



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES



“HIDRÓLISIS ÁCIDA DE *Pinus radiata* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL MEDIANTE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA ”

HERIBERTO FRANCO ÁVILA

CONCEPCIÓN, 5 DE MAYO DE 2009

➤ Introducción

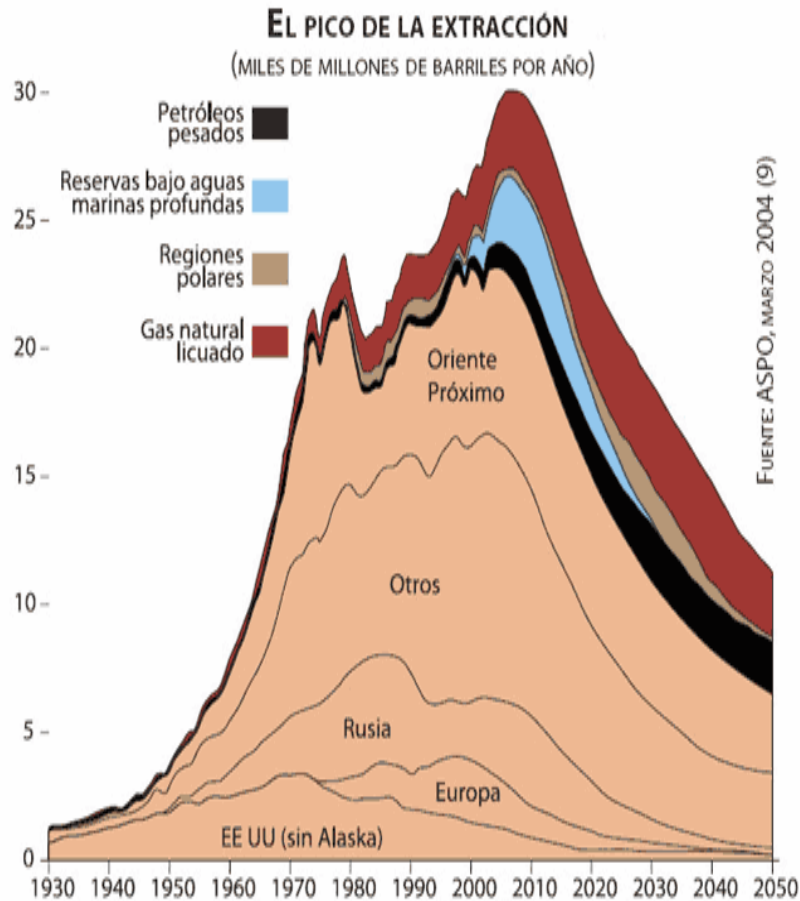
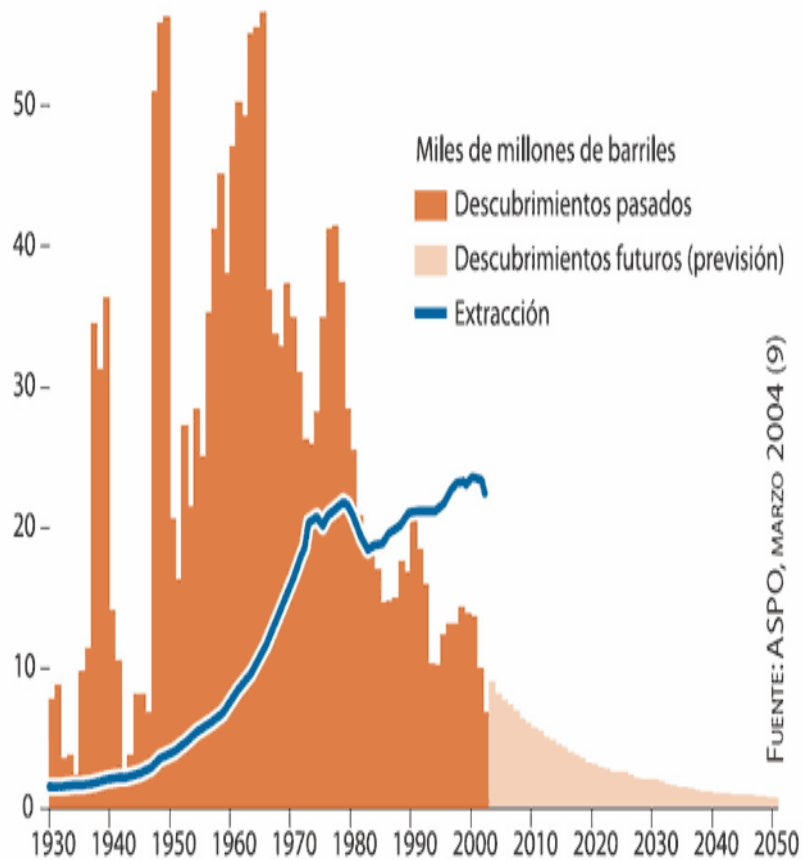
➤ Metodología

