

THE NATIONAL UNIVERSITY OF COLOMBIA DISSERTATIONS FROM THE GRADUATE PROGRAMME IN  
CHEMICAL ENGINEERING



**THE NATIONAL UNIVERSITY OF**  
**COLOMBIA**

FACULTY OF ENGINEERING

Experimental Evaluation of Simultaneous Saccharification,  
Fermentation and Ethanol Extraction (*SSF*)  
of Lignocellulosic Material

BY

ROBERTO AGUDELO

76 pp. *System Number* 44454  
2009

In this study two local lignocellulosic by-products referred to as *coffee cut-stems* and *Pinus sawdust* (from variety *Pátula*) were structural and chemically analyzed with the aim of identifying their cellulosic contents as potential feedstock for ethanol production. Additionally, an effective alkali pretreatment for the enriched cellulose material was established to be used for lignin removal before carrying out the ethanol production by simultaneous saccharification, fermentation and extraction process (*SSF*). The structural analysis was carried out using an X-ray diffractometer (Rigaku MiniFlex II), and the patterns were obtained in  $2\theta$  range between  $3.0$  and  $70^\circ$ . The pretreatment procedure was evaluated employing 2% sodium hydroxide as delignification agent at two severity levels,  $130^\circ\text{C}$  and 2 h of contact time (severity I), and  $25^\circ\text{C}$  during 24 h (severity II). In each case lignin removal was also verified by structural analysis and residual composition by analytical methods. Among the studied material *coffee cut-stems* had the highest cellulose content, which was further used as raw material for ethanol production. Alternatively, one of the most promising pretreatment process known as two-step dilute acid process was simulated using *Aspen Plus* software. The simulation procedure was carried out using experimental information gathered for *coffee cut-stems* and the change in the amount of xylan and glucan in the material with time were obtained by biphasic equations. A reliable model for hemicellulose hydrolysis reaction was included considering two fractions, one fast-hydrolyzing and one slow. Likewise, degrees of cellulose and hemicellulose depolymerization to its monomeric constituents were analyzed. In addition, the kinetic models took into consideration the undesirable formation of Furfural and HMF co-products from degradation of monosaccharides as pretreatment proceeds.

The experimental *SSF* configuration was carried out at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h in a five-stage reactor of 5 L of total volume which was specifically designed taking into account consideration of the *SSF* process. Reaction feed consisted by coffee-cut stems previously delignified, enzyme dosage of 25 IFPU/g, inoculum of commercial yeast and *n*-dodecanol as extracting solvent. Ethanol concentration in the aqueous and extracting phases, and reducing sugars in the aqueous phase were set up the main *SSF* process variables. The structural analysis of the materials showed strong cellulose content in association with lignin. Chemical distribution of the main components in the *coffee cut-stems* showed 32.32% cellulose, 13.8% hemicellulose, 1.69% extractives compounds, 46.7% total lignin (quantified as acid-soluble and acid-insoluble lignin), 4.61% total protein and minor ash content. On the other hand, *Pinus sawdust* contained 24.80% cellulose, 10.62% hemicellulose, 0.87% extractives, 62.62% total lignin, 0.47% total protein, and 0.62% ash. For its part, *spent coffee grounds* were composed by 35.16% total lignin, 33.62% cellulose, and 30.38% fats quantified as extractives. For *coffee cut-stems*, up to 95% of the lignin content was removed by pretreatment at severity (I), and 89% of the lignin content was removed at severity (II). The results of the pretreatment simulation showed that the higher xylose production was obtained at  $160^\circ\text{C}$ , even though the slow-hydrolyzing xylan fraction remained almost unchangeable. On the other hand, the higher glucose production was obtained at  $170^\circ\text{C}$ , but the co-product profiles (HMF and Furfural) showed the lowest concentrations at  $160^\circ\text{C}$ .

*Coffee cut-stems* as a large local lignocellulosic waste were a promising feedstock enriched in cellulose to ethanol production by the integrated *SSF* configuration. The *SSF* experimentation proved to increase significantly ethanol productivity up to 50% over conventional *SSF* (nonextractive) process by reducing the inhibitory effects of the fermentation reaction due to the continuous extraction of the product ethanol into the nonmiscible phase (*n*-dodecanol). Furthermore, the chosen solvent *n*-dodecanol showed excellent biocompatibility with the other bio-agents working in the *SSF* configuration, and served as effective ethanol-extracting for this system, leading to conclude that the potential use of the integrated *SSF* configuration employing *n*-dodecanol most probably would reduce the energetic requirements to separate ethanol from the solvent over conventional aqueous phases. ■

---

**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL PROCESO SFES DE ETANOL A PARTIR  
DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO**

---

**ROBERTO ARTURO AGUDELO AGUIRRE**

**TESIS DE MAESTRIA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE MANIZALES**

Maestría en Ingeniería -Ingeniería Química-

Manizales, Colombia

Julio de 2009

**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL PROCESO SFES DE ETANOL A PARTIR  
DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO**

Autor

**Roberto Arturo Agudelo Aguirre**

**Director**

PhD. Carlos Ariel Cardona A.

**Universidad Nacional de Colombia**

**Sede Manizales**

Facultad de Ingeniería y Arquitectura

Departamento de ingeniería Química

Manizales, Colombia

Julio de 2009

*A mi mamá y mi familia, mis grandes tesoros.*

## ***Agradecimientos***

*El autor expresa sus agradecimientos al personal del Laboratorio de Materiales Nanoestructurados y Funcionales de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales por el apoyo metodológico recibido para la realización de este estudio.*

*A los estudiantes de doctorado en Ingeniería, Julián Andrés Quintero Duque y John Alexander Posada, por sus valiosos aportes y dedicación incondicional durante todo el tiempo de experimentación y análisis de resultados.*

*Al Centro Nacional de Investigaciones de Café -Cenicafé- por el suministro de materiales específicos de comparación empleados en los análisis estructurales.*

*A la estudiante de Maestría en ingeniería -Ingeniería Química- Diana Catalina Cubides por su apoyo oportuno en actividades metodológicas durante el transcurso de la experimentación.*

*A su vez, hace un reconocimiento especial al Prof. Carlos Ariel Cardona Alzate, director de tesis, por su enorme voluntad, dedicación e invaluable aportes que hicieron posible alcanzar los objetivos propuestos en este estudio.*

## Contenido

Índice general	I
Índice de figures	III
Índice de cuadros	V
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1 MARCO TEÓRICO	7
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3 MATERIALES Y METODOS	18
3.1 MATERIALES	18
3.1.1 Materia Prima	18
3.1.2 Materiales	18
3.1.2.1 Enzimas celulolíticas	18
3.1.2.2 Microorganismo fermentativo	18
3.1.2.3 Patrones de difracción de referencia	18
3.2 METODOLOGÍA	19
3.2.1 Análisis Estructural de los Materiales	19
3.2.1.1 Preparación de la muestra	19
3.2.1.2 Determinación de área superficial	19
3.2.1.3 Análisis estructural	20
3.2.1.4 Análisis de patrones de referencia	20
3.2.2 Caracterización Composicional de los Materiales	20
3.2.2.1 Caracterización Ligno-celulósica de la Materia Prima	20
3.2.2.2 Análisis de la información	21
3.2.3 Acondicionamiento de la Materia Prima	21
3.2.4 Pretratamiento del Material Zoca de Café	22
3.3 EXPERIMENTACION EN PLANTA PILOTO	22
3.3.1 Seguimiento de las Variables de Proceso	22
3.3.2 Análisis de la Información Obtenida	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Análisis Estructurales de los Materiales	24
4.1.1 Material Zoca de Café	24
4.1.1.1 Análisis XRD de zoca de café	24

4.1.1.2	Análisis BET de zoca de café	25
4.1.2	Material Pinus Pátula	26
4.1.2.1	Análisis XRD de Pinus Pátula	26
4.1.2.2	Análisis BET de Pinus Pátula	27
4.1.3	Patrones de Celulosa Cristalina y Lignina Álcali de Referencia	28
4.1.3.1	Análisis de Difracción de Rayos X de Celulosa Cristalina	28
4.1.3.2	Análisis de Difracción de Rayos X de Lignina Álcali	29
4.1.3.3	Análisis Estructural de un Material Residual de Café	30
4.1.3.4	Análisis de Difracción de Rayos X de Borra de Café	31
4.1.3.5	Área Superficial BET y Distribución de tamaño de Poro de la Borra de Café	31
4.2	Caracterización Química de los Materiales	32
4.2.1	Composición de la Zoca de Café	32
4.2.2	Composición de Pinus Pátula	33
5	PRETRATAMIENTO DE LOS MATERIALES	35
5.1	Evaluación experimental con zoca de café	35
5.2	Evaluación experimental con borra de café	36
5.2.1	Pretratamiento de la borra de café	36
5.2.2	Hidrólisis de la borra de café	37
5.3	Simulación del proceso con ácido diluido del material zoca de café	38
5.3.1	Etapas de pretratamiento	38
5.3.2	Etapas de hidrólisis de celulosa	44
6	INTEGRACION DE LOS PROCESOS DE SACARIFICACION-FERMENTACION Y EXTRACCION	49
6.1	Fundamentos de la experimentación	49
6.2	Configuración experimental	50
6.2.1	Seguimiento de las variables del proceso integrado	54
6.2.1.1	Comportamiento de azúcares reductores	55
6.2.1.2	Comportamiento de la producción de etanol	56
7	CONCLUSIONES	58
8	RECOMENDACIONES	60
	BIBLIOGRAFIA	61

## Índice de figuras

---

Fig. 1. Diagrama esquemático del proceso de fermentación-extractiva en continuo	15
Fig. 2. Morfología típica de un material lignocelulósico	16
Fig. 3. Patrón de difracción de rayos X del material zoca de café	24
Fig. 4. Isotermas de adsorción-desorción de Nitrógeno para el material zoca de café	25
Fig. 5. Patrón de difracción de rayos X del material Pinus Pátula	26
Fig. 6. Isotermas de adsorción-desorción de Nitrógeno para el material Pinus Pátula	28
Fig. 7. Patrón de difracción de rayos X de celulosa (tipo 20) como estándar	29
Fig. 8. Patrón de difracción de rayos X de lignina (álcali) como estándar	30
Fig. 9. Difractogramas de rayos X de la borra de café	31
Fig. 10. Isotermas de adsorción-desorción de Nitrógeno para la borra de café	32
Fig. 11. Patrón de difracción de rayos X de la zoca de café pretratada con NaOH al 2%	36
Fig. 12. Producción de azúcares reductores de la hidrólisis de borra de café	38
Fig. 13. Esquema del proceso de pretratamiento con ácido diluido ( $H_2SO_4$ )	39
Fig. 14. Esquema del proceso de hidrólisis de celulosa con ácido diluido	45
Fig. 15. Esquema del proceso de pretratamiento con ácido diluido: pre-hidrólisis	48
Fig. 16. Diagrama esquemático del proceso de fermentación extractiva	49
Fig. 17. Esquema del equipo multi-etapas empleado en el proceso integrado	52
Fig. 18. Equilibrio líquido-líquido del sistema etanol, n-dodecanol, agua y glucosa	54
Fig. 19. Perfil de concentración de azúcares reductores	55
Fig. 20. Perfil de concentración de etanol en la fase extractiva (n-dodecanol)	56

## Índice de cuadros

---

Tabla 1. Métodos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica	11
Tabla 2. Composición química de la zoca de café	33
Tabla 3. Composición química de Pinus Pátula	34
Tabla 4. Composición de la borra de café después de pretratamiento alcalino	37
Tabla 5. Condiciones iniciales establecidas para el pretratamiento de hidrólisis	40
Tabla 6. Composiciones iniciales establecidas para pretratamiento de hidrólisis	40
Tabla 7. Composición del contenido de hemicelulosa en el material	41
Tabla 8. Valores de las constantes cinéticas utilizadas	42
Tabla 9. Composición másica de las corrientes en la etapa de pretratamiento	43
Tabla 10. Condiciones iniciales establecidas para la hidrólisis de celulosa	44
Tabla 11. Valores de los parámetros cinéticos utilizados	46
Tabla 12. Composición másica de las corrientes en la etapa de hidrolítica	47

Esta tesis de maestría consistió en el estudio estructural y composicional de los materiales lignocelulósicos **zoca de café** y **aserrín de *Pinus Pátula***, generados como residuos en actividades agroindustriales en el departamento de Caldas, con el objeto de identificar la conformación estructural de los principales constituyentes y su composición lignocelulósica y establecer, a partir de esta información, un procedimiento de pretratamiento efectivo para la utilización del material con mayor contenido de celulosa como materia prima para su aprovechamiento en la transformación a alcohol carburante mediante el proceso de sacarificación, fermentación y extracción simultánea (SFES) en una única unidad reaccionante. Sin embargo, durante el desarrollo de la tesis y como resultado de los análisis de la composición de los materiales nombrados se decidió incluir en el estudio la **borra de café** para tener en cuenta el efecto de una mayor diferencia en las relaciones de celulosa a hemicelulosa y a lignina de los materiales lignocelulósicos, ya que la zoca y el aserrín presentaron resultados en composición muy semejantes. El análisis estructural de los materiales, se llevaron a cabo en un difractómetro de rayos X (Rigaku MiniFlex II), usando radiación de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) a 30kV y 15 mA. Los perfiles de rayos X fueron obtenidos para un rango del ángulo  $2\theta$  entre  $3.0$  y  $70^\circ$  con un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y una velocidad de escaneo de  $5^\circ/\text{min}$ . El pretratamiento consistió en la evaluación del grado de deslignificación del material con hidróxido al 2% en dos niveles diferentes de severidad, a  $130^\circ\text{C}$  durante 2 horas (severidad 1) y  $25^\circ\text{C}$  durante 24 h (severidad 2). La remoción de lignina del material fue validada a través de análisis estructural y caracterización química del residuo obtenido después del pretratamiento. El material con menor contenido residual de lignina fue la **zoca de café**, la cual fue empleada posteriormente como material celulósico para la conversión a etanol en el proceso SFES. Adicionalmente, la conversión de **zoca de café** a glucosa mediante una etapa de pretratamiento con ácido sulfúrico diluido y otra de hidrólisis ácida diluida fue evaluada mediante simulación empleando el software comercial ASPEN PLUS versión 11.1 (Aspen Technology, Inc., USA). Para esta simulación se utilizó el modelo Non-Random Two-Liquids para el cálculo de propiedades de corriente en la fase líquida y el modelo ideal para la fase vapor. Los componentes que no se encontraban en la base de datos del software fueron ingresados con sus respectivas propiedades fisicoquímicas. Las reacciones ocurridas en el pretratamiento y en la hidrólisis fueron incluidas con modelos cinéticos obtenidos de la literatura y que presentan la forma de la expresión de Arrhenius.

Además de las reacciones de hidrólisis se consideró la formación de los productos de degradación de las hexosas y pentosas (hidroximetil furfural y furfural, respectivamente). La configuración experimental SFES se evaluó a 37°C durante 48 h en un reactor extractor de tres etapas con un volumen de operación de 5 L, empleando como sustrato celulósico 212 g de **zoca de café** previamente deslignificada, enzima Celluclast 1.5L en dosificación de 25 IFPU/g de celulosa, 10% (w/w) de inóculo de *S. cerevisiae* en extracto de malta, 1000 ml de solvente de extracción *n*-dodecanol y búfer de citrato de sodio pH 4.5 como fase acuosa. Las variables de seguimiento correspondieron a la concentración de azúcares reductores, la cual se cuantificó mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS, de sus siglas en inglés), la concentración de etanol en la fase solvente cuantificada a partir de una curva de referencia que relacionó el índice de refracción (IR) a 37°C y la concentración de etanol en el solvente.

