

## Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables

Cintia Chandler<sup>1</sup>, Nercy Villalobos<sup>1</sup>, Eduardo González<sup>2</sup>, Elsy Arenas<sup>1</sup>, Zulay Mármol<sup>1</sup>, Josybel Ríos<sup>3</sup> y Cateryna Aiello Mazzarri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorios de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Superficies y Catálisis, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

<sup>3</sup>Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas. Sector Palmarejo Viejo, km 15 vía La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela.

[caiello@fing.luz.edu.ve](mailto:caiello@fing.luz.edu.ve)

### Resumen

El objetivo de esta investigación fue obtener azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida diluida en dos etapas del bagazo de caña de azúcar. La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor autoclave de 100 mL de capacidad con ácido sulfúrico 1%v/v, relación líquido-sólido de 15:1 y tiempo de reacción de 3 minutos. La primera etapa de la hidrólisis se realizó en un rango de temperatura de 100-160°C. La fase sólida se separó de la fase líquida mediante filtración al vacío y el hidrolizado se almacenó bajo refrigeración a  $\pm 4^\circ\text{C}$ . El sólido remanente se utilizó en la segunda etapa, la cual se realizó a dos temperaturas: 160 y 180°C, manteniendo constante el resto de las condiciones. Se encontró que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores, así como también en la generación de algunos subproductos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos. Los mejores valores de temperatura para la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar mediante dos etapas secuenciales por carga fueron 140°C para la primera etapa y 180°C para la segunda. La presencia de furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y compuestos fenólicos indica que se producen reacciones de degradación asociadas tanto a pentosas como a hexosas derivadas de la hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa respectivamente. La conversión total de azúcares reductores, expresados como glucosa, a partir de las dos etapas secuenciales de hidrólisis fue de 306,07 g/kg de bagazo seco, equivalente al 39,41% del valor teórico.

**Palabras clave:** bagazo de caña de azúcar, hidrólisis ácida diluida, azúcares fermentables.

# Two-Stage Dilute-Acid Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse for Fermentable Sugar Production

## Abstract

The aim of this research was to obtain fermentable sugars from two-stage dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse. The hydrolysis was conducted in a 100 mL capacity autoclave reactor, with 1% v/v sulphuric acid, a liquid-solid ratio of 15:1 and 3-minute reaction time. The first stage of hydrolysis was performed in a temperature range of 100-160°C. The solid phase was separated from the liquid phase by vacuum filtration; the hydrolyzate was stored at  $\pm 4^\circ\text{C}$ . The remaining solid was used in the second stage, conducted at two temperatures: 160 and 180°C, maintaining other conditions constant. Temperature had a significant effect on the production of reducing sugars, as well as on the generation of by products that could be toxic to microorganisms. The best temperature values for sugar cane bagasse hydrolysis in two sequential batch stages were 140 and 180°C for the first and second stages, respectively. The presence of furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid, and phenolic compounds indicated that degradation reactions associated with both pentoses and hexoses derived from hemicellulose and cellulose hydrolysis, respectively, were occurring. The total conversion of fermentable sugars, expressed as glucose, from the two sequential hydrolysis stages, was 306.41 g/kg dry bagasse, equivalent to 39.41% of the theoretical value.

**Keywords:** sugarcane bagasse, two-stage hydrolysis, dilute acid, fermentable sugars.

## Introducción

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa (38-50%), hemicelulosa (17-32%) y lignina (15-30%). Se obtiene como subproducto de la molienda de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en los centrales azucareros y representa aproximadamente entre el 25 y 40% del total de materia procesada, dependiendo del contenido de fibra de la caña y la eficiencia en la extracción del jugo [22, 23].

Debido al alto contenido de carbohidratos y al bajo contenido de lignina, así como su disponibilidad, el bagazo puede ser considerado como un residuo agroindustrial con un alto potencial para obtener azúcares fermentables. Se han utilizado una serie de tratamientos para aumentar la accesibilidad de la celulosa, siendo la hidrólisis ácida uno de los métodos más frecuentes, tanto con ácido concentrado como diluido. Se ha reportado el uso de varios ácidos, siendo el ácido sulfúrico el más utilizado [21, 9, 16, 28, 27, 31], dada sus ventajas de cortos tiempos de reacción y bajo costo [17, 13].

El uso de ácidos concentrados resulta menos atractivo para la obtención de azúcares, con miras a la producción de etanol, debido a la formación de compuestos inhibidores de los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación. Además, ocurren problemas de corrosión en los equipos, difícil recuperación del ácido y alto costo de mantenimiento operacional, lo que hace que el método sea de poco interés a escala comercial [2].