➤ Resultados y discusión

➤ Conclusiones

INTRODUCCIÓN

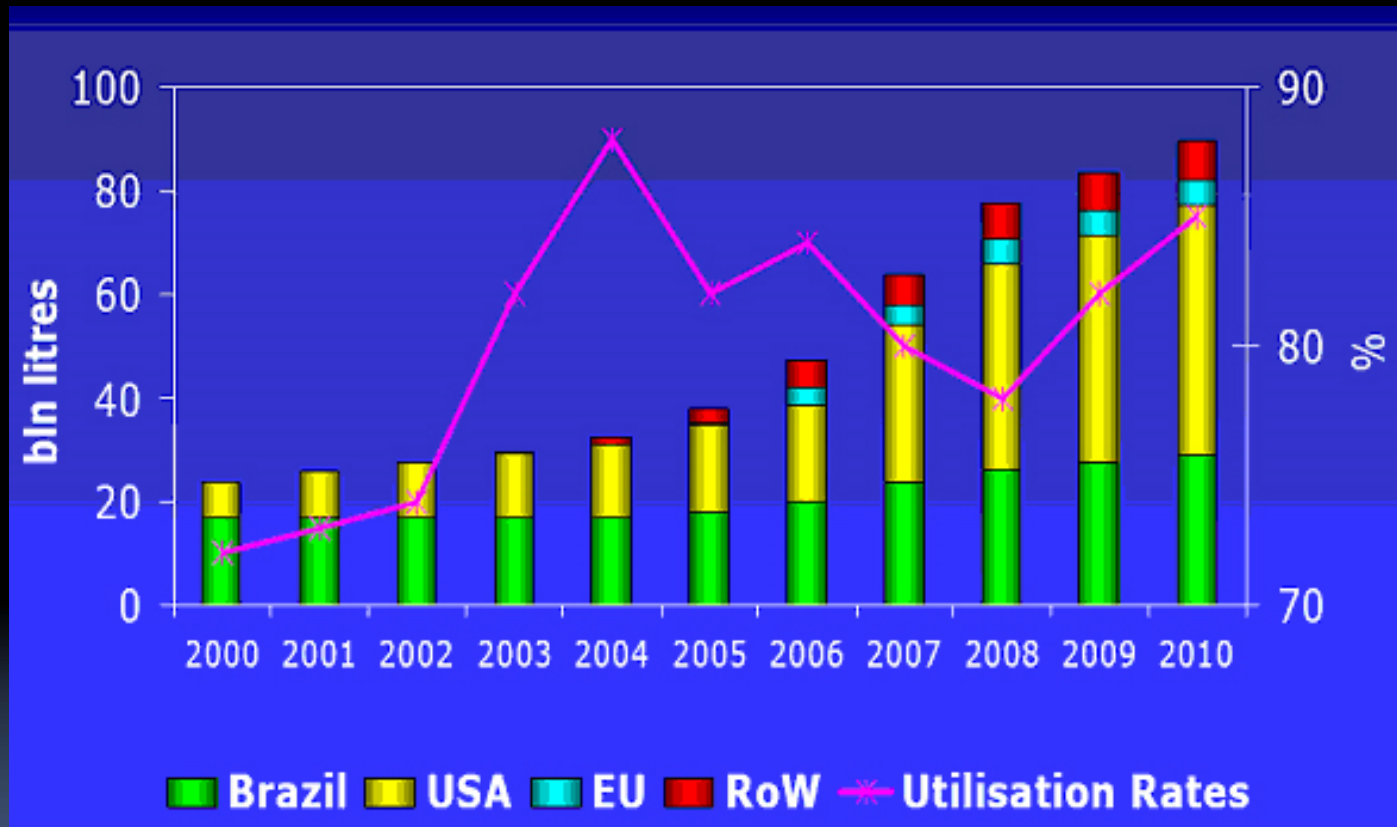
CURVA DE HUBBERT



ETANOL

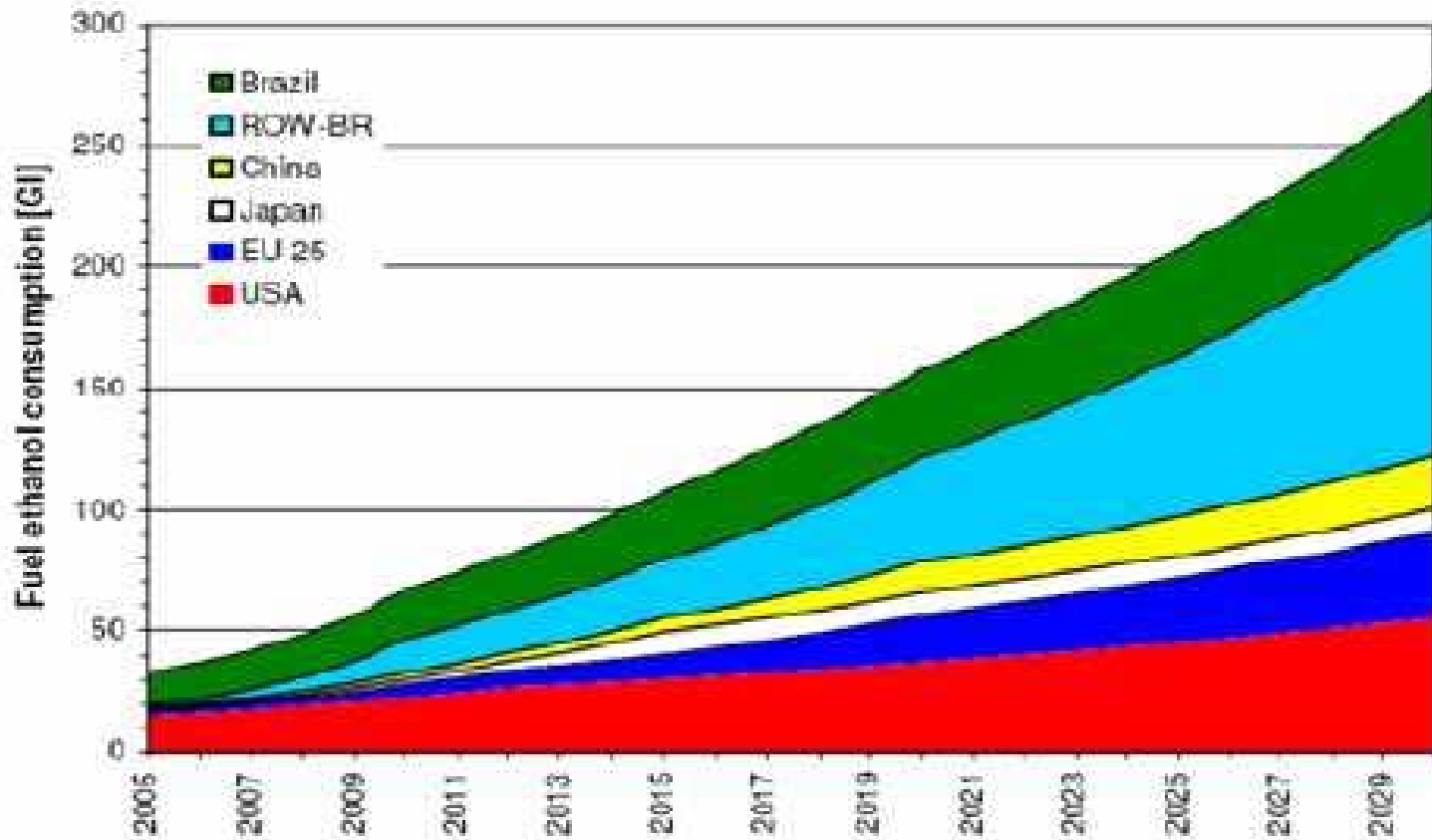
- Producción: sintética (etileno) y por conversión microbial de biomasa.
- Materias primas: madera, residuos forestales y papeleros, sólidos municipales y residuos agrícolas.
- Producción 2008: 77 billones de L (78% Brazil y USA).
- Consumo de petróleo: 31, 8 billones de barriles/ 2 309 billones de L de gasolina.
- Producción actual de etanol reemplazaría en 2,2 % del consumo mundial de petróleo (Urbanchuk, 2008).
- Biomasa disponible: 200×10^9 t/año \longrightarrow 442 billones de litro etanol/año (Sczodrak y col., 1996).

PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ETANOL



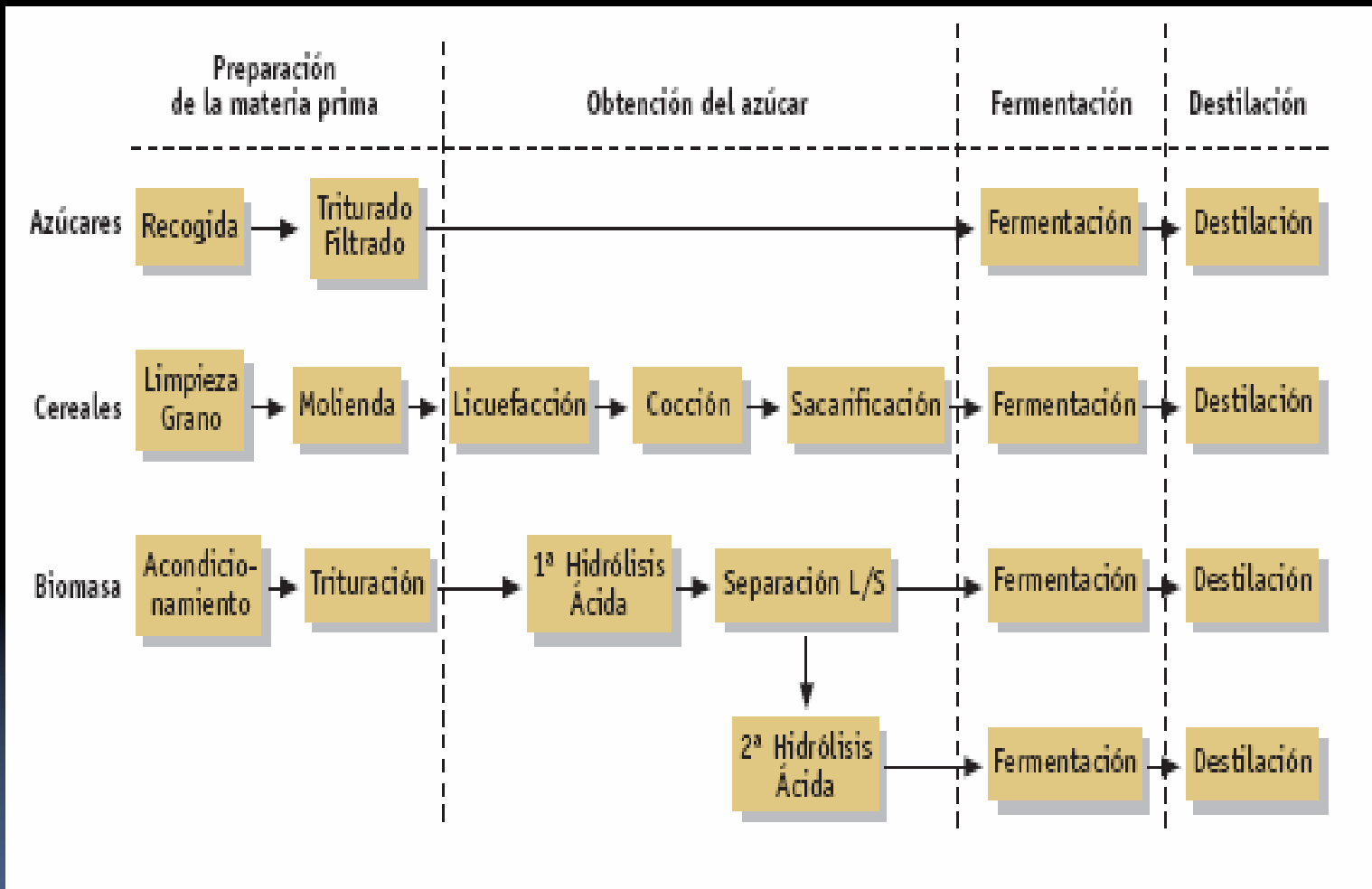
F.O. Licht, "World Ethanol 2008: Ethanol in 2008/09 - Light at the end of the tunnel?"

PROYECCIÓN DEL CONSUMO DE ETANOL



Source: FO Licht's, World Ethanol & Biofuels Report, 2006

PROCESOS DE OBTENCIÓN DE BIOETANOL



Fuente: <http://www.miliarium.com/Monografias/Biocombustibles/Bioetanol/Bioeta6.gif>

PRODUCCIÓN POTENCIAL DE BIOETANOL A PARTIR DE MATERIAS AGRÍCOLAS Y MADERA

Materia prima	Producción potencial de bioetanol (L/t)
Caña de azúcar	70
Remolacha de azúcar	110
Papa dulce	125
Yuca	180
Maíz	360
Arroz	430
Cebada	250
Trigo	340
Sorgo dulce	60
Paja de arroz	346
Paja de trigo	359
Cáscara de arroz	392
Bagazo de caña de azúcar	351
Madera	450

FRACCIONAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Método	Procesos	Tipos de cambios
Pretratamientos físicos	Molienda Desfibrado y refinamiento Extrusión Pirólisis Irradiación con microondas, rayos gama, emisión de electrones	Aumento del área superficial y porosidad. Reducción de la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa. Hidrólisis parcial de las hemicelulosas. Degradación parcial de la lignina.
Pretratamientos físico-químicos y químicos	Explosión con vapor Álcalis Ácidos Organosolv	
Pretratamientos biológicos	Hongos de pudrición blanca o parda.	Deslignificación y/o reducción del grado de polimerización de la celulosa y hemicelulosas.
Pretratamientos combinados	Molienda y explosión a vapor Pretratamiento con hongos y organosolv Explosión con vapor e hidrólisis con ácido diluido	Deslignificación Depolimerización Aumento área superficial

CONVERSIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

- Pretratamiento con ácidos: reducir cristalinidad de celulosa, incrementar la porosidad del material lignocelulósico, generar azúcares monoméricos.
- Variables del proceso: T, t, pH.
- SSF: hidrólisis enzimática con la presencia de microorganismos fermentativos.

HIDRÓLISIS CON ÁCIDO DILUIDO

- Altas tasas de reacción, $T = 160\text{-}220^{\circ}\text{C}$, $t = \text{s-min}$, baja concentración de ácido.
- 80 % de hemicelulosas se disuelve a menos de 200°C . Glucosa se disuelve a T mayores a 220°C .
- Formación de inhibidores: furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido urónico.
- En dos etapas: alta producción de hemicelulosas en primera etapa y alta producción de glucosa en segunda etapa.
- Planta de bioetanol a partir de hidrólisis ácida de pino: 3000 t/día, 75% de conversión de biomasa a azúcares y *Zymomonas mobilis*; inversión 328 millones de dólares, precio del etanol: US\$ 0,40 /L (Frederick y col., 2008).

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

➤ Alta especificidad por el substrato.

➤ T= 45-50°C, pH 4.8.

➤ Factores: tipo de substrato, actividad enzimática, cristalinidad de la celulosa, accesibilidad al área superficial, protección de la celulosa por la lignina, heterogeneidad de las partículas de biomasa.

➤ Endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas.

➤ Procesos SHF y SSF.