Los resultados del estudio estructural de los materiales mostraron una marcada asociación estructural entre la lignina y la celulosa. Por su parte, la caracterización química mostró una composición, expresada como porcentajes peso/peso de material en base seca, para la zoca de café de 32.32% de celulosa, 13.80% de hemicelulosa, 1.69% de componentes extractivos, 46.7% de lignina total, 4.61% de proteína y 0.92% de cenizas. El material Pinus Pátula presentó 24.80% de celulosa, 10.62% de hemicelulosa, 0.87% de extractivos, 62.62% de lignina, 0.47% de proteína y 0.62% de cenizas. En cuanto a la borra de café la composición fue de % de celulosa, % de hemicelulosa, % de componentes extractivos, % de lignina total, % de proteína y % de cenizas. Los resultados mostraron que la zoca de café presentó el mayor contenido de celulosa entre los materiales estudiados. La deslignificación de la zoca con el grado de severidad 1 removió el 95% de la lignina original, mientras que el grado 2 de severidad removió el 89% de la lignina del material. Los resultados de la simulación permitieron concluir que un sistema de reacción y separación simultáneo como lo es el SFES puede eliminar la interferencia de los productos de degradación formados durante el pretratamiento y la hidrólisis ácida, ya que la glucosa producida en la sacarificación enzimática es convertida directamente a etanol y se evita la formación de productos de degradación no deseados que son tóxicos, adicionalmente retirar el etanol producido en una fase orgánica biocompatible puede reducir los efectos inhibitorios del etanol sobre el microorganismo fermentativo. La evaluación experimental del proceso SFES de zoca de café previamente deslignificada mostró un comportamiento de estabilidad operacional en las condiciones previamente establecidas.

In this study two regional lignocellulosic by-products referred to as coffee cut-stems and Pinus sawdust (variety *Pátula*) were both structural and chemically analyzed with the aim of identifying their cellulosic contents as potential feedstock for ethanol production. Additionally, an effective pretreatment procedure for the material with higher cellulose content was established to be used to further ethanol production by a simultaneous saccharification, fermentation and extractive process (SSF) in a single vessel. However, an additional coffee by-product was included as reference material with known lignocellulosic composition information to validate the experimental information gathered. The structural analysis were carried out using a X-ray diffract meter (Rigaku Miniflex II), and the patterns were obtained in  $2\theta$  between 3.0 and 70°. The pretreatment procedure employed 2% sodium hydroxide as delignification agent, and it was employed at two severity levels defined as follow: 130°C for 2 h (severity I), and 25°C for 24 h (severity II). Lignin remotion of the selected material was validated by structural analysis and chemical characterization. The lower-cellulose content material was found to be the coffee-cut stems, which was further used as raw material for ethanol production by SSF. Alternatively, the two-step dilute-acid pretreatment was simulated for this material using Aspen Plus software to determine hemicellulose and cellulose depolymerization to xylose and glucose production, respectively. Furthermore, co-products formation from xylose and glucose degradation (furfural and HMF) was considered.

The experimental SSF configuration was carried out at 37°C for 48 h in a five-stage reactor of 5 L of total volume. Reactor feed was formed by previously delignified coffee-cut stems (212 g), 25 IFPU/g as enzyme dosage, 10% (w/w) of yeast inoculum and 1000 ml of *n*-dodecanol as extraction solvent.

The structural analysis of the materials showed a strong structural lignin-cellulose association. on the other hand, the chemical composition (expressed in percentage weigh/weigh) found for coffee-cut stems was 32.32% of cellulose, 13.80% of hemicellulose, 1.69% of extractives, 46.7% of total lignin, 4.61% of total protein and 0.92% of ash. Pinus *Patula* presented a composition as follow: cellulose of 24.80%, 10.62% of hemicellulose, 0.87% of extractives, 62.62% of total lignin, 0.47%

of total protein, and 0.62% of ash. For its part, the spent coffee ground was composed by 35.16% of total lignin, 33.62% of cellulose, and 30.38% of fats quantified as extractives. The results also showed that coffee-cut stems were the material with the highest cellulose content. The pretreatment study at two severity levels evidenced that severity I delignified nearly 95% of the original lignin content in the coffee-cut stems treated, and the severity II delignified 89% of the lignin content in the same material. The simulation results let to conclude the degradation co-products formation interference could be eliminated when a SSFE configuration is operated due to the glucose released during hydrolysis is fastly converted to ethanol, avoiding mostly the inhibitory effects commonly observed in step-by-step to ethanol production procedures. Furthermore, the solvent employed *n*-dodecanol showed a good biocompatibilty with the other bioagents working in the SSFE configuration and served as effective ethanol removing for this system, leading to conclude that the potential use of this extracting solvent most probably would reduce the energetic requirements to separate ethanol from the solvent.

## Introducción

---

La producción económica de etanol se ha enfocado en las dos últimas décadas a los procesos bioquímicos que presentan ventajas atractivas con respecto a los procesos convencionales que contribuyen negativamente al deterioro ambiental y al empleo de materiales lignocelulósicos y en especial residuos agrícolas que representan fuentes renovables de transformación a etanol. Este último aspecto ha demostrado influir positivamente en la crisis alimentaria actual disminuyendo la presión en la demanda en los cultivos como el maíz y la caña de azúcar que tradicionalmente se han empleado en la producción de etanol.

El proceso de bioconversión de materiales lignocelulósicos mediante sacarificación y fermentación simultánea, comúnmente denominado SSF, ha sido ampliamente estudiado en los efectos de las condiciones de operación, parámetros del microorganismo fermentativo, características de la enzima sobre la producción de etanol y en los mecanismos hidrolíticos y catabólicos involucrados (Duff y Murray, 1996; Lynd, 1996; Philippidis *et al.*, 1997). En las reacciones hidrolíticas, los componentes endo- y exo-glucanasas de la enzima celulolítica hidrolizan la celulosa a celobiosa y glucosa mediante catálisis heterogénea. La celobiosa, a su vez es transformada a glucosa monomérica por el componente  $\beta$ -glucosidasa mediante un mecanismo de catálisis homogénea y por último, el microorganismo fermentativo cataboliza a etanol la glucosa generada en la hidrólisis. En esta etapa fermentativa se han realizado avances significativos con el objeto de incrementar la conversión de los hidrolizados de glucosa y altas fracciones de pentosas y hexosas a etanol mediante el uso de bacterias anaeróbicas etanológicas, tales como *Zimomonas mobilis* que ofrecen significativamente mayores velocidades de conversión de azúcares y altas tolerancias a inhibición por producto (etanol) a bajos valores de pH (Ballesteros *et al.*, 1991; Ballesteros *et al.*, 1993; Morais *et al.*, 1996).

Adicionalmente, el proceso SSF ha probado experimentalmente tener ventajas competitivas con respecto a otros procesos de producción de bioetanol, principalmente en aspectos de favorabilidad técnica al llevarse a cabo las etapas hidrolítica y fermentativa en una sola

unidad, menores requerimientos de enzimas celulolíticas por unidad de masa celulósica como consecuencia de la continua conversión de glucosa a etanol y la disminución considerable de los efectos inhibitorios por producto del agente hidrolítico. Sin embargo, la factibilidad operacional y económica se fundamenta en el desarrollo de un modelo de operación en continuo que integre eficazmente el proceso SSF con la posterior etapa extractiva de etanol.

En este contexto, el grupo de investigación en Procesos Químicos Catalíticos y Biotecnológicos de la Universidad Nacional de Colombia –Sede Manizales, ha realizado estudios concluyentes en modelamiento y simulación del proceso de fermentación extractiva simultánea (FES) que validan los conceptos teóricos sobre la favorabilidad de las condiciones inhibitorias de los componentes claves del sistema y un control global más ajustado de sus variables cuando se integran una etapa de extracción de producto simultánea al proceso SSF (Cardona y Sánchez, 2004; Cardona *et al.* 2005; Gutiérrez *et al.* 2005; Cardona y Sánchez, 2006).

## 1 MARCO TEÓRICO

---

Los biocombustibles han demostrado ser una eficiente y sustentable fuente de energéticos en el progresivo y acelerado agotamiento de las reservas mundiales de petróleo. Es así como actualmente no sólo se explora la posibilidad de obtener biocombustibles a partir de agro-materiales tan diversos como subproductos de desecho, sino también la producción más eficiente en los procesos hasta hoy establecidos para su producción. En este sentido, el etanol carburante ha logrado posicionarse como uno de los principales biocombustibles por sus ventajas en términos ambientales y renovables.

La producción biotecnológica de etanol ha requerido exhaustivos esfuerzo por parte de investigadores e industriales, que buscan sobrepasar las limitantes tecnológicas involucradas en la transformación de materias primas complejas como son las de naturaleza lignocelulósica. A pesar de estos esfuerzos, aún hoy en día existen limitantes técnico-económicas para la implementación masiva a nivel industrial de estas materia primas.

La biomasa lignocelulósica consiste principalmente de tres tipos de polímero, celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran asociados formando una única matriz sólida que dependiendo de las proporciones que se encuentren de cada polímero le confiere al material propiedades especiales de dureza, flexibilidad y rigidez.

La celulosa es un polímero de cadenas lineales de unidades de (1,4)-D-glucopiranosa, unidas por enlaces glucosídicos 1,4 de la configuración  $\alpha$ , con un peso molecular promedio de alrededor de 100.000 unidades. La celulosa en las plantas forma tanto estructuras cristalinas como amorfas. Las fibras de celulosa son en su mayoría independientes y se unen mediante enlaces de hidrógeno débiles (Laureano-Pérez, *et al.* 2005).

La hemicelulosa es un polisacárido complejo que existe en asociación con la celulosa en las paredes de las células vegetales. Es una mezcla de polisacáridos, formados casi

exclusivamente por azúcares como glucosa, manosas, xilosas, arabinosas y ácidos metilglucorónico y galacturónico. El componente dominante de la hemicelulosa de maderas duras y forrajes, como por ejemplo pastos y paja, es el xilano, mientras que para maderas blandas es el glucomanano (Saha, 2003). Su peso molecular es menor al de la celulosa (30.000 unidades). Además, la hemicelulosa posee ramificaciones con cadenas laterales cortas consistentes en diferentes azúcares, los cuales son polímeros fácilmente hidrolizables. La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y le proporciona mayor rigidez a la matriz celulosa – hemicelulosa – lignina (Laureano-Pérez, 2005).

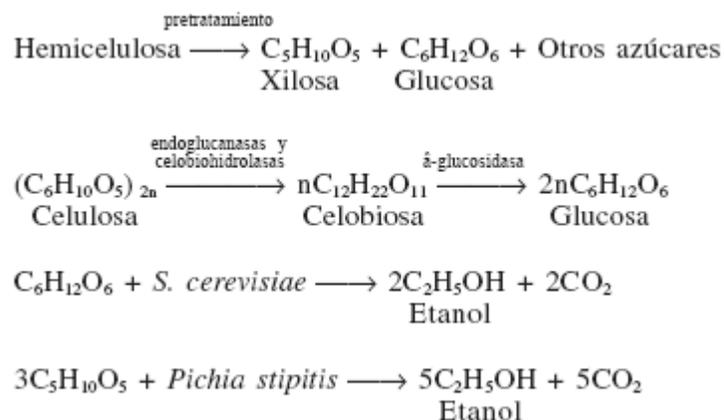
La lignina es un polímero aromático altamente ramificado y sustituido, que se encuentra adyacente a las fibras de celulosa en las paredes celulares de determinada biomasa, especialmente especies madereras, ésta unión forma el complejo lignocelulósico (Ana-Rita e Ian, 1996). El principal propósito de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y otros agentes oxidantes. La lignina no es soluble en agua y no reactiva a una gran variedad de solventes; lo que la hace de naturaleza recalcitrante (difícil su degradación).

Los materiales lignocelulósicos que más se han investigado son madera y residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas, ramas, hierba, frutas, paja, etc.) así como residuos sólidos urbanos.

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica consiste principalmente de cinco etapas diferentes, pretratamiento, hidrólisis de la celulosa, fermentación y separación de producto y tratamiento de efluentes líquidos. El pretratamiento es necesario para mejorar la productividad y el rendimiento total azúcares monoméricos en la etapa de hidrólisis. La conversión de hemicelulosa y celulosa a azúcares puede realizarse químicamente, mediante ácidos, o enzimáticamente, mediante la adición de celulasas. Las hexosas producidas pueden ser fermentadas a etanol fácilmente, mientras que la fermentación de pentosas es realizada sólo por algunas cepas.

El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente por una matriz de carbohidratos de celulosa y lignina, enlazada por cadenas de hemicelulosa, como se describió anteriormente. El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse.

En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol por un proceso fermentativo, a partir de microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado, como lo muestra el siguiente conjunto de reacciones involucradas en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica con un microorganismo en particular.



El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten de menos del 20% de los rendimientos teóricos a valores mayores al 90% (Lynd, 1996). Para el pretratamiento se han propuesto y desarrollado diferentes métodos, los cuales se

relacionan en la Tabla 1 (Sánchez y Cardona, 2004). Sin embargo, ninguno de los métodos de pretratamiento propuestos se puede aplicar en forma genérica a las diferentes materias primas (Classen *et al.*, 1999).

Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se forman, junto con los azúcares fermentables, gran cantidad de compuestos que pueden inhibir la fermentación subsiguiente. Las sustancias inhibitorias se originan como resultado de la hidrólisis de los diferentes componentes, de los ácidos orgánicos esterificados a la hemicelulosa, y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina. Así mismo, los inhibidores se forman a partir de productos de degradación de los azúcares solubles y de la lignina [Lynd, 1996; Palmqvist y Hahn- Hägerdal, 2000a; 2000b].

Luego del pretratamiento, la celulosa liberada es degradada hasta glucosa (sacarificación), lo cual puede hacerse con ácidos o enzimas (celulasas). La mayoría de las celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*, del cual se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas (Lynd, 2002; Zhang y Lynd, 2004). Las primeras hidrolizan los enlaces  $\beta$ -(1,4) de la cadena de celulosa a partir de los extremos no reductores o reductores liberando celobiosa o inclusive glucosa, mientras las endoglucanasas rompen estos mismos enlaces en forma aleatoria dentro de la cadena.

Desafortunadamente, las celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa, por lo que se agrega  $\beta$ -glucosidasa de otra fuente para complementar la acción de las celulasas de este hongo. La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.