Con la hidrólisis ácida diluida se consume menos cantidad de ácido comparado con la hidrólisis con ácido concentrado. Se solubiliza la hemicelulosa, facilitando la conversión del sustrato en azúcares fermentables. Sin embargo, dependiendo de la temperatura del proceso, se pueden generar algunos compuestos de degradación de los azúcares, furfural e hidroximetilfurfural, y de la lignina, los cuales afectan el metabolismo de los microorganismos utilizados en la etapa de fermentación a etanol [2, 5, 4, 10, 3]. Para evitar la degradación de los azúcares a altas temperaturas, así como la formación de inhibidores, la hidrólisis se puede llevar a cabo en dos etapas. Una primera etapa para convertir la hemicelulosa en sus monómeros constituyentes, a temperaturas relativamente

bajas (100-160°C). Una segunda etapa en la cual se hidroliza el sólido restante, transformando a la celulosa en glucosa, bajo condiciones más severas, a temperaturas más elevadas, entre 200-240°C [5, 4, 10, 26].

Estudios previos reportan que en la primera etapa se obtiene un rendimiento de azúcares, pentosas y hexosas de la hemicelulosa, entre 80 y 95% de los azúcares disponibles, mientras que en la segunda etapa el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa es bajo, entre 40 y 60% [16, 31, 20, 14]. Estos bajos rendimientos no son un problema ya que hay que considerar la alta disposición, el bajo costo de los materiales lignocelulósicos (desechos) y la posibilidad de utilizar estos materiales residuales en la producción de energía. Sin embargo, las condiciones de la hidrólisis en cada etapa deben ser estudiadas dependiendo del material a utilizar, ya que la complejidad estructural y composición depende del tipo de residuo o desechos que se esté utilizando.

En esta investigación se planteó encontrar las mejores condiciones de hidrólisis del bagazo de caña de azúcar, utilizando un proceso en dos etapas con ácido sulfúrico diluido, que permitan obtener el mayor rendimiento en la producción de azúcares, evaluando a su vez la formación de subproductos que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos empleados en las fermentaciones.

## Metodología

### Sustrato

Se utilizó bagazo de caña de azúcar proveniente del Central Azucarero La Pastora, ubicado en el Municipio Torres, Parroquia Cecilio Zubillaga, Carora, estado Lara. El bagazo se secó (hasta un 10%), se molió utilizando un molino de cuchillas (Thomas Wiley Laboratory Mill, modelo 4) y se tamizó para obtener un tamaño de partícula = 1mm. Luego se almacenó en bolsas plásticas de cierre hermético a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

### Hidrólisis

La hidrólisis del bagazo de caña de azúcar se realizó en dos etapas, utilizando un reactor autoclave (Parr Instruments, modelo 4593) de 100 mL de capacidad. El reactor de acero inoxidable (T316) está provisto de un horno y un agitador eléctrico. La temperatura y velocidad de agitación durante la hidrólisis fueron controladas y monitoreadas con un controlador modular. Se empleó ácido sulfúrico diluido al 1% v/v en una relación líquido-sólido de 15:1 [23] y tiempo de reacción de 3 minutos [16, 13, 20], realizando todos los ensayos por triplicado.

En la primera etapa, la hidrólisis ácida se realizó a temperaturas de 100, 120, 140 y 160°C. Finalizado el tiempo de reacción, la fase líquida se separó de la fase sólida por filtración al vacío. La fracción líquida se recolectó y se caracterizó determinando el contenido de azúcares reductores y de los subproductos de reacción, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural y polifenoles totales. El remanente se almacenó bajo refrigeración a  $\pm 4^\circ\text{C}$  para usos posteriores. Una vez obtenidos los resultados, se seleccionó la mejor temperatura de la primera etapa en función de la mayor concentración de azúcares reductores y menor generación de subproductos.

El bagazo obtenido de la primera etapa, a las condiciones seleccionadas, se lavó con agua destilada utilizando de 5 a 10 veces el líquido extraído. El bagazo resultante se sometió a calentamiento por 2h a 120°C [25], se mezcló con la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% v/v, manteniendo la relación líquido-sólido de 15:1, se colocó en el reactor y se sometió a la segunda etapa de la hidrólisis utilizando dos temperaturas, 160 y 180°C durante un tiempo de 3 min. Luego, se empleó el mismo procedimiento utilizado en la primera etapa para la separación de las fracciones líquida y sólida. El hidrolizado obtenido se analizó determinando el contenido de azúcares reductores y de los subproductos de reacción, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural y polifenoles totales, almacenando el remanente bajo refrigeración a  $\pm 4^\circ\text{C}$  para posteriores estudios.