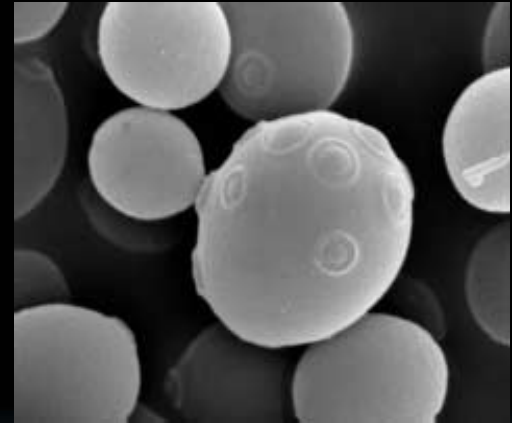
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON *S. cerevisiae*

➤ Adaptación a condiciones del medio de fermentación.

➤ Eficiencia en la conversión de azúcares.

➤ Reutilización del microorganismo.

➤ Utilización de células libres o inmovilizadas.



INMOVILIZACIÓN DE *S. cerevisiae*

➤ Inmovilización :



➤ Ventajas:

Protección de la célula

Alta concentración de microorganismos

Estabilidad térmica

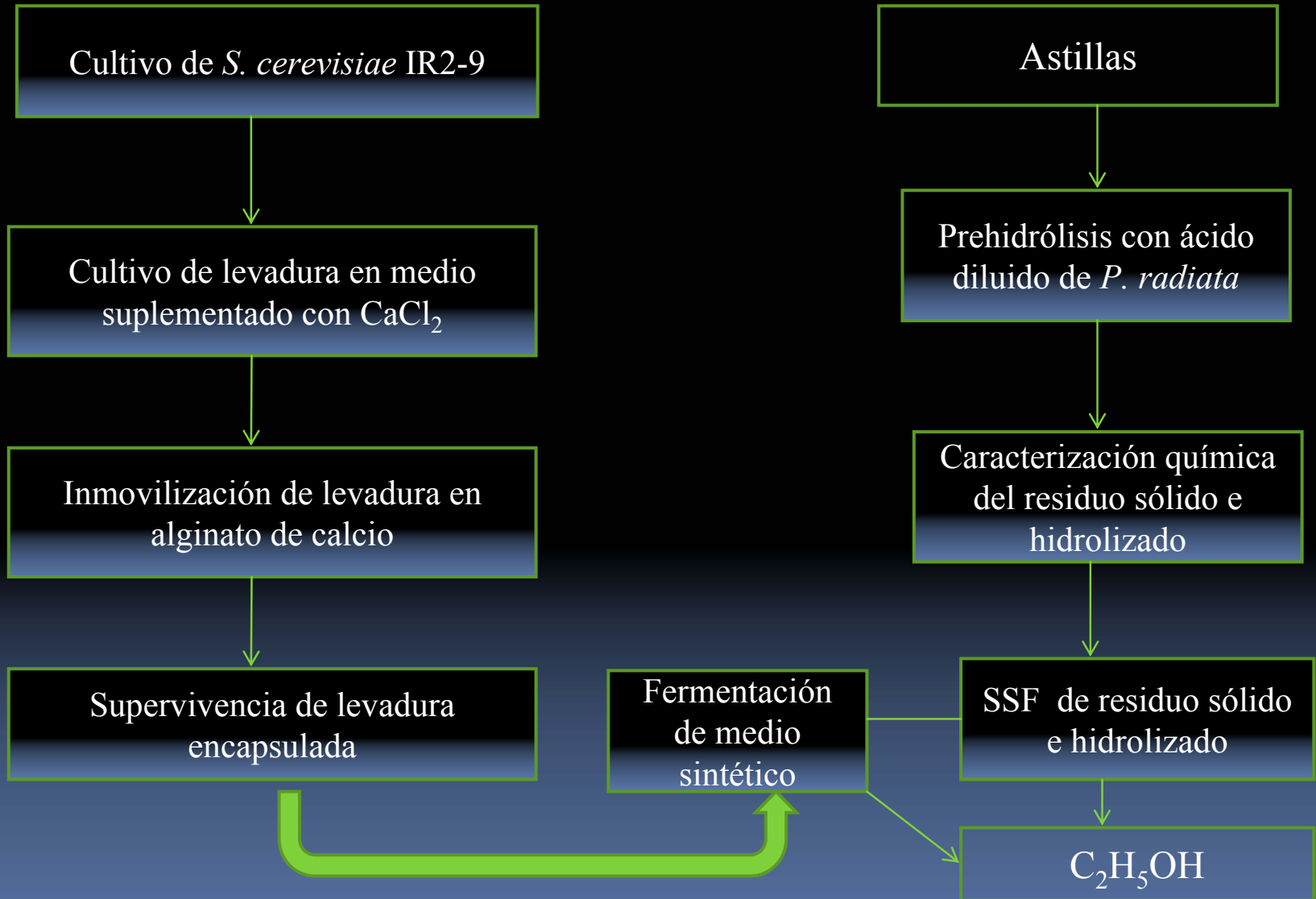
Estabilidad operacional

Menor contaminación

Mayor rendimiento

METODOLOGÍA

ENSAYOS



CULTIVO DE *S. cerevisiae* IR2-9

Medio de cultivo (g/L): glucosa (50),
extracto de levadura (5), peptona de soya
(5), KH_2PO_4 (1), MgSO_4 (0,5), NH_4Cl (1)
y agar (20)

Autoclavado: 121°C/ 20 min

Pre-cultivo: 10 mL colonizado, incubado a
40°C, 150 rpm, 24 h.

Inocular 50 mL de medio de cultivo líquido

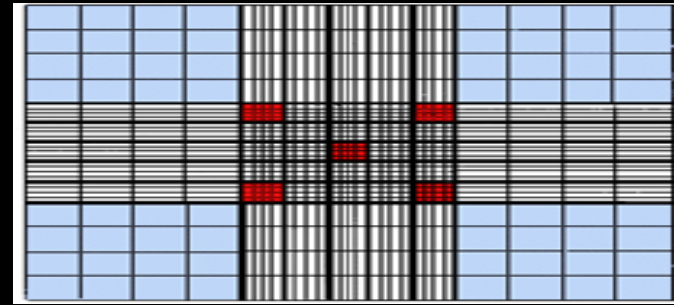
Cultivo: 24, 48, 72 y 96 h

Centrífugar 3500 rpm/15 min.
Lavado NaCl 0,9%.
Liofilizar.