**Tabla 1. Métodos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de etanol según Sánchez y Cardona *et al.* (2005)**

Métodos	Procedimiento/Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
<b>Pretratamientos físicos</b>				
Pulverizado mecánico	Reducción a astillas, trituración, molienda.	Molinos: vibratorio de bolas (tamaño final: 0.2-2mm), de cuchillas o martillo (tamaño final: 3-6mm).	Residuos de madera y forestales (paja, madera dura), desechos de maíz, bagazo de caña, timothy, alfalfa.	Sun y Cheng, 2002; Rivers y Emert, 1988; Cadoche y López, 1989; Papatheofanou <i>et al.</i> , 1998; Alvo y Belkacemi, 1997.
Pirólisis	T>300°C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis ácida suave (1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , T=97°C, 2.5h ) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa). Puede realizarse al vacío: 400°C, p=1mm Hg, 20min (algodón de desecho).	Madera, algodón de desecho.	Sun y Cheng, 2002; Yú y Zhang, 2003.
<b>Pretratamientos fisico-químicos</b>				
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, p=0,69-4,85 MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica.	Altas concentraciones de sólidos. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de parte de la xilosa obtenida, formación de inhibidores, se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , SO <sub>2</sub> o CO <sub>2</sub> mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores. Reducción de tamaño con menor gasto energético comparado con pulverización. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.	Bagazo, madera blanda, paja de arroz, madera de aspen, madera de eucalipto.	Sun y Cheng, 2002; Kaar <i>et al.</i> , 1998; Moniruzzaman, 1996; De Bari <i>et al.</i> , 2002; Heitz <i>et al.</i> , 1987; Söderström <i>et al.</i> , 2003; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Agua líquida caliente (LHW)	Agua caliente presurizada, T=170-230°C, 1-46min.	Concentraciones de sólidos <20%. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, >50% oligómeros. Solubilización parcial de la lignina (20-50%). Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90%. Baja o nula formación de inhibidores.	Bagazo de caña.	Lynd, 1996; Laser <i>et al.</i> , 2002; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	Dosis 1-2kg de amoníaco/kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Se requiere recuperación de amoníaco, no produce inhibidores. Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%). Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 0-60% de la hemicelulosa en dependencia de la humedad, más del 90% oligómeros. Ocurre cierta solubilización de la lignina (-10-20%).	Materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascari-lla de arroz, desechos de maíz, switchgrass), residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas de aspen y bagazo.	Sun y Cheng, 2002, Dale <i>et al.</i> , 1996, Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Explosión con CO <sub>2</sub>	Dosis de 4 kg CO <sub>2</sub> /kg de fibra, p=5,62 MPa.	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa >75% (alfalfa). No forma compuesto inhibitorios.	Alfalfa, mezcla de papel reciclado, bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002.
Ozonólisis	Ozono, reacción a temperatura y presión ambientales.	Degradación principalmente de lignina. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 57% (aserrín). No se forman inhibidores.	Paja de trigo, bagazo, heno verde, cacahuate, pino, paja de algodón y aserrín de álamo.	Sun y Cheng, 2002.
Hidrólisis con ácido diluido	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, HNO <sub>3</sub> al 1-5%. Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a T=160-200°C; procesos por lotes a alta carga de sólidos (10-40%) a T=120-160°C. Presiones cercanas a 1 MPa.	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. La alta temperatura es favorable para la hidrólisis de celulosa. Se requiere neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.	Dechos de maíz, bagazo de caña, madera de álamo, switchgrass, paja de trigo, astillas de álamo.	Sun y Cheng, 2002; Schell <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez-Chong <i>et al.</i> , 2004; Esteghlalian <i>et al.</i> , 1997; Wooley <i>et al.</i> , 1999; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Hidrólisis con ácido concentrado	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10-30%, 170-190°C, relación 1:1,6 sólido-líquido. Ácido peracético 21-60%, sistema tipo silo.	Se requiere la recuperación del ácido. Tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido.	Bagazo de caña, aserrín de madera dura.	Cuzens y Millar, 1997; Teixeira <i>et al.</i> , 1999.
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60°C	Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina>26%. Hidrólisis de >50% de la hemicelulosa. Sustancial hinchamiento de la celulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 78,2% (paja de arroz), 67,1% (bagazo). Conversión durante la hidrólisis de celulosa: proceso convencional, aprox. 54%; NaOH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aprox. 65% (hojas de caña de azúcar).	Madera dura, pajas con bajo contenido de lignina (10-18%), desechos de maíz, bagazo de caña, hojas de caña de azúcar.	Sun y Cheng, 2002; Rivers y Emert, 1988; Hari Krishna <i>et al.</i> , 1998; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 2%, 20°C, 8h.	Solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín).	Bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002.
Proceso organosolv	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, entre otros) o su mezcla con 1% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl.	Ruptura de la lignina interior y de las uniones de hemicelulosa. Solubilización casi total de la lignina. Hidrólisis casi total de la hemicelulosa. Altos rendimientos de xilosa. Recuperación de solventes y su remoción del sistema para no inhibir los procesos biológicos subsiguientes.	Madera de álamo.	Sun y Cheng, 2002; Rezzoug y Çapart, 1996; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
<b>Pretratamiento biológico</b>				
Pretratamiento con hongos	Hongos de la pudrición blanca, blanda y parda. Producción de celulasas por fermentación en sustrato sólido.	Los hongos producen celulasas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: ligninasas, lignin-peroxidadas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas. Proceso muy lento: <i>Pleurotus ostreatus</i> convierte el 35% de la paja de trigo en azúcares reductores en cinco semanas. Hongos de la pudrición parda degradan celulosa. Hongos de la pudrición blanca y blanda degradan celulosa y lignina.	Paja de trigo, desechos de maíz.	Sun y Cheng, 2002; Tengerdy y Szakacs, 2003.

La transformación de la glucosa en etanol puede ser realizada por diferentes microorganismos como son hongos, bacterias y levaduras. Los más populares son las levaduras especialmente *S. cerevisiae*, también conocida como levadura de panificación. Teóricamente, 100 g de glucosa producen 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono. Sin embargo, en la práctica, los microorganismos usan algo de la glucosa para el crecimiento por lo tanto el rendimiento real es menor a estas cifras teóricas (Sánchez y Cardona, 2004).

El problema técnico que se presenta durante la fermentación es que el etanol producido es un inhibidor de las levaduras y bacterias que llevan a cabo la fermentación. Esto pone un límite a la concentración de azúcares fermentables (Hendriks y Zeeman, 2009).

Aunque los principales desarrollos tecnológicos de los últimos años en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica se han enfocado principalmente en el desarrollo de sistemas de acondicionamiento y pretratamiento de la materia prima, para disponer de los azúcares fermentables a menor consumo energético, costo de capital y mayor eficiencia, también se han hecho grandes esfuerzos en el desarrollo de microorganismos que dispongan de la biomasa con el menor pretratamiento posible o que metabolicen los diferentes azúcares (hexosas y pentosas) comúnmente producidos en pretratamiento de la materia prima. *Z. mobilis*, por ejemplo, presenta una alta velocidad de crecimiento y alta producción específica de etanol (Skotnicki, *et al.*, 1982), sin embargo, su única fuente de carbono se limita a glucosa, fructosa y sacarosa. Mientras que las cepas Gram-negativas de *Zymobacter palmae* (Okamoto *et al.*, 1993) usan un amplio rango de sustratos, hexosas, di y tri-sacáridos con enlace  $\alpha$ , que usa como fuentes de carbono para la producción de etanol.

Otra alternativa para aumentar la eficiencia y productividad de los procesos de producción de alcohol es la integración de diferentes etapas del proceso en una sola. De esta manera el proceso se ve favorecido debido a que los efectos inhibitorios de la fase fermentativa del proceso individual se reducen y la producción de este biocombustible se incrementa

considerablemente al controlar cinéticamente los parámetros más influyentes en términos de productividad.

Los efectos inhibitorios se presentan en la etapa individual de fermentación y aún en el proceso acoplado de sacarificación-fermentación, debido al hecho de que el catabolismo del microorganismo fermentativo es muy sensible al etanol y al encontrarse en ambientes fermentativos con alta concentración de éste, se disminuye considerablemente su acción etanológica.

Este hecho ha impulsado el estudio reciente de integración de los procesos de sacarificación, fermentación y extracción con co-solvente en un único sistema, con el objeto de contrarrestar el efecto inhibitorio y desplazar la cinética fermentativa hacia la formación de producto, en contraste con la operación individual, la cual se limita en un tiempo de residencia establecido por la concentración inhibitoria de etanol en el medio. Como consecuencia de la integración del proceso acoplado en general se logra una mayor producción, reflejada en una mayor eficiencia global de las etapas críticas como un todo en la producción de etanol carburante.

El proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) ha sido extensamente estudiado e implementado con el fin de reducir los efectos inhibitorios de los productos finales de la hidrólisis (Zheng *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 1992). En este proceso, los azúcares reductores producidos en la hidrólisis de la celulosa o sacarificación son simultáneamente fermentados a etanol, lo cual reduce grandemente los productos de inhibición de la hidrólisis. La hidrólisis es usualmente la etapa limitante del proceso SFS (Philippidis y Smith, 1995), ya que la temperatura óptima de sacarificación no es apta para los microorganismos comúnmente usados en la fermentación. Para solucionar esto, se han usado levaduras y bacterias termotolerantes, las cuales permiten incrementar la temperatura cerca de la óptima de la hidrólisis.

Comparado con el proceso de fermentación en dos etapas de hidrólisis, la SFS tiene algunas ventajas como: el incremento en la velocidad de hidrólisis mediante la conversión de los azúcares que inhiben la actividad de las celulasas, disminución de requerimientos de enzima, alto rendimiento, disminución de requerimientos de condiciones estériles ya que la glucosa es removida inmediatamente y el etanol es producido, menor tiempo de proceso y

menor volumen de reactor ya que se usa un solo reactor. Sin embargo, el etanol puede exhibir la actividad de las celulasas en el proceso SFS (Sun y Cheng, 2002). De acuerdo a esto, el proceso tiene algunas desventajas que deben ser consideradas para mejorar la configuración SFS. En resumen, estos aspectos son la incompatibilidad de temperaturas de hidrólisis y fermentación, la tolerancia de algunos microorganismos al etanol y la inhibición de las enzimas por parte del etanol.

Un método integrado más recientemente analizado por el grupo de investigación en *Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos* de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, es el proceso de fermentación-extractiva para la producción de alcohol.

El proceso de fermentación extractiva se basa en la remoción de los componentes inhibitorios desde el caldo de cultivo mediante un agente extractivo, permitiendo de esta forma la intensificación del proceso. Para describir el proceso continuo de fermentación extractiva para la producción de etanol se seleccionó n-dodecanol como agente extractivo. Inicialmente una corriente acuosa que contiene los componentes nutritivos necesarios durante el proceso de fermentación se adiciona a un reactor de tipo CSTR, y en el cual el solvente también es continuamente adicionado. Los azúcares alimentados son regenerados durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, en el cual los polisacáridos mayores se rompen en sus azúcares elementales como hexosas (glucosa) y pentosas (principalmente xilosa). Los azúcares formados son convertidos en etanol en el reactor y el etanol producido se distribuye entre la fase acuosa y la fase orgánica (solvente), disminuyendo su concentración en el caldo de cultivo acuoso y permitiendo la reducción del efecto inhibitorio sobre los microorganismos. La fase de solvente enriquecido con etanol es continuamente removido del reactor a través de una unidad de decantación. Entonces esta corriente es enviada a un flash para recuperar el etanol obtenido y para regenerar el solvente, el cual puede ser recirculado al reactor.

Durante el desarrollo del modelo global de fermentación-extractiva se debieron realizar las siguientes suposiciones: a) la toma de sustrato, la formación de biomasa y la biosíntesis de producto son llevadas a cabo solamente en la fase acuosa; b) el etanol es el componente emigrante hacia la fase orgánica y pequeñas cantidades de agua pueden emigrar a la fase orgánica dependiendo del solvente; c) el solvente es bio-compatible con el microorganismo

utilizado para la fermentación y no presenta efectos inhibitorios sobre la fermentación; d) la agitación en el biorreactor asegura una mezcla total entre las fases líquidas y no produce daños (como rompimiento) a las células. La configuración correspondiente al proceso de fermentación-extractiva continua envuelve la alimentación del medio del cultivo ( $F_E$ ) y de solvente al reactor ( $F_A$ ) y la remoción continua de la fase orgánica ( $Q_E$ ) y acuosa ( $Q_A$ ) en corrientes separadas, tal como muestra la Figura 1.

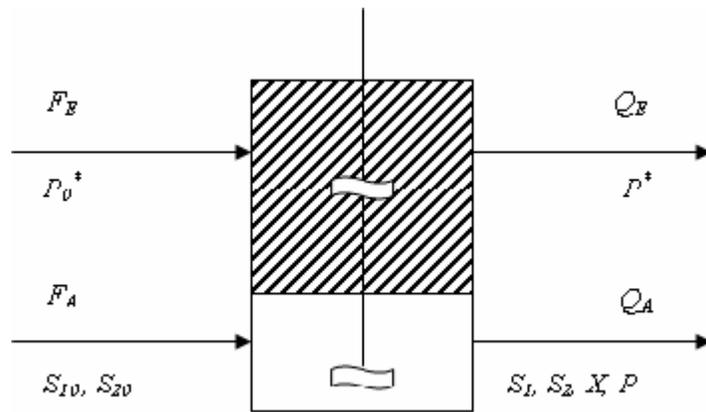


Fig. 1. Diagrama esquemático del proceso de fermentación-extractiva en continuo para la producción de etanol. La unidad de decantación no se muestra.

En la literatura se reportan algunas descripciones previas del proceso de fermentación-extractiva para la producción continua de etanol desde un medio que contiene glucosa. Kollerup y Daugulis (1985) consideraron una relación simple entre la concentración en la fase acuosa y el contenido de etanol en la fase orgánica.

Como se describió antes la biomasa lignocelulósica es una materia prima promisoriosa para la producción de etanol, pero es necesario sobrepasar algunos inconvenientes tecnológicos relacionados con este tipo de materiales, lo que limita su uso. La principal materia prima empleada en este estudio correspondió a zoca de café.

Se denomina zoca del café a los tallos del árbol de café que son cortados a una altura aproximada de 15 a 20 cm desde el suelo. Este procedimiento se realiza como práctica agrícola para mejorar la productividad del árbol de café y es una de las técnicas de renovación del cultivo más ampliamente practicadas en los países cafeteros. Este material

es generado estacionalmente en las plantaciones de café, siendo apilado en un sitio del terreno para ser incinerado en la mayoría de los casos o dejado *in situ* para su autodegradación.

Actualmente, la zoca de café no tiene un uso definido, a parte se servir como abono o regenerador de suelos cuando se quema y se reincorpora al suelo productivo en forma de cenizas. Sin embargo, la práctica de incineración presenta algunas implicaciones ambientales al ser fuente de CO<sub>2</sub> contaminante, contribuyendo al aumento de gases de invernadero en la atmósfera.

La zoca de café puede ser clasificada como un residuo lignocelulósico. Adicionalmente, en un material lignocelulósico se encuentran nitrógeno y proteína cruda, entre otros componentes en menor proporción. La morfología básica de la pared celular de este tipo de materiales está determinada por las microfibrillas de celulosa que comprenden cerca del 45% del peso total del material.

Una ilustración de la conformación estructural típica de un material lignocelulósico se muestra en la Figura 2.

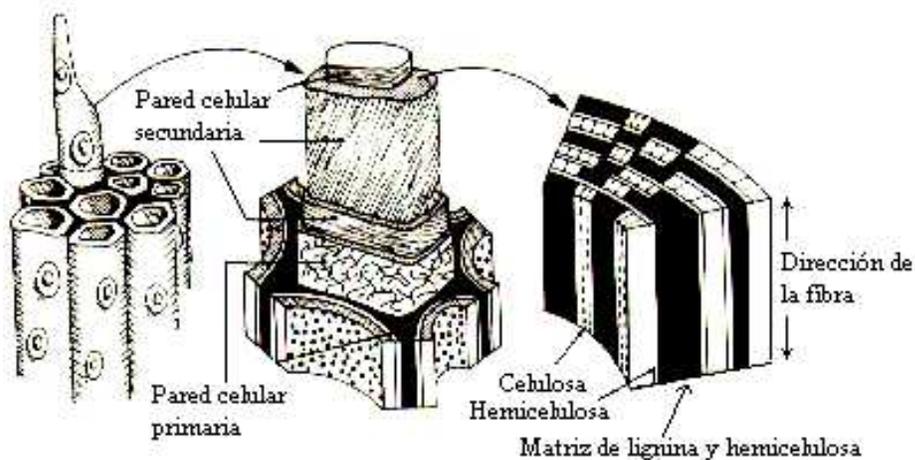


Fig. 2. Morfología típica de un material lignocelulósico.