## Métodos de análisis

El bagazo de caña de azúcar se caracterizó determinando el contenido de humedad y cenizas siguiendo el método descrito en las normas COVENIN 1156-79 y 1155-79 [6, 7]. El contenido de proteína cruda se calculó multiplicando por 6,25 el contenido de nitrógeno determinado por el método de Kjeldahl descrito en la norma COVENIN 1195-80 [8].

Se determinó el contenido de fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD) según Goering y Van Soest [11] y se calculó el contenido de celulosa, hemicelulosa y solubles utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Celulosa (\%)} = \text{FAD (\%)} - \text{LAD (\%)}$$

$$\text{Hemicelulosa (\%)} = \text{FND (\%)} - \text{FAD (\%)}$$

$$\text{Solubles (\%)} = 100 - \% \text{ FND}$$

El contenido de azúcares reductores, en el bagazo sin hidrolizar e hidrolizado (azúcares residuales) y en las muestras de hidrolizado provenientes de la primera y se-

gunda etapa de la hidrólisis, se determinó por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller [19]. Las muestras se analizaron por triplicado.

El contenido de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) se determinó por HPLC utilizando un cromatógrafo Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con un detector UV visible (G1314A) y una columna C18 (4,6 mm ID x 150 mm, 5 $\mu$ m). El análisis se realizó a temperatura ambiente (26  $\pm$  2°C), velocidad de flujo de 1,0 mL/min y volumen de inyección de 20  $\mu$ L a una longitud de onda de 280 nm. Se utilizaron patrones grado HPLC para furfural (0,05–1,5 mg/mL) e HMF (0,05–1,0 mg/mL) y como fase móvil acetonitrilo: agua en proporción 30:70. Previo a la inyección, las muestras de hidrolizado se neutralizaron, ajustando el pH entre 4,5 y 5,5 con una solución 6N de NaOH. Las muestras y las soluciones patrón se filtraron dos veces utilizando filtros de membrana de celulosa de 0,2  $\mu$ m (Whatman). La inyección se realizó en forma manual utilizando una jeringa de filtrado de acetato de celulosa de 0,20  $\mu$ m estéril (Advantec, Dismic–25cs).

La concentración de compuestos fenólicos se determinó por el método colorimétrico de Singleton y Rossi [30] con algunas modificaciones descritas por Kim y colaboradores, [15] utilizando ácido gálico seco para la curva patrón. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de UV visible Genesys 10UV (Thermo Scientific Electron Corp.) a una longitud de onda de 750nm.

El contenido de ácido acético se cuantificó por Cromatografía de Gases, utilizando un cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies) provisto de detector de ionización de llama (FID), inyector y portal de muestras automático y una columna Capilar HP-5 (diámetro interno de 0,320 mm, 30 cm de longitud y 0,25  $\mu$ m nominal). Se utilizó helio como gas de arrastre, flujo total 28,6 mL/min, split de 30:1 y temperaturas del inyector, del horno y del FID de 230, 70 y 250°C respectivamente. La curva patrón del ácido acético se preparó de 0 a 72 ppm.

El procesamiento de los datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de media HSD de Tukey para todos los resultados, utilizando el paquete estadístico *SPSS Statistics* 17.0.

## Resultados y discusión

### Composición del bagazo de caña de azúcar

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la caracterización del bagazo de caña de azúcar sin hidrolizar. Los valores encontrados son similares a los reportados por Ferrer y colaboradores, [9] y Abreu y De la Rosa [1]. Sin embargo, al comparar con otros trabajos [22, 12,

Tabla 1. Caracterización del bagazo de caña de azúcar sin hidrolizar.

| Componente          | Contenido (%)    |
|---------------------|------------------|
| Materia Seca        | 94,81 $\pm$ 0,32 |
| Proteínas           | 1,75 $\pm$ 0,09  |
| Azúcares residuales | 0,34 $\pm$ 0,02  |
| Celulosa            | 62,25 $\pm$ 0,89 |
| Hemicelulosa        | 7,99 $\pm$ 1,01  |
| Lignina             | 12,49 $\pm$ 0,08 |
| Solubles            | 17,28 $\pm$ 0,04 |

Nota: Cada valor es el promedio de tres réplicas, expresado en base seca..