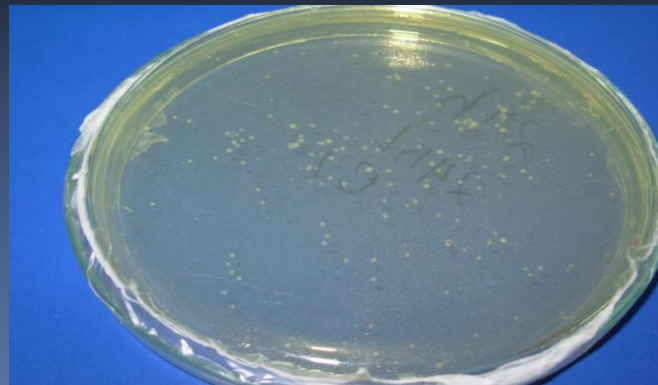
Almacenar

CONTEO DE CÉLULAS TOTALES Y VIABLES

➤ Células totales: Cámara de Neubauer (2 zonas cuadriculadas, 25 cuadros de 0,2 mm de lado y 1 mm de profundidad). Se contabiliza el número de microorganismos por unidad de volumen en un área de la cámara.



➤ Células viables: diluciones sucesivas y plaqueo en platos Petri. Incubación a 40°C y conteo de colonias a las 24 h.



INMOVILIZACIÓN DE *S. cerevisiae*

Formación de macropartículas:
(C₆H₇NaO₆)_n 1,5 g en 50 mL
de H₂O / Sol. 3, 5 y 8,0 % de
CaCl₂·2H₂O

0,6 g de levadura/ 20 mL de alginato de sodio

Gotear solución alginato-microorganismos a un
flujo de 2 mL/min, sobre 20 mL de CaCl₂·2H₂O
(3,5 y 8,0%)

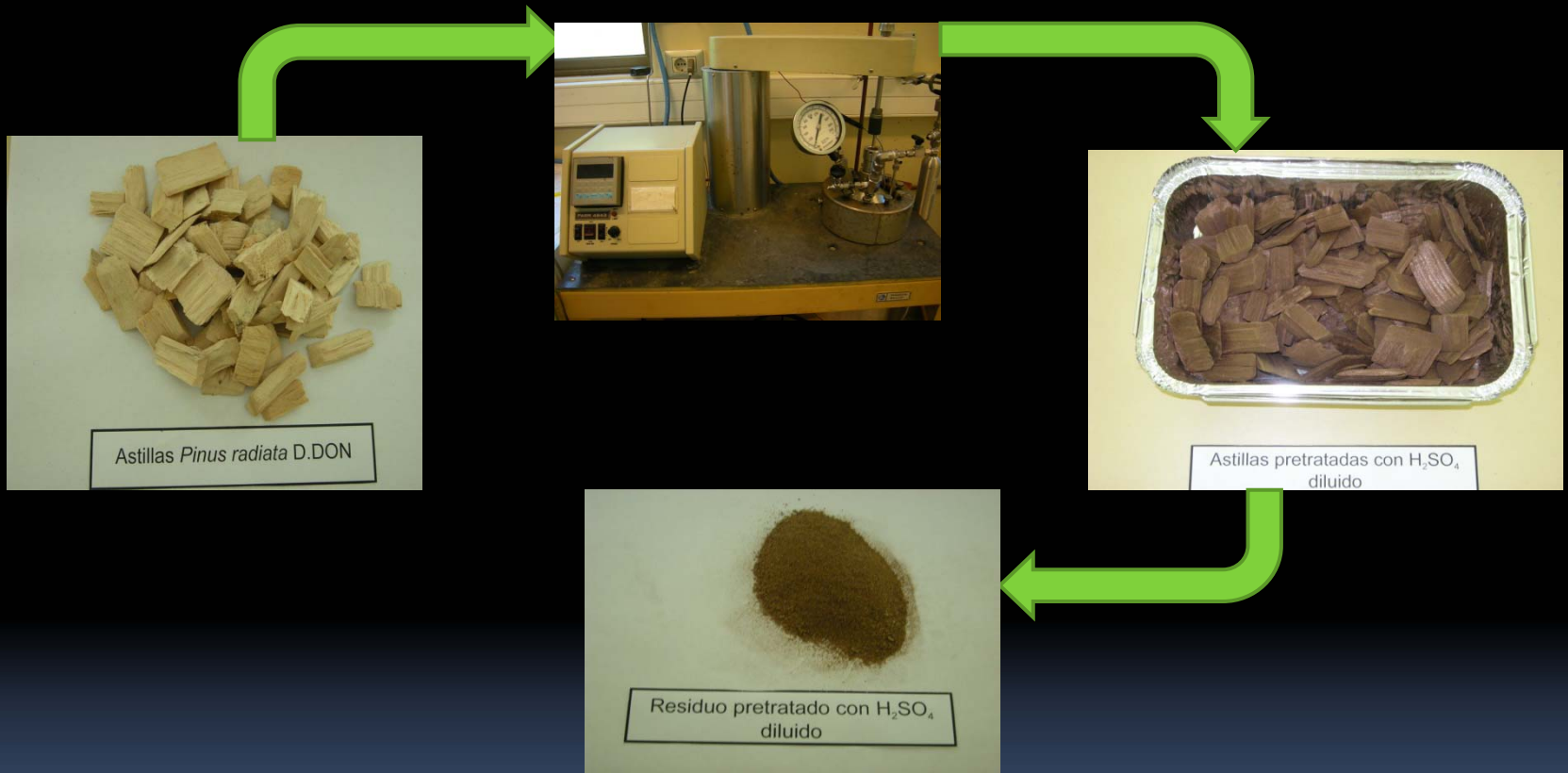
Adicionar 20 mL de CaCl₂·2H₂O. Realizar conteo
de células viables. Almacenar en refrigeración a
4°C

FERMENTACIÓN DE MEDIO SINTÉTICO

- Medio de cultivo de levaduras 50 g/L de $C_6H_{12}O_6$. Tamponado a pH 4,8.
- Adicionar 0,3 g (1×10^7 c.v.) de levadura encapsulada a alícuotas de 30 mL de medio de cultivo.
- Incubar a $40^\circ C$ con agitación de 150 rpm.
- Determinar concentración de etanol a las 6, 24, 30, 48 y 72 h, mediante cromatografía de gas.