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

Actualmente la producción a gran escala de etanol presenta tres grandes retos tecnológicos: incrementar las bajas conversiones de transformación a etanol de los procesos convencionales, las cuales no superan en la mayoría de los casos el 45% empleando materiales de alta accesibilidad y ricos en azúcares, tales como caña de azúcar y almidón. Otro aspecto de gran importancia y actualidad es el empleo de materias primas con altos contenidos aprovechables de polisacáridos, de alta disponibilidad y a su vez, que no representen una amenaza inminente en la alimentación humana por la utilización de cultivos destinados para tal fin, como es el caso particular de los materiales lignocelulósicos. Este hecho es de gran actualidad, debido al desmesurado empleo de cultivos alimentarios tradicionales para la producción de etanol a gran escala como la caña de azúcar y maíz que han venido generando en los últimos años una gran presión económica y carestía de precios en el comercio mundial de estos alimentos. Por último, la integración de los procesos hidrolítico, fermentativo y extractivo en una sola configuración tecnológica representa un gran avance en el mejoramiento operativo, técnico, energético y económico como aproximación para lograr un proceso de producción de etanol con mayor favorabilidad tecno-económica y ambiental con respecto a las configuraciones actualmente establecidas.

### 3 MATERIALES Y METODOS

---

Esta investigación se realizó en las Plantas Piloto de Biotecnología y Agroindustria (*Campus La Nubia*) de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales.

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 *Materia Prima*

Las materias primas de estudio correspondieron a los materiales lignocelulósicos **Zzoca de café** proveniente de un cultivo de café *Coffea Arábica* de 15 años de antigüedad y originaria de la zona rural del municipio de Pensilvania (oriente de Caldas) y **Aserrín de Pinus Pátula** proveniente de un aserradero de la localidad de Pensilvania (Caldas). Adicionalmente, borra de café proveniente de las baterías de extracción de café soluble de la Fábrica de *Café Buendía*, ubicada en Chinchiná (Caldas) fue incluida como materia prima de referencia.

##### 3.1.2 *Materiales*

###### 3.1.2.1 *Enzimas celulolíticas*

Se empleó CELLUCLAST, enzimas celulolíticas adquiridas a Novozyme Inc.(USA) suplementadas con  $\beta$ -glucosidasa de disponibilidad comercial.

###### 3.1.2.2 *Microorganismo fermentativo*

El microorganismo fermentativo correspondió a la levadura etanológica *Saccharomyces cerevisiae* de disponibilidad comercial.

###### 3.1.2.3 *Patrones de difracción de referencia*

Se empleó celulosa cristalina SIGMACELL y lignina tipo álcali compradas a SIGMA-ALDRICH CHEMICALS (ST. LOUIS, MO) como materiales de referencia para los análisis de difracción de rayos X.

## 3.2 METODOLOGÍA

La investigación se realizó en tres etapas secuenciales de evaluación experimental:

1. Análisis estructural de los materiales de estudio
2. Experimentación a escala de laboratorio (operatividad inicial de la configuración integrada y omitida en este documento)
3. Experimentación a escala de planta piloto de acuerdo con los resultados de laboratorio.

### *3.2.1 Análisis Estructural de los Materiales*

Los tres materiales lignocelulósicos de estudio fueron analizados estructuralmente mediante difracción de rayos X (conocido por su abreviación en idioma inglés como XRD) y texturalmente mediante adsorción de nitrógeno.

#### *3.2.1.1 Preparación de la muestra.*

Previo a las determinaciones, los materiales fueron preparados por desgasificación, exponiéndolos a remoción de gases a una velocidad de 50 mmHg/s conservando una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta alcanzar 60°C durante un periodo de 24 h.

#### *3.2.1.2 Determinación de área superficial.*

El área superficial BET y la distribución de tamaño de poro fueron determinados mediante la adsorción de nitrógeno a 77 K empleando un sistema de porosimetría y área superficial acelerado (ASAP 2020, Micromeritics) a una presión relativa aproximada de  $P/P_0 = 0.066-0.30$  ( $P$ : Presión del sistema,  $P_0$ : 0.95 atm). El área superficial se calculó de las isotermas usando la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Igualmente, la distribución de tamaño de poro se determinó mediante el método de Barrett-Joiner-Halenda (BJH).

### *3.2.1.3 Análisis estructural.*

El análisis estructural de los materiales se realizó en un difractómetro de rayos X (Rigaku MiniFlex II), usando radiación de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) a 30 kV y 15 mA en un modo de cobertura continua. Los patrones de rayos X fueron registrados en el rango de rastreo de  $2\theta = 3.0\text{-}70^\circ$  con una amplitud de paso de  $0.02^\circ$  y una velocidad de  $5^\circ/\text{min}$ .

### *3.2.1.4 Análisis de patrones de referencia.*

Celulosa (tipo 20) y lignina (álcali) fueron analizados mediante XRD, en las mismas condiciones de análisis de los materiales de estudio, con el objeto de identificar principalmente estos componentes en la conformación estructural de los materiales.

## ***3.2.2 Caracterización Composicional de los Materiales***

Los materiales fueron caracterizados químicamente para determinar los contenidos gravimétricos de celulosa, hemicelulosa, lignina ácido-insoluble, lignina ácido-soluble, proteína total, componentes extractivos y cenizas presentes en cada uno de los materiales.

### *3.2.2.1 Caracterización Ligno-celulósica de la Materia Prima*

El material lignocelulósico se acondicionó mediante secado a  $105^\circ\text{C}$  y reducción de tamaño hasta obtener un tamaño promedio de partícula de  $0.42 \text{ mm}$  (serie de tamices Tyler) por molienda en molino. Posteriormente, al material acondicionado se le determinó los contenidos de celulosa mediante el método *Goering-van Soest*, lignina total (ácido insoluble y ácido soluble) de acuerdo con las normas TAPPI T-222 y TAPPI UM-250, respectivamente. Por último, se determinó el contenido de componentes extractivos por extracción en Soxhlet, de acuerdo a la metodología de USDA (United States, Department of Agriculture) reportada por Han *et al.* (1997), proteína total mediante un método modificado de digestión Kjeldahl y contenido de cenizas mediante la norma TAPPI om-93.

Adicionalmente, se determinó el contenido de humedad inicial del material mediante secado a 105°C hasta peso constante, de acuerdo con la norma ASTM D1348-94 (1998).

#### *3.2.2.2 Análisis de la información*

La información obtenida en la caracterización del material lignocelulósico se sometió a un análisis descriptivo. Para la realización de este análisis, cada una de las variables en las determinaciones de componentes extractivos, lignina ácido insoluble, lignina ácido soluble, proteína total, hemicelulosa, cenizas y contenido de celulosa se cuantificaron por triplicado. El reporte de cada uno de los componentes incluyó la desviación estándar obtenida en cada caso.

#### *3.2.3 Acondicionamiento de la Materia Prima*

Inicialmente, el material lignocelulósico es secado en estufa hasta obtener un contenido residual de humedad entre 8-10% (peso/peso) y posteriormente se reduce de tamaño hasta 0.42 mm por molienda en un molino Toastmaster.

Luego de acondicionar el material, se conformaron tres (3) unidades experimentales, cada una de las cuales estuvo constituida por 100 g de material acondicionado. Estas unidades experimentales se emplearon independientemente en las determinaciones analíticas.

#### *3.2.4 Pretratamiento del Material Zoca de Café*

El material acondicionado zoca de café fue sometido a pretratamiento químico con ácido diluido, empleando 100 g de material y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0.1 % (w/w), en condiciones de prehidrolisis correspondientes a 130°C durante 2 h. El material resultante se filtró con papel filtro de porosidad gruesa (Whatman No. 1) y el material sólido se lavó con 20 ml de agua a

92°C. La fase líquida del lavado se agregó al filtrado inicial obtenido de la pre-hidrólisis y se guardó a 4°C para su posterior empleo como sustrato en el proceso SFES.

### 3.3 EXPERIMENTACION EN PLANTA PILOTO

Con base en la información preliminar obtenida de estabilidad operacional y comportamiento de las variables de proceso del estudio a escala de laboratorio, se procedió a implementar la configuración experimental del proceso acoplado de producción de etanol en régimen “batch” de fermentación y extracción a escala de planta piloto, empleando un reactor-extractor de discos rotatorios a escala de planta piloto.

Luego de acoplar la unidad integrada se procede a ejecutar el estudio experimental de SFES de producción de etanol a las mismas condiciones operativas del estudio de laboratorio (fermentación en régimen “batch” a las condiciones de 10% (peso/peso) de inóculo de microorganismo fermentativo, pH 4.5 y 35°C de temperatura en condiciones anaeróbicas por un tiempo de 48 h. Adicionalmente, al término de las 10 horas iniciales del proceso, se adicionó el solvente *n*-dodecanol al medio de fermentación en una relación de 1:4 con la fase acuosa en un volumen total de 5 litros. La unidad experimental de estudio correspondió a 212 g de material lignocelulósico acondicionado previamente.

#### 3.3.1 *Seguimiento de las Variables de Proceso*

El seguimiento del proceso se realizó por medición de las principales variables en intervalos de dos (2) horas durante un periodo de 44 h. Las dos principales variables de proceso correspondieron a la concentración de azúcares reductores (glucosa) y concentración de etanol en la fase solvente, determinadas mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) y refractométricamente a partir de una curva estándar de referencia que relacionó concentración de etanol en *n*-dodecanol a 37°C (A.O.A.C, 1997).

### *3.3.2 Análisis de la Información Obtenida*

La información obtenida experimentalmente de las variables evaluadas se analizó mediante un análisis descriptivo de promedios y fuentes de variación entre las lecturas obtenidas a partir de tres replicas realizadas para cada una de las variables. Posteriormente, con la información obtenida se verificaron los perfiles de concentración de azúcares reductores y etanol de la configuración experimental.

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Análisis Estructurales de los Materiales

#### 4.1.1 Material Zoca de Café.

##### 4.1.1.1 Análisis XRD de zoca de café.

El patrón de difracción de rayos X del material zoca de café se muestra en la fig. 3 El análisis muestra un alto grado de ordenamiento estructural presentando dos picos principales a  $2\theta = 15.78^\circ$  y  $22.26^\circ$ , respectivamente. Los picos obtenidos dilucidan la presencia de dos componentes principales en el material. Teniendo como referencia el análisis de rayos X para la celulosa y la lignina como patrones de comparación para el análisis de difracción, puede verse la correspondencia del pico principal obtenido para la celulosa (fig. 7) con el pico presentado por la zoca de café a  $2\theta = 22.26^\circ$ . De igual manera, el pico presentado por el material a  $2\theta = 15.78$  presenta gran correspondencia con la zona de máxima difracción de la lignina álcali (Fig. 8).

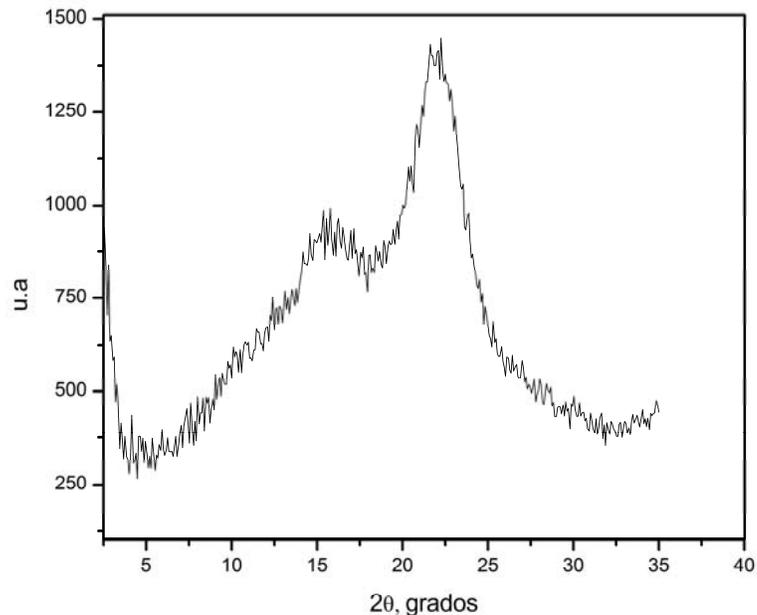
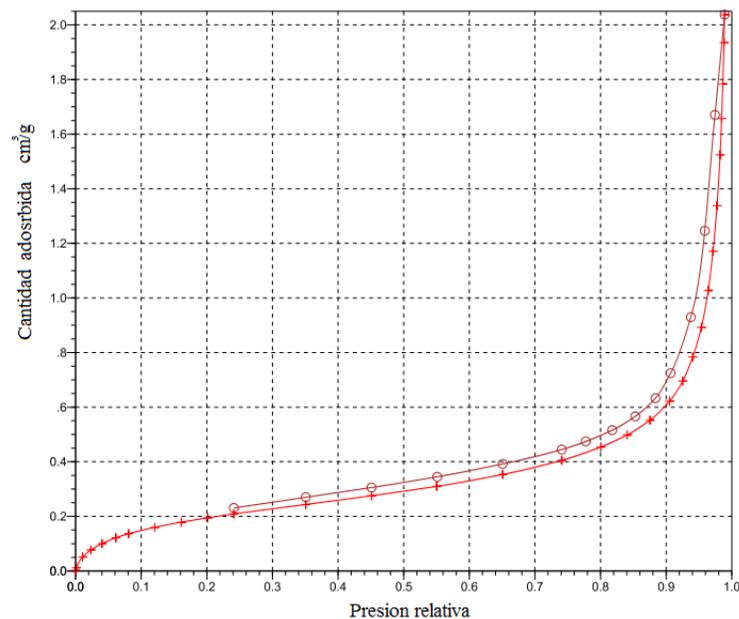


Fig. 3. Patrón de difracción de rayos X del material zoca de café.  
Intensidad en unidades arbitrarias (u.a).

En el patrón de difracción de la zoca de café se observa un mayor ordenamiento estructural en el pico de correspondencia de la celulosa por su carácter cristalino. Igualmente, el pico de correspondencia con la lignina patrón presenta un alto grado amorfo que le confiere la presencia de lignina en el material.

#### 4.1.1.2 Análisis BET de zoca de café.

El análisis de área superficial y distribución de tamaño de poro para el material zoca de café se muestra en la fig. 4.



**Fig. 4.** Isotermas de adsorción-desorción de Nitrógeno para el material zoca de café.

La isoterma de adsorción-desorción obtenida para el material zoca corresponde a una isoterma de fisisorción tipo II, la cual representa una adsorción libre (no restringida) en la zona monocapa-multicapa, de acuerdo a Sing *et al.* (1985). Como puede verse en la fig. 4, la isoterma presentó un lazo de histéresis que corresponde al tipo H3 la cual es asociada con el proceso de condensación moderado de manera capilar que se presenta durante la desorción en la estructuras porosas. A partir de la isoterma de adsorción-desorción obtenida por la

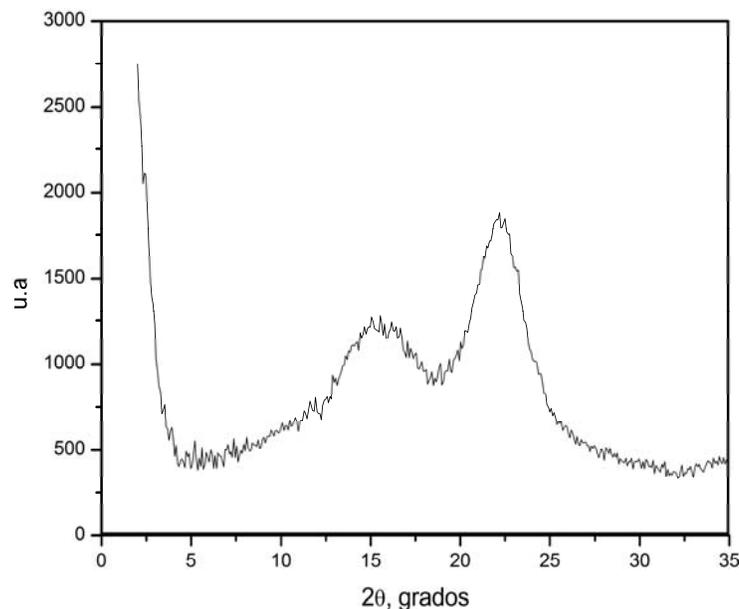
zoca se puede concluir que el material está conformado predominantemente por agregados de partícula del tipo placas.

