellulase activities*. [Hrsg.] National Renewable Energy Laboratory. Colorado : National Renewable Energy Laboratory, 1996.
- Decker, Stephen, et al. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003, Bd. 107, 1, S. 689-703.
- Jeoh, Tina, et al. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, Bd. 98, 1, S. 112-122.
- Fernandes Diniz, J. M. B., Gil, M. H. und Castro, J. A. A. M. Hornification—its origin and interpretation in wood pulps. *Wood Science and Technology*. 2004, Bd. 37, 6, S. 489-494.
- Liu, Chaogang und Wyman, Charles E. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 2005, Bd. 96, 18, S. 1978-1985.

26. Dien, Bruce S., et al. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, Bd. 39, 5, S. 1137-1144.
27. Välijamäe, Priit. *The Kinetics of Cellulose Enzymatic Hydrolysis: Implications of the Synergism Between Enzymes*. Uppsala, Sweden : Acta Universitatis Upsaliensis, 2002.
28. Lu, Yifeng, et al. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008.
29. Eklund, Robert, Galbe, Mats und Zacchi, Guido. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology*. 1990, Bd. 12, 3, S. 225-228.



(de izquierda a derecha)

M.Sc. Juan Carlos Ixcaraguá Lima
juancil@gmail.com

Dipl.-Ing. Kai Wörmeyer,

Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova,

Dipl.-Ing. Thomas Ingram