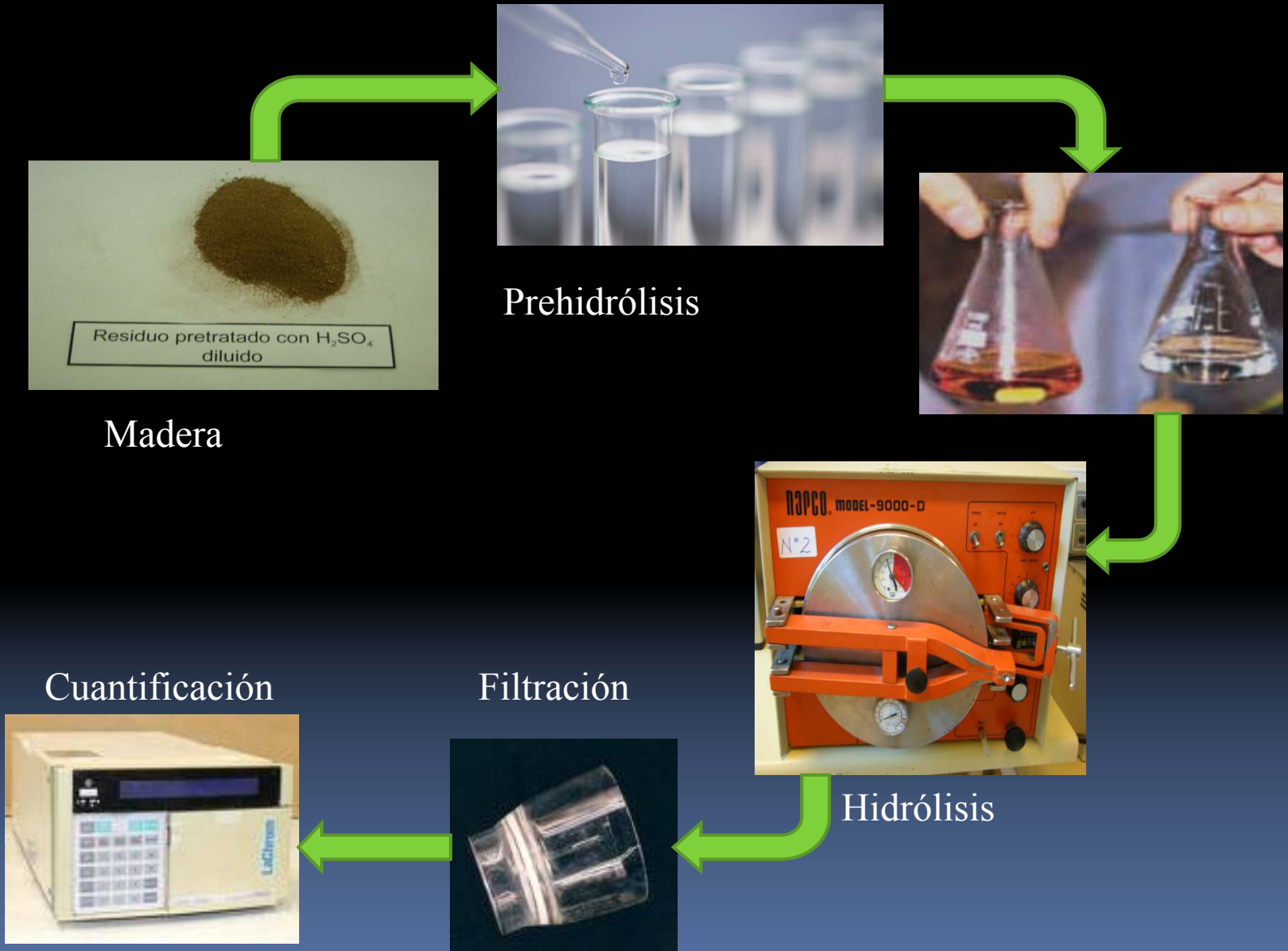


PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO DE *P. radiata*

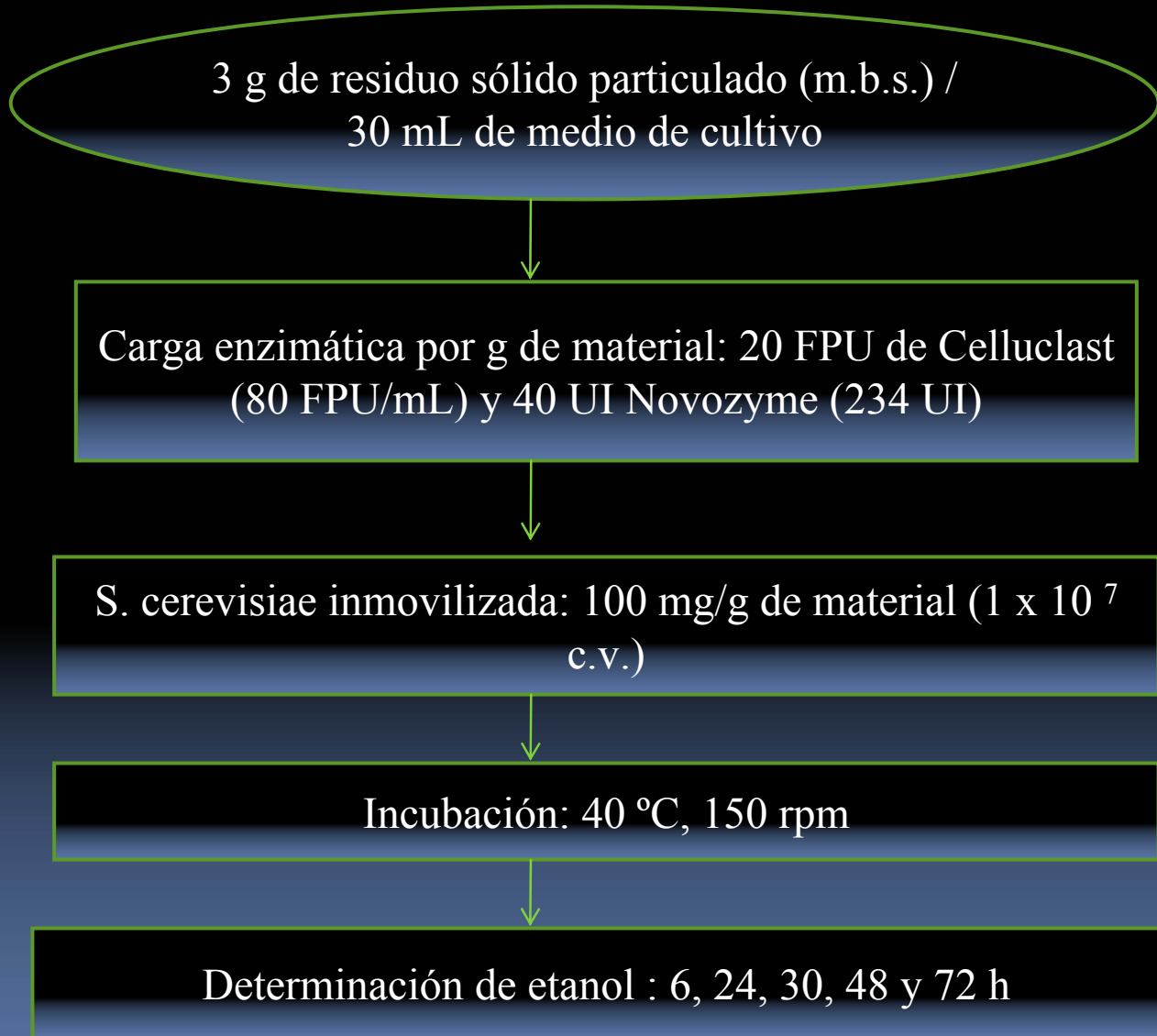


➤ Diseño central compuesto circunscrito, 17 experimentos.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE *P. radiata*