Como se observa, la isoterma de desorción no cerró completamente, lo cual se presenta típicamente en materiales lignocelulósicos como bagazo de caña de azúcar y materiales arcillosos. El área superficial BET del material correspondió a  $0.7763 \text{ m}^2/\text{g}$  y el tamaño promedio de poro fue de  $132.08 \text{ \AA}$

#### 4.1.2 Material *Pinus Pátula*.

##### 4.1.2.1 Análisis XRD de *Pinus Pátula*.

El patrón de difracción de rayos X del material *Pinus Pátula* se muestra en la fig. 5. En la figura se observa una gran similitud de picos entre los patrones de difracción obtenidos para la zoca y *Pinus Pátula*. Igualmente, como se presentó en el análisis de la zoca, los dos picos de mayor intensidad corresponden a la presencia principalmente de celulosa y lignina en la estructura del material analizado.



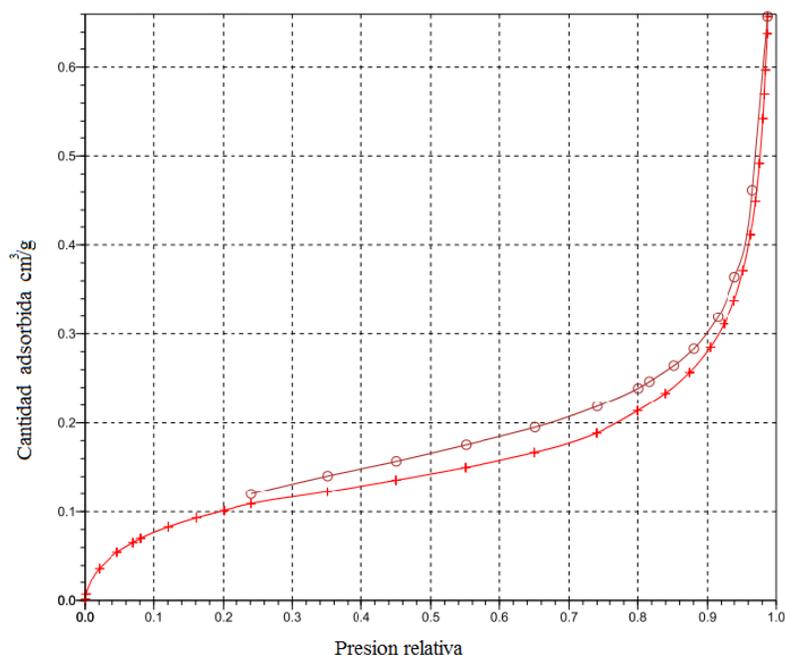
**Fig.5.** Patrón de difracción de rayos X del material *Pinus Pátula*.  
Intensidad en unidades arbitrarias (u.a).

El pico principal obtenido en el análisis de difracción, correspondiente a  $2\theta = 22.50^\circ$  se observa de mayor intensidad con respecto al pico correspondiente a  $2\theta = 16.18^\circ$ . En general, el material *Pinus Pátula* presentó un menor grado amorfo en su estructura con respecto al material zoca de café; sin embargo, se evidenció un alto grado de ordenamiento estructural al ser comparado con los patrones de referencia de celulosa y lignina, los cuales se muestran más adelante. Este ordenamiento en la estructura del material fue influenciado principalmente por el componente cristalino (celulosa) presente en el material lignocelulósico.

#### 4.1.2.2 Análisis BET de *Pinus Pátula*.

La isoterma de adsorción-desorción del material *Pinus Pátula* se presenta en la fig. 6. Análogamente, como se obtuvo con el material zoca de café, la isoterma de fisisorción del material correspondió a una isoterma tipo II con un tipo de lazo de histéresis tipo H3, de acuerdo a la clasificación reportada por Sing *et al.* (1985). Este tipo de fenómenos es característico en materiales mesoporosos con estructuras porosas en forma de agregados del tipo placa.

Igualmente, como se observó en el material zoca de café, la isoterma desortiva en las condiciones de análisis no cerró completamente. Adicionalmente, el análisis mostró un área superficial BET del material de  $0.4101 \text{ m}^2/\text{g}$ . por su parte, el análisis de distribución de poro mostró un tamaño promedio de poro de  $86.0137 \text{ \AA}$



**Fig. 6.** Isothermas de adsorción-desorción de Nitrógeno para el material *Pinus Pátula*.

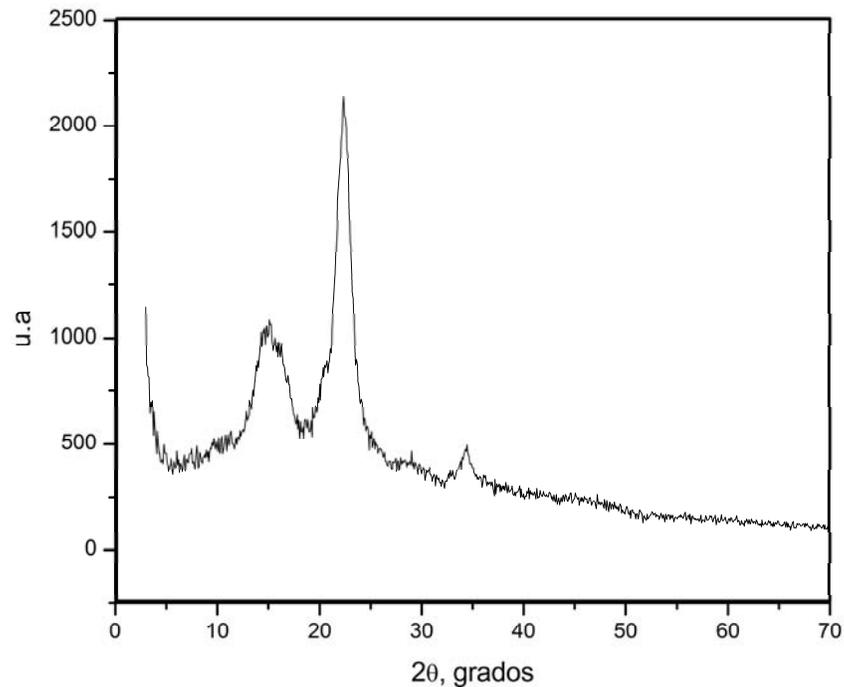
#### 4.1.3 Patrones de Celulosa Cristalina y Lignina Álcali de Referencia.

Con el objeto de analizar asertivamente los patrones de difracción de rayos X para los materiales de estudio, se realizaron análisis de difracción para los componentes puros *celulosa* cristalina y *lignina* en las mismas condiciones de análisis empleadas con los materiales *zoca* y *Pinus Pátula*.

##### 4.1.3.1 Análisis de Difracción de Rayos X de Celulosa Cristalina (Estándar).

La celulosa como componente de referencia (cristalina en estado puro) presentó el patrón de difracción que se muestra en la fig. 7. El pico más representativo del patrón de celulosa se presentó a  $2\theta = 22.37$  que sirvió para identificar análogamente la presencia de celulosa en los materiales *zoca* de café y *Pinus Pátula*. El pico presentado por la celulosa estándar a  $2\theta = 14.29$  también es característico de la celulosa cristalina, como se reporta en otro estudio estructural de la celulosa (Zhao *et al.*, 2007). De acuerdo con la fig. 7, el patrón de

difracción de la celulosa presenta un alto grado de ordenamiento estructural como consecuencia directa de la cristalinidad del material en su estado nativo.

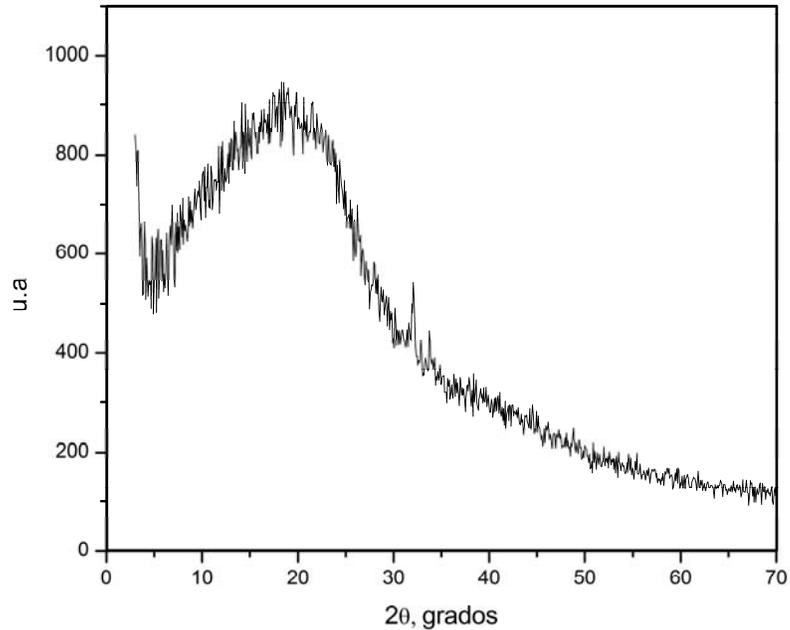


**Fig.7.** Patrón de difracción de rayos X de celulosa (tipo 20) como estándar.  
Intensidad en unidades arbitrarias (u.a).

#### *4.1.3.2 Análisis de Difracción de Rayos X de Lignina Alkali (Estándar).*

El análisis de difracción de rayos X de la lignina tipo álcali se muestra en la fig. 8. La lignina presentó un patrón de difracción altamente amorfo, al no presentar patrones únicos de difracción bien definidos, como se observa en la fig. 8. Los picos de difracción de mayor intensidad del material se concentraron en una región aproximadamente entre  $2\theta = 15$  y  $25$  en la fig. 8, aunque en el material presentó un máximo pico a  $2\theta = 18.29^\circ$ . El patrón de

difracción de la lignina fue útil en la identificación de componentes amorfos en los resultados de los análisis estructurales de la zoca de café y *Pinus Pátula*.



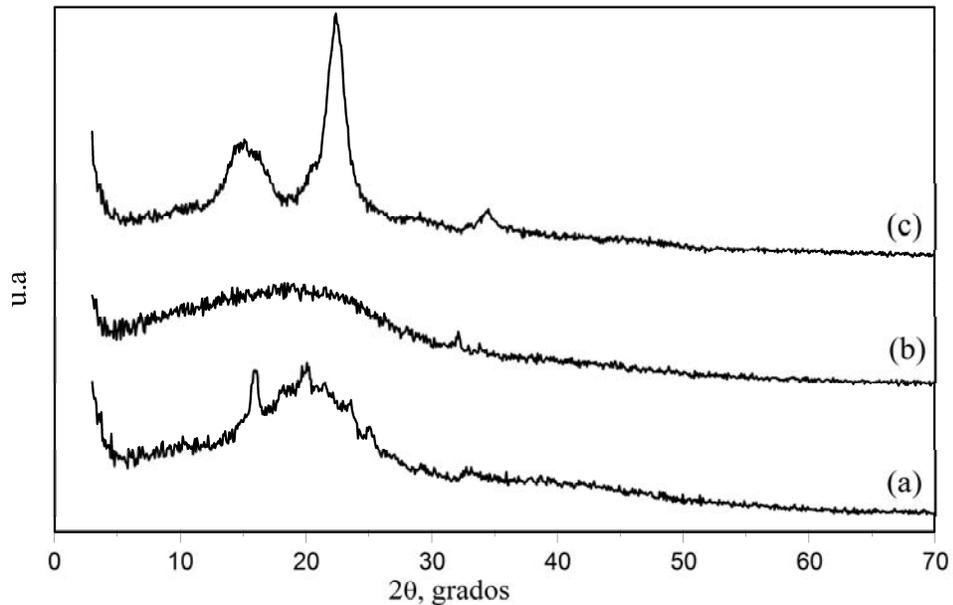
**Fig.8.** Patrón de difracción de rayos X de lignina (álcali) como estándar.  
Intensidad en unidades arbitrarias (u.a).

#### 4.1.3.3 Análisis Estructural de un Material Residual de Café con Composición Conocida.

El material residual de café borra de café (conocido comúnmente como café agotado) fue analizado estructuralmente con el objeto de establecer características estructurales similares entre materiales lignocelulósicos de un origen común, en el caso de los residuos de zoca y borra de café. La composición química lignocelulósica de la borra de café que se encuentra previamente reportada (Agudelo, 2002) se tomó como base comparativa para el identificar la presencia de celulosa y lignina en la zoca de café y la correspondencia con una composición química conocida.

#### 4.1.3.4 Análisis de Difracción de Rayos X de Borra de Café.

En la fig. 9 se muestra el patrón de difracción de rayos X para la borra de café obtenido en las mismas condiciones de análisis establecidas para los dos materiales de estudio.

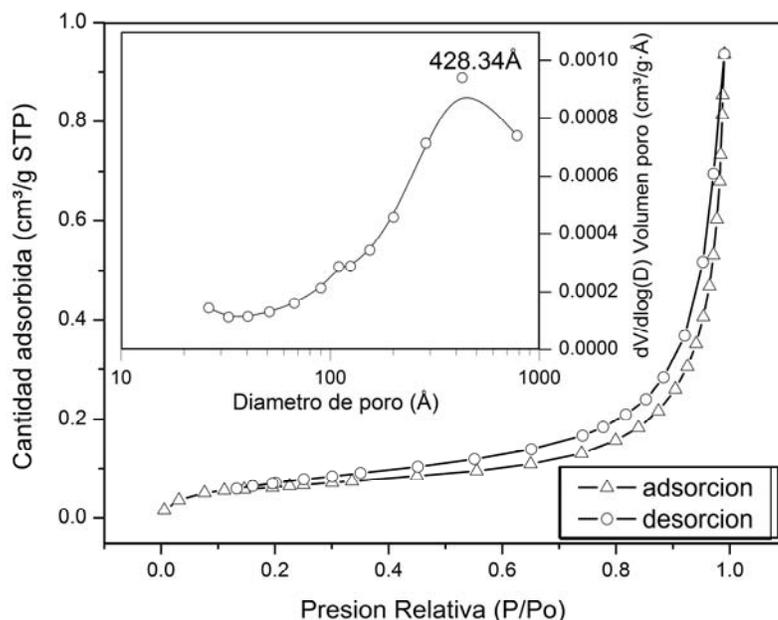


**Fig. 9.** Difractogramas comparativos de rayos X de la borra de café.

(a) *Borra de café*, (b) *Lignina álcali*, (c) *Celulosa cristalina*. u.a: unidades arbitrarias.

#### 4.1.3.5 Área Superficial BET y Distribución de tamaño de Poro de la Borra de Café.

La fig. 10 muestra la isoterma de adsorción-desorción obtenida para el material borra de café. El tamaño promedio de poro determinado para el material correspondió a 428.34 Å (inserto de la fig. 10)



**Fig. 10.** Isothermas de adsorción-desorción de Nitrógeno para borra de café. Isothermas obtenidas a las mismas condiciones de análisis para los otros materiales (zoca de café y Pinus *Pátula*). El inserto corresponde a la distribución de tamaño de poro característico de la borra de café (tamaño de poro característico aprox. 428 Å)

## 4.2 Caracterización Química de los Materiales

### 4.2.1 Composición de la Zoca de Café.

En la Tabla 2 se muestra la composición química encontrada para el material zoca de café. El material de zoca de café presentó una composición considerablemente mayor en contenido de lignina ácido-insoluble. Por su parte, el contenido de lignina ácido-soluble fue del 0.01% de la composición global y no incrementó apreciablemente el contenido de lignina total en el material. El contenido de celulosa encontrado (32.32%) estuvo alrededor de los valores típicos presentes en materiales lignocelulósicos y el aporte de los componentes extractivos no fue significativo en el material. El contenido de proteína total presentó interferencia en la determinación de lignina ácido-insoluble, debido a la solubilización de proteína en las condiciones ácidas de la determinación *klason*; haciéndose necesario la corrección gravimétrica de lignina insoluble por presencia de proteína.