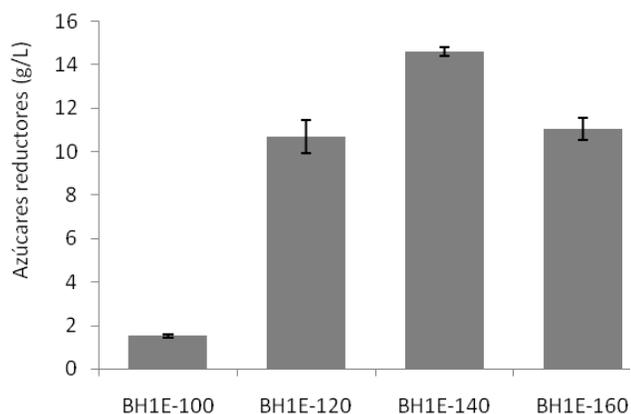
18, 32], el contenido de celulosa se encuentra por encima del rango de 30-50% reportado, mientras que la hemicelulosa se encuentra muy por debajo (20-30%) y la lignina es ligeramente inferior (15-20%). El alto contenido de carbohidratos permite afirmar, que el bagazo de caña de azúcar es un residuo agroindustrial que posee un gran potencial para ser transformado por las distintas vías de sacarificación y convertido en producto de mayor valor agregado.

### Primera etapa de hidrólisis

En la Figura 1 se muestra la producción de azúcares reductores, expresados como glucosa, durante la primera etapa de hidrólisis. Se observa que la producción de azúcares reductores es mayor cuando la hidrólisis se realiza a temperaturas mayores a 100°C, alcanzando un máximo a 140°C. Sin embargo, al aumentar de 140 a 160°C el comportamiento cambia, disminuyendo la cantidad de azúcares producidos. La máxima producción de azúcares se alcanzó a 140°C y fue de 14,60  $\pm$  0,21 g/L, valor este 9,7 veces al mayor al obtenido a 100°C y 1,3 veces mayor al encontrado para 120 y 160°C.

En la Tabla 2 se presenta la conversión y el rendimiento en la producción de azúcares durante la primera etapa de la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar. Tal como se esperaba, a temperaturas bajas la concentración de azúcares fermentables es baja, obteniéndose un valor máximo de 1,51 g/L que representa una conversión del 18,60 g glucosa/kg bagazo seco y un rendimiento del 2,41% en relación a la cantidad de azúcar teórico.

La máxima conversión, 224,23 g glucosa/kg bagazo seco y el máximo rendimiento, 29,02%, se obtuvieron en la hidrólisis a 140°C. Estos valores indican un incremento en la producción de azúcares de más del 90% en comparación con la hidrólisis realizada 100°C. Sin embargo, al aumentar la temperatura de la hidrólisis a 160°C la cantidad de azúcares reductores producidos, expresados como glu-



**Figura 1.** Producción de azúcares reductores durante la primera etapa de las hidrólisis con ácido sulfúrico diluido al 1%, relación líquido-sólido de 15:1 y diferentes temperaturas (H1E-xxx: hidrólisis primera etapa a 100, 120, 140 y 160°C).

cosa, disminuye en comparación con la obtenida en la hidrólisis a 140°C, lo cual sugiere que pudieran estar ocurriendo algunas reacciones de descomposición de los azúcares, por ejemplo hacia la formación de furfural.

Este comportamiento es similar al reportado por Saucedo-Luna y colaboradores, [29] durante la primera etapa de la hidrólisis de bagazo de agave con ácido sulfúrico diluido al 1%, quienes encontraron que a bajas temperaturas, con tiempo de reacción de diez minutos, la concentración de azúcares fue muy baja, de 2,5 g/L a 100°C, indicando que al aumentar la temperatura de la hidrólisis, aumenta la producción de azúcares, alcanzando 15 g/L a 200°C. Además, encontraron que a 200°C la concentración de azúcares disminuye con el tiempo de reacción, sugiriendo la existencia de reacciones de descomposición, con posible formación de furfural.

En la Tabla 3 se muestra el contenido de celulosa y hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar que se obtiene como residuo sólido de la primera etapa de hidrólisis. Se

observa que el contenido de celulosa permanece prácticamente constante durante las hidrólisis a 100 y 120°C, no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores obtenidos y el contenido del bagazo no hidrolizado. La hidrólisis a 140°C provocó una disminución del contenido de celulosa de 6,5%, mientras que a 160°C fue de 8,2%. En cuanto al contenido de hemicelulosa se observa que a bajas temperaturas la solubilización es menor, encontrándose que a 100°C se solubilizó el 35% de la hemicelulosa presente en el bagazo no hidrolizado, lo cual junto con la no solubilización de la celulosa explica la poca producción de azúcares encontrada durante la hidrólisis a esta temperatura.