SSF DE RESIDUO SÓLIDO DE PRETRATAMIENTO



SSF DE HIDROLIZADO

- Alícuotas de 50 mL de hidrolizado.
- Ajustar pH a 4, 5 con KOH 4 M.
- Tamponar con citrato de sodio 0,05 M a pH 4,8.
- Carga enzimática: 10 FPU Celluclast y 10 UI Novozyme.
- Incubar a 40°C y 150 rpm.
- Tomar muestra a las 6, 24, 30, 48 y 72 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo e inmovilización de *S. cerevisiae*

EFFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN DE LEVADURAS EN SU VIABILIDAD

Tiempo de cultivo de *S. cerevisiae* (h)

24		48		72		96	
CT/mL	CV/mL	CT/mL	CV/mL	CT/mL	CV/mL	CT/mL	CV/mL

Células

a.l.	$5,5 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^8$	$7,8 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$3,2 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^8$	$2,8 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^8$
------	----------------------	-------------------	----------------------	-------------------	----------------------	-------------------	----------------------	-------------------

Células l.

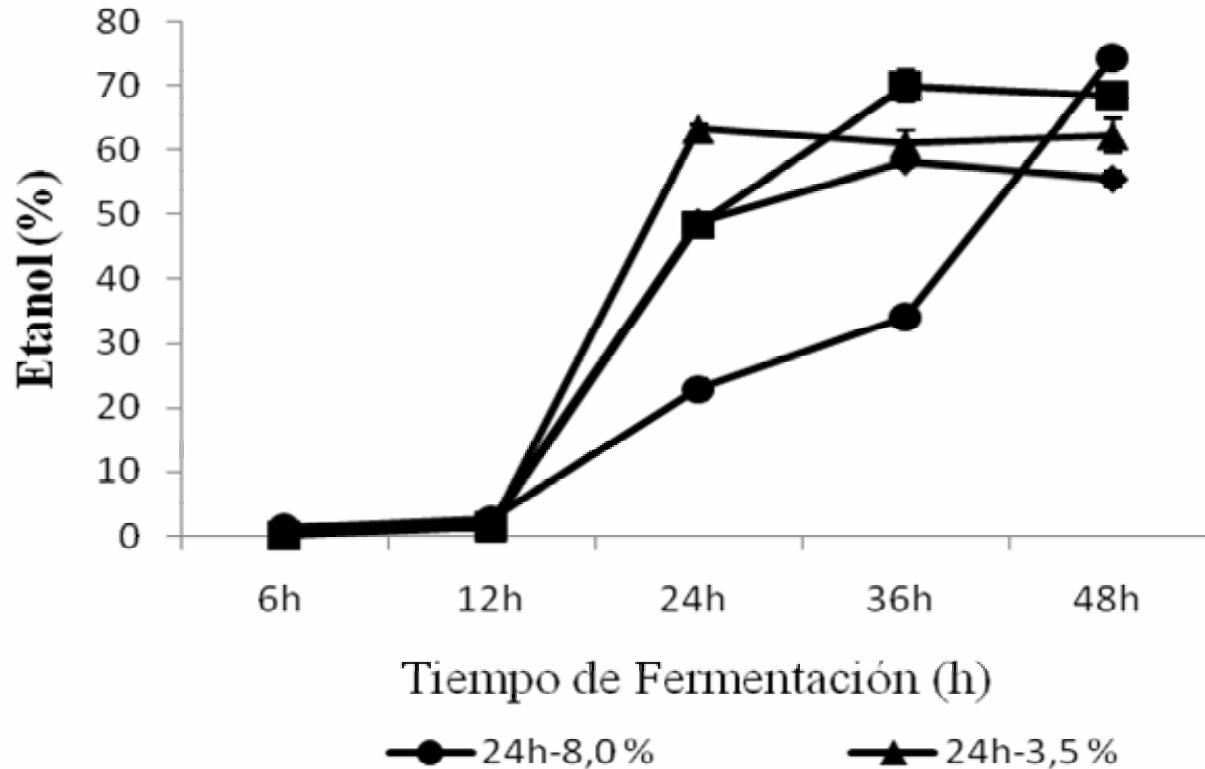
	$1,0 \times 10^{10}$	4×10^6	$1,2 \times 10^{10}$	4×10^6	$9,2 \times 10^{10}$	4×10^6	$2,7 \times 10^{10}$	4×10^6
--	----------------------	-----------------	----------------------	-----------------	----------------------	-----------------	----------------------	-----------------