**Tabla 2.** Composición química de la zoca de café.

<b>Componente</b>	<b>Composición (%)</b>	
$\alpha$ -Celulosa	32.32 $\pm$ 1.45	
Hemicelulosa	13.80 $\pm$ 1.02	
Componentes extractivos	1.69 $\pm$ 0.01	
Lignina	Acido-insoluble	46.6 $\pm$ 0.12
	Acido-soluble	0.01 $\pm$ 0.00
Proteína total	4.61 $\pm$ 0.03	
Cenizas	0.92 $\pm$ 0.01	

#### **4.2.2 Composición de *Pinus Pátula*.**

En la Tabla 3 se observa la distribución de la composición química determinada para *Pinus Pátula*. Como se observa, el material presentó un contenido predominantemente lignínico, alcanzando un 62% (w/w) en base seca del material. Este alto contenido observado fue corregido gravimétricamente mediante la determinación de proteína total como interferente en la cuantificación *klason*; sin embargo, como se muestra en la tabla, el contenido total de proteína determinado fue de 0.62  $\pm$  0.01% (w/w), el cual no representó un aporte considerable como interferente para sustracción en el contenido de lignina acido-insoluble. El contenido de lignina acido-soluble fue de 0.63%, considerablemente mayor al encontrado en la zoca de café (0.01%) y participó en mayor grado a incrementar el contenido de lignina total en el material con respecto al aporte de la lignina soluble en la zoca.

**Tabla 3. Composición química de *Pinus Pátula***

<b>Componente</b>	<b>Composición (%)</b>	
$\alpha$ -Celulosa	24.80 $\pm$ 1.68	
Hemicelulosa	10.62 $\pm$ 0.99	
Componentes extractivos	0.87 $\pm$ 0.01	
Lignina	Acido-insoluble	61.99 $\pm$ 0.1
	Acido-soluble	0.63 $\pm$ 0.01
Proteína total	0.62 $\pm$ 0.01	
Cenizas	0.46 $\pm$ 0.00	

Por su parte, el contenido de celulosa aprovechable como materia prima para la producción de etanol fue de 24.80  $\pm$  1.68 % (w/w) muy inferior al encontrado en el material zoca de café. Como una consecuencia directa de lo anterior, el contenido asociado de hemicelulosa a la celulosa fue de 10.62%. Además, este contenido hemicelulósico estuvo asociado con un alto contenido de lignina *klason* como se mostró anteriormente. El componente extractivo, representado por principalmente por ácidos grasos presentes en el material, fue inferior al 1% del contenido global del material y correspondió aproximadamente al 50% del equivalente encontrado en la zoca de café. Las sales orgánicas, cuantificadas como cenizas, representaron solo el 0.46% (w/w) de la composición del material.

## 5 PRETRATAMIENTO DE LOS MATERIALES

---

### 5.1 Evaluación experimental con zoca de café.

Con el objeto de remover la lignina y aumentar la digestibilidad del material zoca de café para la posterior etapa de hidrólisis enzimática, el material zoca de café fue sometido a un proceso de pretratamiento con un agente alcalino en dos grados de severidad. El material con tamaño de partícula promedio de 0.42 mm y humedad de 1.6% (peso/peso) fue pretratado químicamente con NaOH al 2% como agente deslignificante en una relación de sólidos del 20%. Se evaluaron dos grados de severidad en las siguientes condiciones:

**Severidad 1:** Temperatura 130°C y 2 horas de tiempo de exposición.

**Severidad 2:** Temperatura 25°C y 24 horas de tiempo de exposición.

El grado de remoción de lignina del material tratado en cada uno de los grados de severidad fue validado mediante análisis de difracción de rayos X para observar la conformación estructural del material residual obtenido. En la fig. 11 se observa el patrón de difracción de rayos X obtenido para el material residual del pretratamiento.

Como muestra la fig. 11, el grado de severidad I del pretratamiento alcalino remueve efectiva y selectivamente el componente amorfo (lignina) presente en el material tratado, logrando un patrón de difracción con un alto grado de semejanza al obtenido por el patrón de celulosa cristalina.

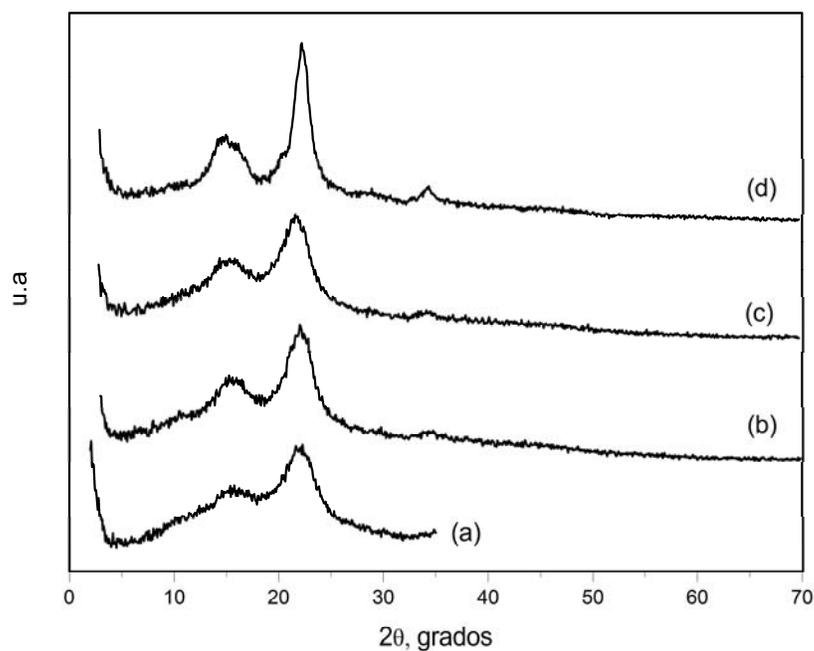


Fig. 11. Patrón de difracción de rayos X de la zoca de café pretratada con NaOH al 2%.  
 (a) zoca de café. (b) zoca pretratada con severidad 1. (c) zoca pretratada con severidad 2.  
 (d) patrón de celulosa (cristalina)

## 5.2 Evaluación experimental con borra de café.

### 5.2.1 *Pretratamiento de la borra de café.*

El material borra de café fue pretratado con NaOH al 2% en una concentración de sólidos del 20% (peso/volumen). El material fue previamente molido hasta un tamaño de partícula promedio de 1 mm, extractado con una solución de etanol: tolueno en una relación 2:1 y secado a 105°C hasta completa sequedad. Las condiciones de severidad del tratamiento de deslignificación fueron de temperatura 30°C y un tiempo de contacto de 6 horas.

El grado de remoción de lignina se cuantificó mediante la caracterización del material residual sólido después del tratamiento. la composición del material (en base seca) obtenida se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4. Composición de la borra de café después de pretratamiento alcalino.**

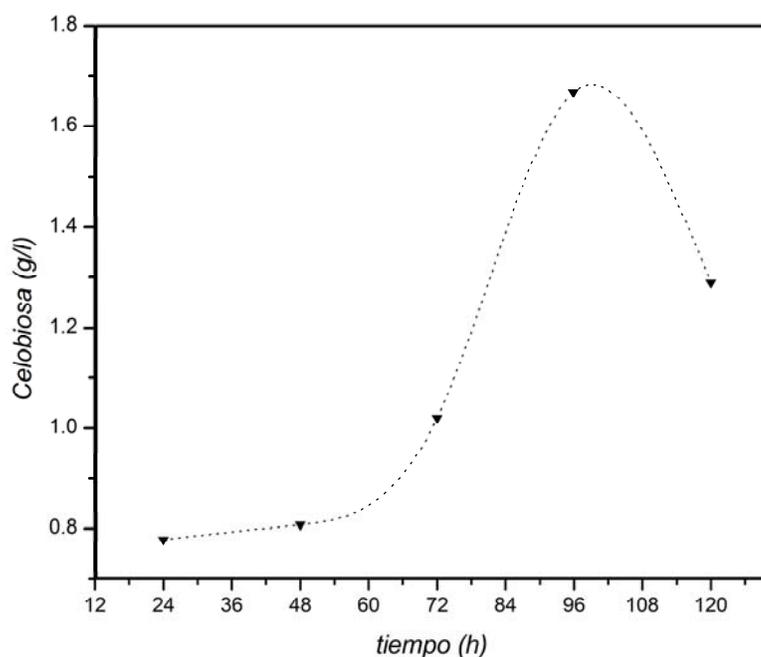
Componente	Composición (% peso/peso)
Celulosa	45.70 ± 0.67
Extractivos	29.77 ± 0.61
Lignina	Acido insoluble 21.73 ± 0.45
	Acido soluble 1.34 ± 0.011
Cenizas	0.30 ± 0.004

### 5.2.2 Hidrólisis de la borra de café.

La borra de café pretratada se sometió a hidrólisis (sacarificación) enzimática con celulasa y  $\beta$ -glucosidasa. Las condiciones de hidrólisis del material correspondieron a una 50 ml de volumen total en una relación de sólidos del 10% (peso/volumen), dosificación de enzima de 20 IFPU/g de celulosa en el material. (IFPU: Unidades internacionales de Papel Filtro), pH 5 regulado con búfer de citrato 0.05 M con agitación a 150 rpm durante un tiempo de 48 h.

La producción de azúcares reductores, cuantificada como celobiosa y monitoreada durante el tiempo de tratamiento se muestra en la fig. 12.

Como se muestra en la fig. 12, la producción de azúcares (celobiosa) como producto intermedio en la etapa hidrolítica de despolimerización de la celulosa mediante la acción conjunta de celulasa y  $\beta$ -glucosidasa se incrementa considerablemente a partir de las 72 h iniciales de proceso. Posteriormente, de acuerdo con el mecanismo de hidrólisis del complejo celulasa y  $\beta$ -glucosidasa la celobiosa es desdoblada finalmente a glucosa monomérica.



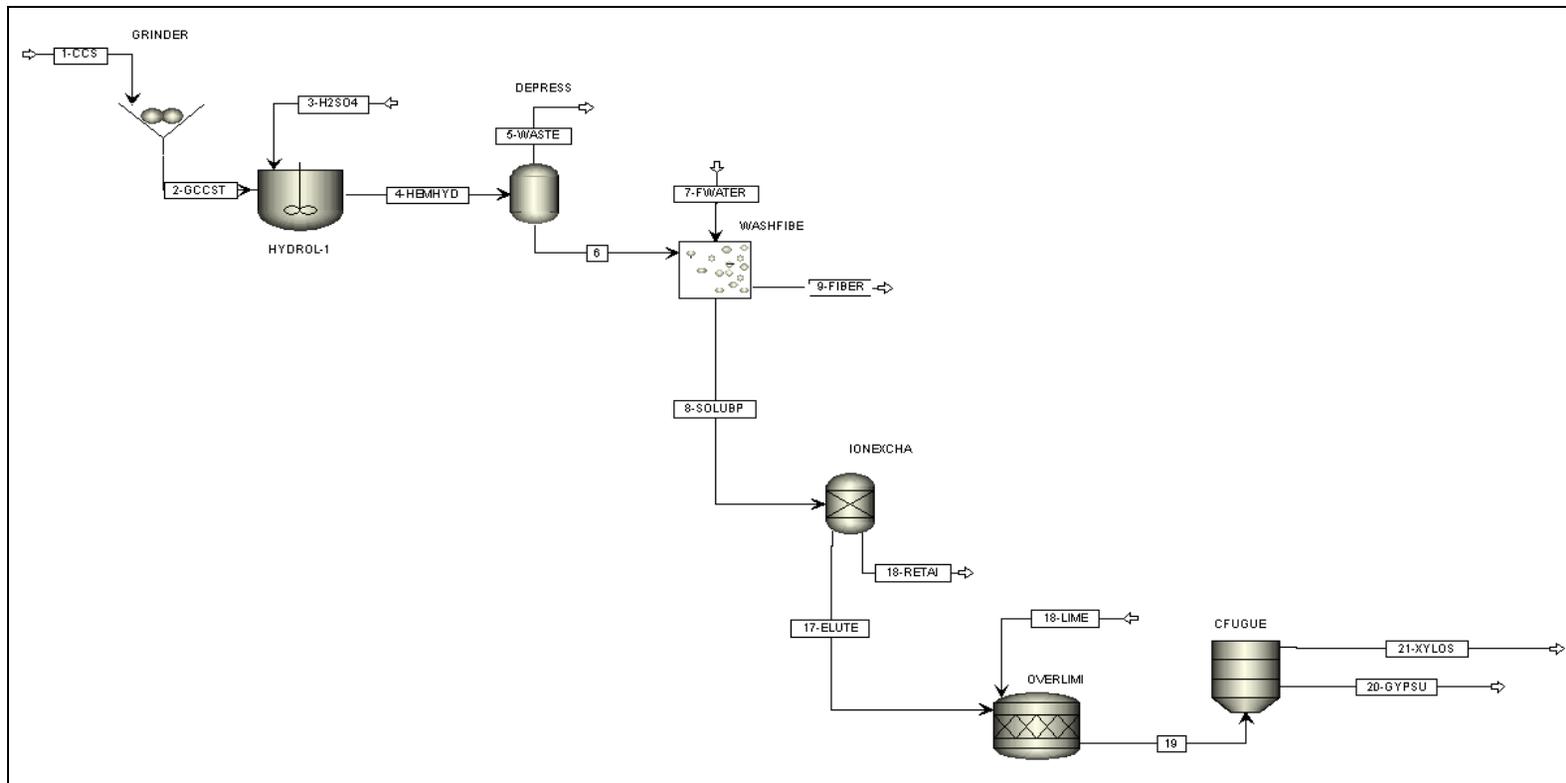
**Fig. 12.** Producción de azúcares reductores de la hidrólisis de borra de café.

### 5.3 Simulación del proceso con ácido diluido del material zoca de café.

Un proceso alternativo de producción de xilosa y glucosa a partir del tratamiento con  $H_2SO_4$  en dos etapas, pretratamiento de la hemicelulosa y posterior hidrólisis (sacarificación) de la celulosa, a partir de la composición de la zoca de café fue evaluado usando ASPEN PLUS.

#### 5.3.1 Etapa de pretratamiento

En la etapa de pretratamiento se llevó a cabo la hidrólisis del componente hemicelulósico presente en el material para la producción de xilosa por la acción de ácido en muy bajas concentraciones. La composición del material determinada experimentalmente fue empleada como información de base para evaluar la producción de glucosa y oligosacáridos intermedios a partir del pretratamiento con ácido diluido del material. El diagrama esquemático del proceso configurado para el pretratamiento de zoca de café se muestra en la fig. 13.



**Fig. 13.** Esquema del proceso de pretratamiento con ácido diluido ( $H_2SO_4$ ) al 0.1 % de zoca de café usando ASPEN PLUS.

Las unidades del esquema corresponden a GRINDER: molino de cuchillas. HYDROL1: reactor batch de pre-hidrólisis. WASHFIBE: unidad de lavado. IONEXCHA: unidad de intercambio iónico. OVERLIME: unidad de neutralización. CFUGUE: centrifuga. Las corrientes de proceso corresponden a CCS: Tallos de zoca de aprox. 20 cm de longitud. 2-CCST: zoca con tamaño de partícula de 3 mm. 3-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido diluido. 4-HBMHYD: hidrolizado de hemicelulosa (oligómeros y xilosas), celulosa, lignina e inertes. 5- WASTE: residuos de despresurización. 7-FWATER: agua de lavado. 9-FIBER: celulosa y lignina. 8-SOLUBP: componente soluble (hidrolizado de hemicelulosa). 17-ELUTE: material eludido (oligosácaridos, xilosas y ácido). 18-RETAI: retentato. 18-LIME: hidróxido de calcio de neutralización. 21-XILOS: xilosas. 20-GYPSUN: residuo GYPSU de neutralización (CaSO<sub>4</sub>).