Al aumentar la temperatura de la hidrólisis se observó que aumentó la solubilización de la hemicelulosa, alcanzando un 42%, no existiendo diferencias significativas entre los valores obtenidos para la hidrólisis a 120 y 140°C. Esto coincide con el aumento en la concentración de azúcares en el hidrolizado. A 140°C se obtuvieron los valores máximos de conversión y rendimiento en la producción de azúcares reductores, coincidiendo con el incremento en la solubilización de la celulosa y de la hemicelulosa. La mayor solubilización tanto de celulosa (8,2%) como de hemicelulosa (64,56%) se encontró en la hidrólisis a 160°C; sin embargo, la producción de azúcares fue menor que a 140°C ( $p < 0,05$ ) y similar a la encontrada a 120°C ( $p > 0,05$ ), indicando que existe una pérdida de azúcares, la cual podría estar asociada con reacciones de degradación de las pentosas, con la consecuente formación de furfural.

En la Tabla 4, se muestra junto a los azúcares reductores (AR), el contenido de compuestos inhibidores generados durante esta primera etapa de hidrólisis.

Se observa que a todas las temperaturas (100, 120, 140 y 160°C) se encontró la presencia de furfural, cuya concentración aumenta a medida que la temperatura de la hidrólisis es más alta, siendo la máxima concentración  $1,656 \pm 0,016$  g/L a

**Tabla 2.** Rendimiento de los azúcares reductores producidos en la primera etapa de la hidrólisis con ácido sulfúrico diluido al 1%, relación líquido-sólido de 15:1 y diferentes temperaturas.

| Hidrólisis | Concentración de azúcares reductores (g glucosa/L) | Conversión (g glucosa/Kg bagazo) | Rendimiento (%) |
|------------|--|----------------------------------|-----------------|
| H1E-100    | $1,51 \pm 0,09a$                                   | 18,60                            | 2,41            |
| H1E-120    | $10,70 \pm 0,78b$                                  | 162,97                           | 21,09           |
| H1E-140    | $14,60 \pm 0,21c$                                  | 224,23                           | 29,02           |
| H1E-160    | $11,05 \pm 0,51b$                                  | 168,46                           | 21,80           |

Nota: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). % Conversión; (g glucosa/kg de bagazo seco), %Rendimiento: (mg azúcares experimentales/mg azúcares teóricos)\*100. MS: materia seca H1E-xxx: hidrólisis primera etapa, donde xxx corresponde a 100, 120, 140 y 160°C.

Tabla 3. Contenido de celulosa y hemicelulosa en el bagazo de caña de azúcar sometido a la primera etapa de hidrólisis.

| SUSTRATO | Celulosa (%)   | Hemicelulosa (%) |
|----------|----------------|------------------|
| BNH      | 62,25 ± 0,89 a | 7,99 ± 1,01a     |
| BH1E-100 | 60,15 ± 0,50a  | 5,20 ± 1,00b     |
| BH1E-120 | 60,92 ± 1,81a  | 4,58 ± 0,12c     |
| BH1E-140 | 58,21 ± 0,01b  | 4,66 ± 0,39c     |
| BH1E-160 | 57,12 ± 1,00c  | 2,83 ± 0,44c     |

Nota: Los valores están expresados en base seca. BNH: Bagazo no hidrolizado BH1E-xxx: bagazo resultante de la primera etapa de hidrólisis, donde xxx corresponde a 100, 120,140 y 160°C. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Fuente: Propia.

Tabla 4. Valores promedio de los resultados obtenidos en la primera etapa de hidrólisis.

| Temperatura (°C) | AR (g/L)      | Furfural (g/L)             | HMF (g/L)      | Ácido acético (g/L) | Compuestos fenólicos (g/L) |
|------------------|---------------|----------------------------|----------------|---------------------|----------------------------|
| 100              | 1,51 ± 0,09a  | 0,224 ± 0,002 <sup>a</sup> | ND             | 0,019 ± 0,001a      | 0,155 ± 0,012a             |
| 120              | 10,70 ± 0,78b | 0,487 ± 0,060 <sup>b</sup> | ND             | 0,061 ± 0,003b      | 0,430 ± 0,019b             |
| 140              | 14,60 ± 0,21c | 1,168 ± 0,089 <sup>c</sup> | 0,047 ± 0,008b | 0,058 ± 0,001b      | 0,717 ± 0,047c             |
| 160              | 11,05 ± 0,51b | 1,656 ± 0,016 <sup>d</sup> | 0,276 ± 0,002c | 0,079 ± 0,003d      | 1,578 ± 0,041d             |

Nota: Medias con igual letra no difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). ND: no detectable.

Fuente: Propia.

160°C. No se detectó HMF a las temperaturas de 100 y 120°C, mientras que a 140°C se encontró a una baja concentración,  $0,047 \pm 0,008$  g/L. La máxima concentración de HMF,  $0,276 \pm 0,002$  g/L, se encontró para la hidrólisis realizada a 160°C. Estos resultados indican que pudieran estar ocurriendo reacciones de degradación de los monosacáridos derivados de la hidrólisis de la hemicelulosa [14,29].