a.l.: antes de liofilizar

l.: liofilizada

24 h	48 h	72 h	96 h
1,2	2,9	2,2	2,3

FERMENTACIÓN DE MEDIO SINTÉTICO UTILIZANDO LEVADURAS INMOVILIZADAS

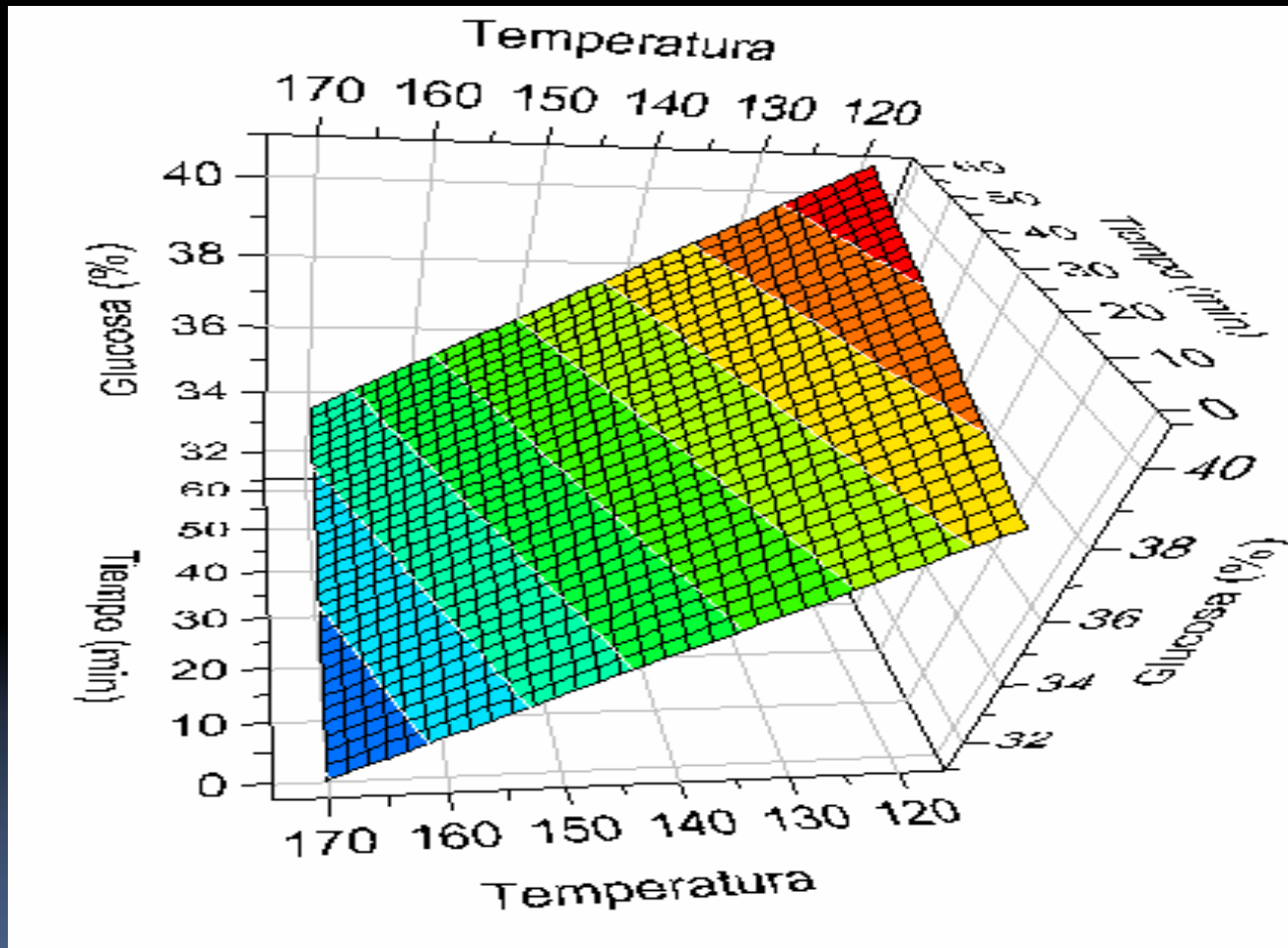


[Glucosa] = 50 g/L.

[C₂H₅OH] = 23,5 g/L

PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN RESIDUO SÓLIDO DE *P. radiata* PRETRATADO CON ÁCIDO DILUIDO



$$Y (\%): 36,05 \pm 0,34 - 2,79 \pm 0,46T + 1,37 \pm 0,45t.$$

COMPOSICIÓN FRACCIÓN SÓLIDA

Muestra	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (min)	Rendimiento (%)	Lignina	Glucosa	Hemicelulosas
1	120	1	0	86,7	28,3	37,9	12,6
2	145	1,75	30	84,4	27,6	37,9	11,7
3	145	1,75	30	81,2	26,7	35,2	8,9
4	145	1,75	30	81,5	26,7	36,9	8,9
5	120	2,5	0	92,6	24,4	37,8	1,6
6	170	1,75	30	71,6	26,1	37,4	2,4
7	145	1	30	69,1	26,8	36,6	1,3
8	170	1	60	68,9	24,4	31,4	0
9	170	2,5	60	76,5	27,2	34,6	4,8
10	170	2,5	0	63,6	21,8	29,7	7,1
11	145	1,75	60	84,9	27,8	38,5	8,8
12	145	2,5	30	86,4	26,6	36,0	12,8
13	120	2,5	60	89,2	25,7	33,6	15,7
14	120	1,75	30	89,1	27,5	38,4	13,3
15	120	1	60	86,5	26,5	38,2	9,8
16	145	1,75	0	88,3	27,4	12,4	5,9
17	170	1	0	68,1	26,3	32,1	0

COMPOSICIÓN DE FRACCIÓN LÍQUIDA

Muestra	Glucosa	Hemicelulosas	Ácido acético	Ácido fórmico
1	0.2	1.8	0.2	0.0
2	0.2	2.0	0.1	0.1
3	0.3	2.9	0.2	0.2
4	0.2	2.9	0.2	0.2
5	0.0	0.8	0.0	0.0
6	1.1	7.4	0.6	0.4
7	1.6	6.0	0.6	0.5
8	1.0	0.6	0.0	0.0
9	1.3	3.0	0.0	0.0
10	0.4	1.1	0.1	0.1
11	0.0	0.0	0.3	0.3
12	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.0	0.0	0.0	0.0
14	0.0	0.6	0.1	0.1
15	1.5	10.0	1.0	0.4
16	0.0	0.9	0.1	0.0
17	3.2	4.6	1.1	1.1

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Muestra	Lignina total (%)	Glucosa (%)	Xilosa+Manosa	Ácido Acético (%)
<i>P. radiata</i>	29,1	44,1	21,4	-
6	26,1	36,6	1,3	0,6
15	26,5	38,2	9,8	0,3

FERMENTACIÓN DE RESIDUO SÓLIDO PREHIDROLIZADO CON H₂SO₄ DILUIDO, UTILIZANDO *S. cerevisiae* ENCAPSULADA

Muestra	Tiempo de Fermentación (h)							
	6		24		48		72	
*C.I.	EtOH (g/L)	EtOH (%)	EtOH (g/L)	EtOH (%)	EtOH (g/L)	EtOH (%)	EtOH (g/L)	EtOH (%)
^a 24 h (3,5%)	1,9±0,3	9,9 ±0,9	3,2±0,4	16,9 ±0,9	3,5±0,4	16 ±1	3,1±0,3	16±1
^a 96 h (3,5%)	1,9±0,1	10,2±0,4	2,4±0,1	12,9±0,4	2,8±0,1	14,4±0,1	2,9±0,1	15,2±0,2
^b 24 h (8,0%)	0,9±0,1	4,8±0,1	5,1±0,2	26,8±0,9	12,2±0,3	65±1	12,3±0,4	64,9±0,9
^b 24 h (3,5%)	2,9±0,2	15±0,4	4,9±0,1	26±0,3	5,5±0,2	29±0,5	5,3±0,1	27±0,3
^b 24 h Libre	0	0	0	0	4±0,3	21±0,5	4,2±0,2	22±0,6

PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADO DE *P. radiata*

Muestra	Glucosa (%)	Hemicelulosas (%)	Ácido Acético (%)	Ácido Fórmico (%)
6	1,1	8,3	0,6	0,4
15	1,5	11,5	1,1	0,4

Muestra	Tiempo de Fermentación (h)					
	6	24	30	48	54	72
6 (% m/v)	0,14±0,01	2,12±0,1	2,01±0,10	2,2±0,1	2,2±0,1	2,2±0,1
15 (% m/v)	0,18±0,01	2,20±0,02	2,2±0,1	2,24±0,03	2,2±0,1	2,2±0,1

CONCLUSIONES

MUCHAS GRACIAS