En la tabla 5 se encuentran las condiciones establecidas para el pretratamiento.

**Tabla 5. Condiciones iniciales establecidas para el pretratamiento de hidrolisis**

<i>Temperatura</i>	160°C
<i>Presión</i>	3 atm.
<i>Concentración de sólidos</i>	10% (peso/peso)
<i>Concentración de ácido</i>	0.1% (peso/peso)
<i>Tiempo de contacto</i>	10 min
<i>Régimen de operación</i>	Lotes
<i>Base de cálculo</i>	30 kg/h

En la tabla 6 se muestra la composición de la materia prima que fue empleada en la simulación correspondiente a un total de sólidos de 100%.

**Tabla 6. Composiciones iniciales establecidas para pretratamiento de hidrolisis**

<i>Componente</i>	<i>Composición (% peso base húmeda)</i>
<i>Celulosa + Hemicelulosa</i>	41.6
<i>Extractivos</i>	1.622
<i>Cenizas</i>	0.883
<i>Lignina</i>	49.133
<i>Celulosa</i>	27.995
<i>Proteína</i>	4.426
<i>Agua</i>	4.00
<i>Hemicelulosa</i>	11.981

El total del contenido de hemicelulosa en la composición original del material (tabla 6) fue considerado como la conformación de los oligosacaridos xilano, arabinano, manano, galactano y glucano distribuidos composicionalmente de acuerdo a lo ampliamente reportado en estudios de pretratamiento de materiales análogos composicionalmente a la zoca de café (Esteghlalian *et al.*, 1997). En nuestro estudio, se consideró la fracción de xilano original como la suma de dos fracciones independientes: xilano de rápida velocidad de despolimerización (denominada xilano rápida) y una fracción de xilano de lenta velocidad de hidrólisis (referida como xilano lenta). Esta consideración resulta más realística en el estudio de formación de xilosa a partir de materiales lignocelulósicos pretratados con acido diluido, debido al hecho de que es evidente la formación de productos de degradación de xilosa a partir de ciertas condiciones de severidad. La tabla 7 muestra la composición de oligosacaridos presentes inicialmente en el material zoca de café calculados a partir de la composición hemicelulósica original del material.

**Tabla 7. Composición del contenido de hemicelulosa en el material**

Componente	Composición (% peso base húmeda)
Xilano	10.783
Arabinano	0.300
Manano	0.300
Galactano	0.300
Glucano	0.300

Para la evaluación del proceso de pretratamiento de la zoca de café con acido diluido se emplearon las expresiones cinéticas obtenidas experimentalmente en similares condiciones de severidad empleadas en el presente estudio y correspondientes a materiales con composición análoga a la encontrada para la zoca de café. Estas expresiones ampliamente reportadas (Saeman, 1945; Chiang *et al.*, 2008) son de tipo Arrhenius (Ec. 1).

$$K = A_0 C_a^n e^{-E/RT} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Las constantes cinéticas seleccionadas para las expresiones de hidrólisis de ambas fracciones de xilano a xilosa y la degradación de xilano a furfural correspondieron a las obtenidas para el material de referencia seleccionado (álamo) sometido a pretratamiento con ácido diluido a 0.1% durante 10 min (Esteghlalian *et al.*, 1997). La tabla 8 muestra los valores de las constantes cinéticas para cada una de las reacciones involucradas en el proceso de pretratamiento de zoca de café.

**Tabla 8. Valores de las constantes cinéticas utilizadas.**

<i>Reacción</i>	<i>A<sub>0</sub></i> ( <i>s<sup>-1</sup></i> )	<i>C<sub>a</sub></i> ( <i>g ácido / g masa total</i> )	<i>n</i>	<i>E</i> ( <i>KJ/Kmol</i> )
Xilano rápida	3.34045 e18	0,000909091	0.4	176700
Xilano lenta	1.50756 e16	0,000909091	1.5	192000
Xilano a furfural	1.8057e9	0,000909091	0.55	102000

*C<sub>a</sub>*: concentración de ácido. *E*: energía de activación. *n*: factor exponencial.

Los resultados obtenidos de la simulación de pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido en las condiciones establecidas, empleando zoca de café como materia prima se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9. Composición másica de las corrientes involucradas en la etapa de pretratamiento de zoca de café.**

Corriente	Materia prima	Ácido usado	Producto pretratado Ácido	Agua usada	Fibra	Hidróxido de calcio	Producto neutralizado	Sulfato de calcio	Xilosa detoxificada
Nombre de la corriente	1-CCS	3-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4-HEMHYD	7-FWATER	9.FIBER	18-LIME	19	20-GYPSU	21-XYLOS
Temperat. (°C)	20	20	160	20	99.1	20	25	25	25
Presión (bar)	1.013	1.013	3.04	2.6	27.163	1.013	1.013	1.013	1.013
Flujo másico kg/h	30	300	330	2.6	266.001	0.225	266.065	0.414	265.65
<b>Fracción másica</b>									
Agua	0.0400	0.9990	0.9109	1.0000	0.0893		0.9825	0.0072	0.9840
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.0010	0.0009		0.0001				
Ca(OH) <sub>2</sub>						1.0000			
Proteína	0.0443		0.0040		0.0004		0.0049		0.0050
Celulosa	0.2795		0.0254		0.3088				
Xilano	0.1078		0.0033		0.0402				
Lignina	0.4913		0.0447		0.5426				
Glucosa			0.0001				0.0001		0.0001
Xilosa			0.0074		0.0008		0.0091		0.0091
Extractivos	0.0162		0.0015		0.0001		0.0018		0.0018
CaSO <sub>4</sub>							0.0015	0.9928	
Arabinano	0.0030		0.0001		0.0011				
Manano	0.0030		0.0002		0.0022				
Galactano	0.0030		0.0002		0.0022				
Glucano	0.0030		0.0002		0.0022				
Arabinosa			0.0002						
Manosa			0.0001						
Galactosa			0.0001						
Cenizas	0.0088		0.0008		0.0098				

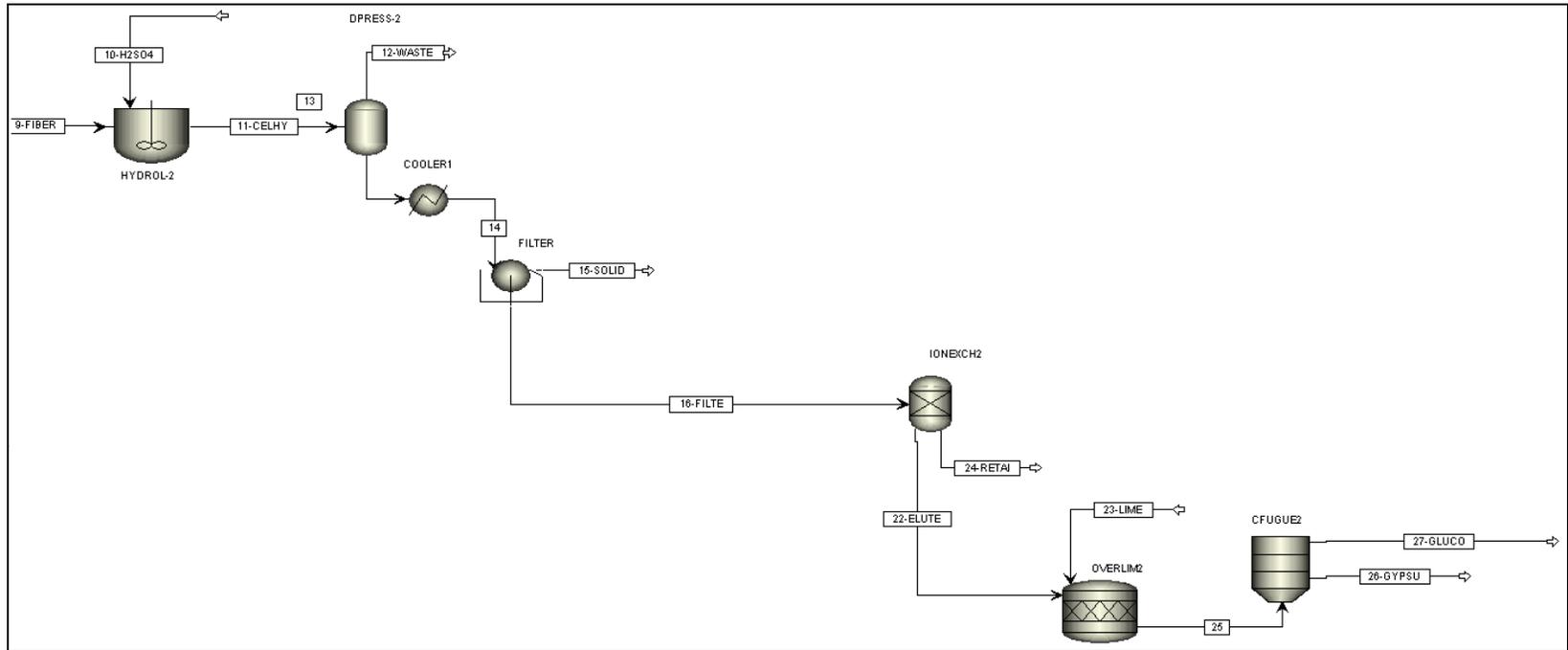
### 5.3.2 Etapa de hidrólisis de celulosa

La segunda etapa del tratamiento de la zoca de café para la producción de glucosa consistió en la sacarificación de celulosa empleando  $H_2SO_4$  en una concentración mayor que la empleada en la primera etapa (pretratamiento de la hemicelulosa). Las condiciones de operación especificadas para la evaluación del proceso hidrolítico de la celulosa producida en la etapa de pretratamiento se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10. Condiciones iniciales establecidas para la hidrólisis de celulosa**

<i>Temperatura</i>	200°C
<i>Presión</i>	1 atm.
<i>Concentración de sólidos</i>	10% (peso/peso)
<i>Concentración de ácido</i>	0.4% (peso/peso)
<i>Tiempo de contacto</i>	3 min
<i>Régimen de operación</i>	Lotes
<i>Base de cálculo</i>	30 kg/h

La etapa hidrolítica fue configurada para recibir la corriente de sólidos efluente de la etapa previa de pretratamiento del material, con el objeto de favorecer la conversión de la celulosa en las nuevas condiciones de severidad de hidrólisis y evitar la transformación de los azúcares (xilosas) producidos en el hidrolizado de hemicelulosa, los cuales deben ser separados de la fracción sólida previo a la hidrólisis. El esquema del proceso de hidrólisis de la celulosa en la fracción sólida (celulosa y lignina), efluente del pretratamiento, se muestra en la fig. 14.



**Fig. 14.** Esquema del proceso de hidrólisis de celulosa con ácido diluido ( $H_2SO_4$ ) al 0.4 % del componente sólido efluente del pretratamiento de zoca de café simulado en ASPEN PLUS.

Las unidades del esquema corresponden a HYDROL-2: reactor batch de hidrólisis. D PRESS-2: unidad de despresurizado. COOLER-1: intercambiador. FILTER: filtro de retención de sólidos. IONEXCH2: resina de intercambio. OVERLIME2: unidad de neutralización. CFUGUE2: centrifuga. Las corrientes de proceso corresponden a 9-FIBER: corriente de sólidos (celulosa y lignina). 10- $H_2SO_4$ : ácido diluido al 0.4%. 11- CELHY: mezcla de sólidos e hidrolizado. 12-WASTE: corriente de residuo y fracción perdida de HMF (hidroximetilfurfural). 15-SOLID: componentes sólidos separados. 16-FILTE: hidrolizado separado de fracción solida residual. 24-RETAI: fracción retenida por afinidad anionica/cationica. 22-ELUTE: hidrolizado enriquecido en glucosa. 23-LIME: hidróxido de calcio de neutralización. 26-GYPSU:  $CaSO_4$  de residuo. 27-GLUCO: corriente de glucosa como producto.

De manera análoga a la etapa de pretratamiento, la simulación del proceso hidrolítico del componente celulósico proveniente del pretratamiento de la zoca de café se realizó empleando las expresiones cinéticas de tipo Arrhenius, obtenidas en condiciones de severidad hidrolítica correspondientes a concentración de ácido alrededor de 0.4%, temperatura de 200°C y tiempos entre 1.5 y 3 min (Saeman, 1945; Esteghlalian *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 2008). La etapa hidrolítica de celulosa tiene como productos a la glucosa y su producto de degradación HMF (hidroximetilfurfural) cuando se ha producido la glucosa y esta sigue en contacto con ácido durante tiempos más prolongados. Los parámetros de la constante cinética seleccionada para la expresión de hidrólisis de celulosa a glucosa y la degradación de glucosa a HMF se especifican en la tabla 11.

**Tabla 11. Valores de los parámetros cinéticos utilizados.**

<i>Reacción</i>	<i>Ao</i> ( <i>s<sup>-1</sup></i> )	<i>Ca</i> ( <i>g ácido / g masa total</i> )	<i>n</i>	<i>E</i> ( <i>KJ/Kmol</i> )
Celulosa a Glucosa	1.54e18	3.636363	1.3	179509
Glucosa a HMF	2.10e12	3.636363	1.02	135340

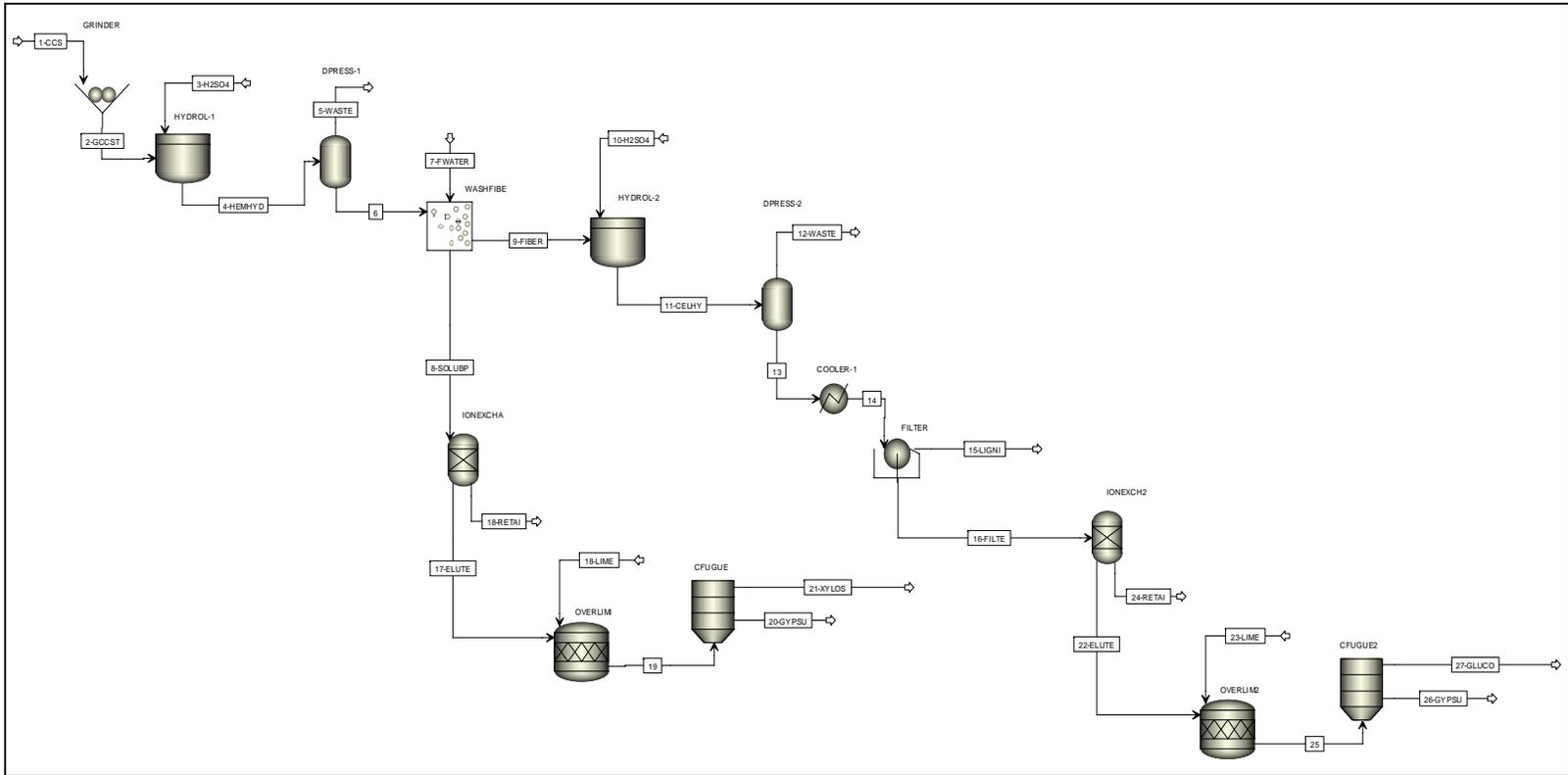
*Ca*: concentración de ácido. *E*: energía de activación, *n*: factor exponencial.