En todas las hidrólisis, a las diferentes temperaturas ensayadas, se generó ácido acético, observándose que su contenido aumentó a medida que la temperatura de la hidrólisis fue mayor. La menor concentración (0,019 g/L) se encontró en la hidrólisis a 100°C, mientras que la mayor concentración (0,079 g/L) se obtuvo a 160°C, lo cual se corresponde con la menor y la mayor solubilización de hemicelulosa, respectivamente. A 120 y 140°C las concentraciones de ácido acético fueron similares, 0,061 y 0,058 g/L, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre estos valores ( $p > 0,05$ ).

El contenido de compuestos fenólicos aumentó con el incremento en la temperatura de la hidrólisis. La mayor concentración, 1,578 g/L, se encontró en la hidrólisis realizada a 160°C. Este valor es similar al reportado por Chandel y colaboradores, [5] para la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar en una sola etapa, con ácido sulfúrico diluido al 1,5% durante 30 minutos (1,58 g/L) pero menor al valor reportado (2,75

g/L) con concentración de ácido de 2,5% y el mismo tiempo de reacción.

En base a estos resultados, el mayor rendimiento en la producción de azúcares reductores con la menor formación de subproductos que puedan resultar tóxicos para los microorganismos, se seleccionó la temperatura de 140°C como la mejor condición de hidrólisis para la primera etapa y proceder a los ensayos de la segunda etapa.

## Segunda etapa de hidrólisis

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la producción de azúcares reductores luego de la segunda etapa de hidrólisis del bagazo de caña de azúcar previamente sometido a una primera etapa de hidrólisis a 140°C. En ambas etapas la hidrólisis se realizó con ácido sulfúrico diluido al 1% y relación líquido sólido de 15:1 [23], durante 3 minutos [16, 13, 20].

Se observa que al incrementar la temperatura de la hidrólisis, se produce un ligero aumento, en el orden del 10%, en la producción de azúcares, alcanzándose un máximo de  $5,38 \pm 0,07$  g/L a 180°C. Este valor representa una conversión de 81,84% en función del bagazo seco y un rendimiento del 11,83% en

relación al valor teórico o cantidad de azúcar teórica presente en el sustrato. Un comportamiento similar fue reportado por Saucedo-Luna y colaboradores, [29] durante la segunda etapa de hidrólisis de bagazo de agave a diferentes temperaturas (150, 175 y 200°C) con ácido sulfúrico diluido al 2% previamente hidrolizado a 150°C durante 10 minutos. Encontraron además, que la producción de azúcares aumentó al aumentar la temperatura de la hidrólisis, con una producción máxima de 14 g/L de azúcares fermentables a los 10 minutos de reacción a 175°C, lo cual equivale a una conversión de 84 g azúcares/kg de bagazo. Esta conversión es muy similar a la encontrada en este estudio.

A diferencia de lo observado en la primera etapa, no se detectó la formación de furanos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) producto de la segunda etapa de hidrólisis (Tabla 6) realizada a 160 y 180°C, indicando que no se producen reacciones de degradación de la glucosa liberada producto de la hidrólisis de la celulosa. Se ha indicado la formación de furfural en hidrólisis realizadas a temperaturas en el rango estudiado (175°C) utilizando 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y tiempos de reacción de diez minutos [29].

El contenido total de compuestos fenólicos aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) con el incremento en la temperatura de la hidrólisis, encontrándose a 180°C un valor de 2,746 g/L, siendo este 25% mayor que el encontrado para la hidrólisis a 160°C. Ambos contenidos son superiores a los valores encontrados en la primera etapa, lo

cual pudiera sugerir que existe una degradación de la lignina presente. Se generó ácido acético en las hidrólisis realizadas tanto a 160°C, como a 180°C, con valores de 0,173 y 0,128 g/L respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Estos valores son superiores a los encontrados en la primera etapa de las hidrólisis a las diferentes temperaturas ensayadas y pudieran estar generándose cuando las reacciones de hidrólisis ocurren a nivel de las pentosas acetiladas de la hemicelulosa [24].

En base a la mayor conversión de azúcares y dado que existe muy poca diferencia entre los valores encontrados de compuestos que pudieran causar inhibición durante los procesos de fermentación se puede indicar que la mejor temperatura para la segunda etapa de hidrólisis es 180°C. Los posibles efectos que pudiera causar la presencia de compuestos fenólicos en el hidrolizado pudieran solventarse aplicando algún método de detoxificación que permita reducir los niveles a valores que no afecten el metabolismo de los microorganismos utilizados.

## Conclusiones

La temperatura tiene un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores, así como también en la generación de algunos subproductos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación a etanol. Para la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar con ácido sulfúrico diluido al 1%, re-

Tabla 5. Producción de azúcares reductores durante la segunda etapa de la hidrólisis (H2E) del bagazo de caña de azúcar con ácido sulfúrico diluido al 1%, relación líquido-sólido de 15:1 y diferentes temperaturas

| Hidrólisis | Azúcares reductores<br>(g glucosa/L) | Conversión<br>(g glucosa/kg bagazo) | Rendimiento<br>(%) |
|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| H2E-160    | 4,89 ± 0,13a                         | 74,40                               | 10,76              |
| H2E-180    | 5,38 ± 0,07b                         | 81,84                               | 11,83              |

Nota: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). % Conversión; (mg glucosa/g MS)\*100, %Rendimiento: (mg azúcares experimentales/mg azúcares teóricos)\*100. MS: materia seca. H2E-xxx: hidrólisis segunda etapa, donde xxx corresponde a 160 y 180°C.

Tabla 6. Contenido de furanos, ácido acético y compuestos fenólicos generados durante la segunda etapa de la hidrólisis (H2E) del bagazo de caña de azúcar con ácido sulfúrico diluido al 1%, relación líquido-sólido de 15:1 y diferentes temperaturas.

| Hidrólisis | Furfural<br>(g/L) | Hidroximetilfurfural<br>(g/L) | Compuestos fenólicos (g/L) | Ácido acético (g/L) |
|------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------|
| H2E-160    | ND                | ND                            | 2,183 ± 0,018a             | 0,173 ± 0,034a      |
| H2E-180    | ND                | ND                            | 2,746 ± 0,025b             | 0,128 ± 0,038a      |

Nota: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). ND: no detectado H2E-xxx: hidrólisis primera etapa, donde xxx corresponde a 160 y 180°C.

lación líquido sólido de 15:1 durante 3 minutos, en un proceso de dos etapas secuenciales por carga las mejores temperaturas son 140°C y 180°C para la primera y segunda etapa, respectivamente. La presencia de ácido acético y compuestos fenólicos, indican que se producen reacciones de degradación asociadas tanto a pentosas y hexosas, como a la lignina. La conversión total de azúcares reductores, expresados como glucosa, a partir de las dos etapas secuenciales de hidrólisis fue de 306,07 g/Kg de bagazo seco, equivalente al 39,41% del valor teórico. Este rendimiento se considera aceptable tomando en cuenta que el bagazo de caña de azúcar es un desecho lignocelulósico de muy bajo costo, además de la posibilidad de utilizar el residuo sólido en procesos de combustión para generar electricidad y calor.

### Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Tecnología de Alimentos, al Laboratorio de Fermentaciones Industriales y al Instituto de Superficies y Catálisis (INSUC) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia, así como al Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT) por su gran apoyo para la realización para la experimentación y análisis de muestras. Esta investigación fue financiada por Consejo de Desarrollo Científico y Tecnológico (CONDES) de la Universidad del Zulia mediante el Proyecto N°CC-0329-10.

### Referencias

- [1] ABREU, M.; DE LA ROSA, O. (2011) Producción de azúcares fermentables por hidrólisis ácida diluida del bagazo de caña de azúcar. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- [2] ALVIRA, P.; PEJÓ, T.; BALLESTEROS, M., NEGRO, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Biores. Technol.** 101, 4851-4861.
- [3] CHANDEL, A.; SILVEIRIO DA SILVA, S.; SINGH, O., (2011). Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, Marco Aurélio dos Santos Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-478-8, In: Tech, pp 225-246.
- [4] CHANDEL, A.; SINGH, O.; RAO, L. (2010) Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art. In: Singh OV, Harvey SP (eds) **Sustainable biotechnology: renewable resources and new perspectives**. Springer, Dordrecht, pp 63-8.
- [5] CHANDEL, A.; KAPOOR, R.; SINGH, A.; KUHAND, R. (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolyzate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 2501. **Biores. Technol.** 98, 1947-1950.
- [6] COVENIN (1979a) Alimentos concentrados para animales. Determinación de cenizas (Norma 1155-79). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
- [7] COVENIN (1979b) Alimentos concentrados para animales. Determinación de humedad (Norma 1156-79) Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
- [8] COVENIN (1980) Alimentos. Determinación de nitrógeno. Método de Kjeldahl (Norma 1195-80). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
- [9] FERRER, J.; PÁEZ, G.; ARENAS de MORENO, L.; CHANDLER, C.; MÁRMOL, Z.; SANDOVAL, L. (2002) Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. **Revista de la Facultad de Agronomía**, 19: 23-33.
- [10] GÍRIO, F.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.; MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R.; (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Biores. Technol.** 101: 4775-4800.
- [11] GOERING, H.; VAN SOEST, P. (1970) Forage fiber analysis. **Agricultural handbook**. N° 379. USDA, Washington, DC. USA.
- [12] HOLTZAPPLE, M.; JUN, J.; ASHOK, G.; PATIBANDIA, S.; DALE, B. (1991). The ammonia freeze explosion (AFEX) process: A practical lignocellulose pretreatment. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 28/29, 59-74.
- [13] JEON, T.; KIM, Y.; OH, K.; (2011). Two-stage acid saccharification of fractionated *Gelidium amansii* minimizing the sugar decomposition. **Biores. Technol.** 102: 10529-10534.
- [14] KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M.; (2006) Ethanol production from dilute-acid pretreated rice Straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Sacharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technol.** 40: 138-144.
- [15] KIM, D.; JEONG, S.; LEE, Ch. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, 81, 321-326.
- [16] KIM, K.; TUCKER, M.; NGUYEN, Q. (2005). Conversion of bark-rich biomass mixture into fermentable sugar by two-stage dilute acid + catalyzed hydrolysis. **Biores. Technol.** 96: 1249-1255.
- [17] LENIHAN, P.; OROZCO, A.; O'NEILL, E.; AHMAD, M.; ROONEY, D.; WALKER, G. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chem. Eng. J.** 156, 395-403.
- [18] MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L. (2002) Comparison of fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 98/100, 699-716.
- [19] MILLER, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31, 426-428.
- [20] NGUYEN, Q.; TUCKER, M.; KELLER, F.; BEATY, D.; CONNORS, K.; EDDY, F.; (1999) Dilute acid hydrolysis of softwoods. **Applied Biochemistry Biotechnol.** 77-79: 133-142.
- [21]

- NGUYEN, Q.; TUCKER, M.; KELLER, F.; EDDY, F.; (2000) Two-Stages Dilute-Acid pretreatment of softwoods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 84-86:561-576.
- [22] PERNALETE, Z.; PIÑA, F.; SUÁREZ, M.; FERRER, A.; AIELLO, C. (2008). Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. **Bioagro** 20(1): 3-10.
- [23] PIÑA, M.; SÁNCHEZ, J. (2007). Hidrólisis del bagacillo de la caña de azúcar a bajas concentraciones de ácido y diferentes relaciones líquido-sólido. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- [24] RODRÍGUEZ, CHONG, A.; RAMÍREZ, J.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. (2004) Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **J. Food Eng.** 61: 143-152.
- [25] SÁNCHEZ, G.; PILCHER, L.; ROSLANDER, C.; MODIS, T.; GALBE, M.; LINDEN, G. (2004). Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian Straw material Paja Brava. **Biores Technol.** 93: 249-256.
- [26] SÁNCHEZ, O.; CARDONA, C. (2008). Trends in Biotechnological production of fuel ethanol from different feedstock. **Biores Technol.** 99: 5270-5295.
- [27] SANTANILLA, E.; OVIEDO, A.; VARGAS, I. (2006) Hidrólisis ácida de sustratos residuales agroindustriales colombianos. **Umbral Científico** 8: 5-11.
- [28] SARROUH, B.; JOVER, J.; GONZÁLEZ, E.; (2005) Estudio de la hidrólisis del bagazo con ácido sulfúrico concentrado utilizando dos variantes de una sola etapa y una sola etapa modificada para la obtención de etanol y análisis técnico-económico de dicho proceso. **Rev. Ing. Inv.** 25: 36-37.
- [29] SAUCEDO-LUNA J.; CASTRO-MONTOYA, A.; RICO, J.; CAMPOS-GARCÍA, J. (2010) Optimization of acid hydrolysis of bagasse from *Agave tequilana* Weber. **Rev. Mex. Ing. Qca**, 9 (1): 91-97.
- [30] SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. (1965) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Method Enzymol.** 299, 152-178.
- [31] TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. (2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources.** 2(3), 491.
- [32] URRIBARRÍ, L. (2011) Sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de la caña de azúcar tratado con amoníaco. Tesis Doctoral. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- [33] VARGAS, J.; RUÍZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; BARRIENTOS, L.; GARCÍA, P.; LÓPEZ, F. (2011) Fermentable sugars from *Lupinus rotundiflorus* biomasa by concentrate dhydrochloric acid hydrolysis. **Bio Resources** 6(1): 344-355.