Los resultados obtenidos de la simulación de pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido al 0.4% en las condiciones establecidas, empleando la fracción sólida del pretratamiento de zoca de café, se muestran en la tabla 12. En la tabla se especifica la composición másica de cada uno de los componentes presentes en las corrientes del esquema configurado.

La configuración integral de los esquemas secuenciales del pretratamiento del componente hemicelulósico e hidrólisis de celulosa para el material zoca de café se muestra en la fig. 15.

**Tabla 12. Composición másica de las corrientes involucradas en la etapa de hidrolítica del componente celulósico.**

Corriente	Ácido usado	Producto obtenido	Lignina después de filtrar	Filtrado obtenido	Hidróxido de calcio para neutralizar	Producto neutralizado	Glucosa	Sulfato de calcio
<b>Nombre de la corriente</b>	<b>10-H2SO4</b>	<b>11-CELHY</b>	<b>15-LIGNI</b>	<b>16-FILTE</b>	<b>23-LIME</b>	<b>25</b>	<b>27-GLUCO</b>	<b>26- GYPSU</b>
Temperatura °C	20	200	40	40	20	25	25	25
Presión (bar)	1.013	3.04	1.013	1.013	1.013	1.013	1.013	1.013
Flujo másico (kg/h)	272	299.162	17.724	217.383	0.82	217.221	215.712	1.508
<b>Fracción másica</b>								
Agua	0.9960	0.9122	0.0469	0.9568		0.9593	0.9660	0.0013
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0040	0.0036	0.0002	0.0050				
Ca(OH) <sub>2</sub>					1.0000			
Proteína				0.0001		0.0001	0.0001	
Celulosa		0.0018	0.0309					
Xilano		0.0037	0.0617					
Lignina		0.0493	0.8316					
Glucosa		0.0245	0.0016	0.0335		0.0336	0.0338	
Xilosa		0.0001		0.0001		0.0001	0.0001	
Furfural								
HMF		0.0032	0.0002	0.0045				
CaSO <sub>4</sub>						0.0069		0.9987
Arabinano		0.0001	0.0017					
Manano		0.0002	0.0034					
Galactano		0.0002	0.0034					
Glucano		0.0002	0.0034					
Cenizas		0.0009	0.0150					



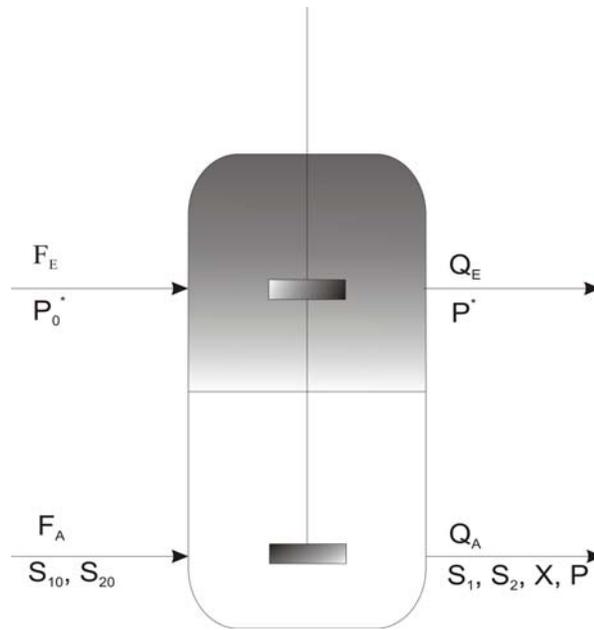
**Fig. 15.** Esquema del proceso de pretratamiento con ácido diluido ( $H_2SO_4$ ) de zoca de café en dos etapas: pre-hidrólisis de hemicelulosa  $H_2SO_4$  al 0.1% e hidrólisis de celulosa con  $H_2SO_4$  al 0.4%.

## 6 INTEGRACION DE LOS PROCESOS DE SACARIFICACION-FERMENTACION Y EXTRACCION

---

### 6.1 Fundamentos de la experimentación

El proceso simultáneo de sacarificación, fermentación y extracción de etanol a partir de zoca de café fue realizado teniendo como base la configuración del proceso de fermentación-extracción previamente estudiado por Sánchez *et al 2006a.*, en el grupo de investigación en Procesos Químicos Catalíticos y Biotecnológicos, mostrado en la fig. 16.



**Fig. 16.** Diagrama esquemático del proceso de fermentación extractiva

Las ecuaciones correspondientes en el modelamiento del sistema integrado de fermentación extracción corresponden a:

$$-Q_A X + V_A r_X = 0 \quad (2)$$

$$F_A S_{10} - Q_A S_1 - V_A r_{S1} = 0 \quad (3)$$

$$F_A S_{20} - Q_A S_2 - V_A r_{S2} = 0 \quad (4)$$

$$F_E P_0^* - Q_A P - Q_E P^* + V_A r_P = 0 \quad (5)$$

$$F_A + F_E - Q_A - Q_E = 0 \quad (6)$$

$$P^* = k_{Etanol}P \quad (7)$$

Estas ecuaciones de balance representan el proceso de fermentación extractiva, en las cuales  $r_X$  representa la velocidad de crecimiento celular (en  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ),  $r_{S1}$  y  $r_{S2}$  corresponden a las velocidades de consumo de glucosa y xilosa (en  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) y  $r_p$  es la velocidad de formación de etanol (en  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $X$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $P$  representan las concentraciones de células de biomasa, glucosa, xilosa y etanol en el efluente acuoso del birreactor (en  $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_0$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{20}$  y  $P_0$  corresponden a las concentraciones en la corriente acuosa de alimentación,  $P^*$  y  $P_0^*$  son las concentraciones de etanol en el efluente solvente y en las corrientes de alimentación de solvente, respectivamente.

Es importante anotar que la concentración de etanol en la fase solvente ( $P^*$ ) que está en equilibrio con la concentración de etanol en la fase acuosa se obtiene empleando el coeficiente de distribución  $k_{etanol}$ .

Sin embargo, para la realización de esta tesis, los procesos anteriormente descritos se sintetizaron de la siguiente manera:

## 6.2 Configuración experimental

### *Hidrólisis*

La hidrólisis se realizó con 212 g de zoca de café con humedad residual de 1.6% (peso/peso) y previamente deslignificada. La concentración de sólidos fue del 10% (en peso) en un volumen total de 4 litros. La dosificación de enzima celulolítica correspondió a 25 IFPU/g de celulosa presente en el material (zoca pretratada) y el pH fue regulado a 4.5 con búfer de citrato de sodio 0.1M. Las condiciones de hidrólisis fueron 37°C y agitación 150 rpm durante 44 h

### *Fermentación*

La fermentación del hidrolizado se realizó con un inóculo de *S. cerevisiae* en extracto de malta en una proporción de 10% (vol./vol.) en 4 litros de mezcla total. Las condiciones de

fermentación en la zona de fermentación del sistema correspondieron a aprox.  $34^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm durante 48 h.

### *Extracción*

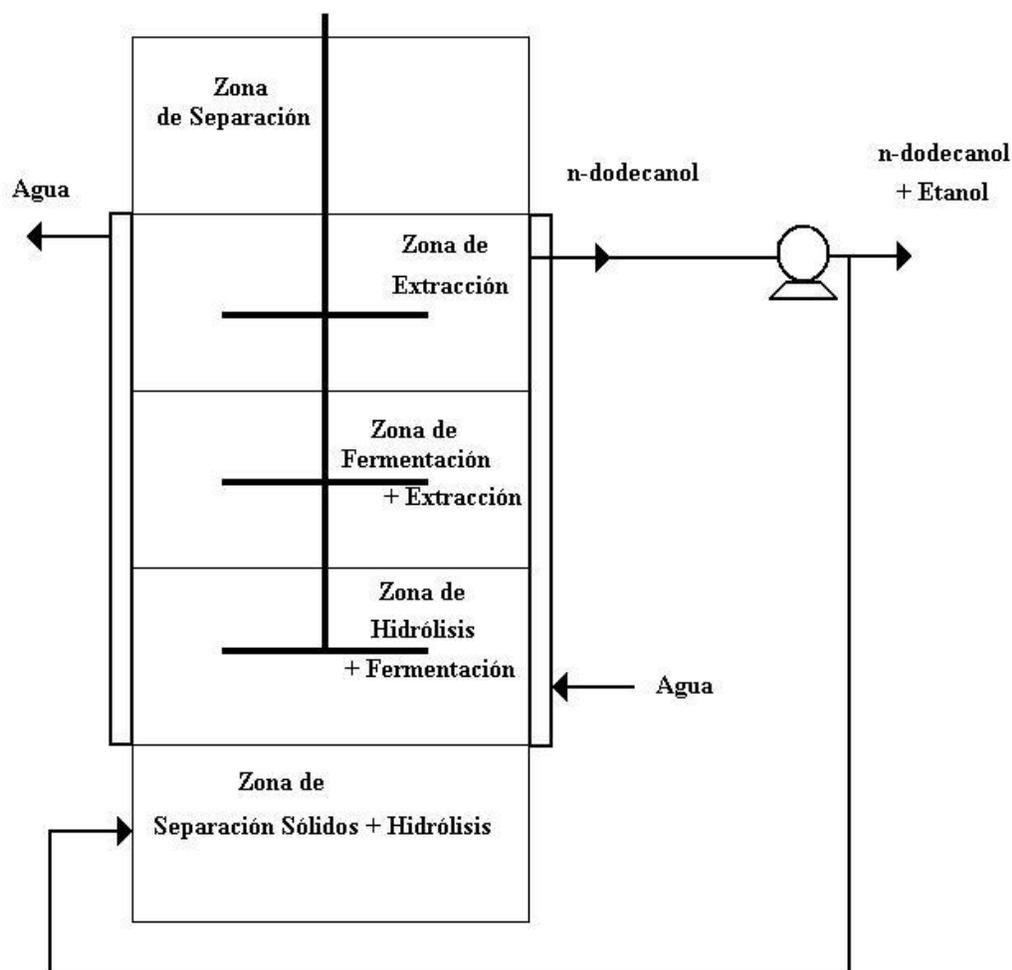
La fase extractiva correspondió a *n*-dodecanol en relación volumétrica con la fase acuosa de 1:4 en un volumen total de 5 litros, es decir, se adicionó 1 l de solvente en la mezcla total de hidrólisis de 4 litros. La fase extractiva se añadió luego de 10 h de operado el proceso simultaneo de sacarificación y fermentación.

### *Descripción y justificación del esquema simultáneo evaluado*

El esquema simultáneo se evaluó en un equipo multi-etapas (cinco etapas) como se muestra en la fig. 17. El diagrama muestra también la distribución de las fases involucradas que se presentó en el sistema integrado.

Como se observa en el esquema del equipo, el solvente de extracción (*n*-dodecanol) fue recirculado desde la zona de extracción a la zona de separación por medio de un sistema de dos bombas peristálticas acopladas a un baño termostático que mantuvo la temperatura del solvente recirculado a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ . la recirculación del solvente de extracción favoreció el arrastre del etanol producido en las zonas inferiores del equipo, llevándolo a enriquecer la fase extractiva ubicada en la parte superior.

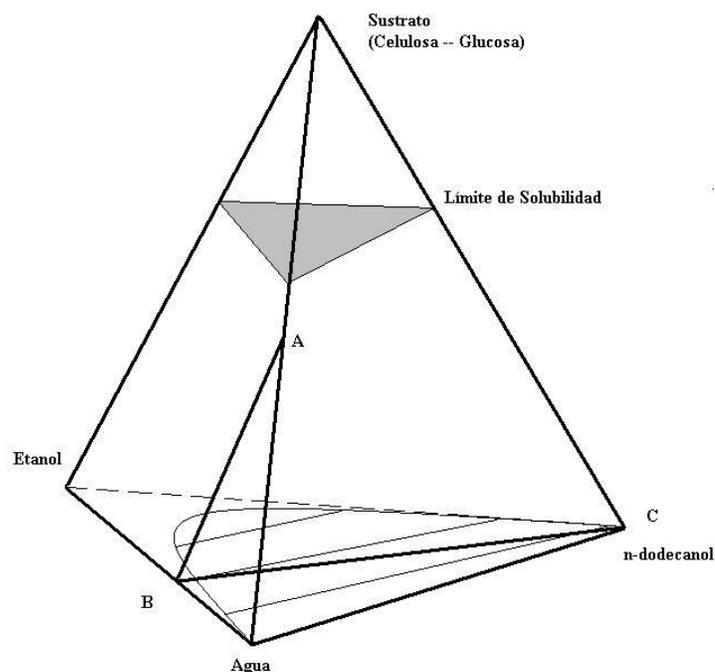
La recirculación del solvente (extracto enriquecido en etanol) se mezcló con la nueva alimentación pseudo-inicial que continuamente resulta en esta disposición de recirculación, redistribuyendo la fracción de *n*-dodecanol y favoreciendo la separación del etanol de la fase acuosa.



**Fig. 17.** Esquema del equipo multi-etapas empleado en el proceso integrado sacarificación-fermentación y extracción de etanol a partir de zoca de café.

En la selección del equipo multi-etapas se consideró primordial la eficiente distribución de las fases involucradas en el proceso integrado de sacarificación-fermentación-extracción. Por su parte, la definición de los flujos de alimentación se basó en el análisis termodinámico-topológico del equilibrio líquido-líquido y las reacciones involucradas para el sistema presente en el proceso integrado etanol, agua, *n*-dodecanol y sustrato (correspondiente al producto glucosa proveniente de la hidrólisis de la celulosa) como muestra la fig. 18. La disminución de la dimensión del simplex concentracional al utilizar el

concepto de sustrato como un sistema unitario que representa el continuo consumo de celulosa para convertirse de manera constante en alcohol, es necesario para evitar el uso de un pentatopo resultaría de gran complejidad para futuros análisis. Esta aproximación no representa reducción alguna en la exactitud pues para el avance del proceso de hidrólisis o fermentación significa dos casos extremos: Si la hidrólisis procede completamente el sustrato final a tener en cuenta en el tetraedro de la fig. 18 es solamente glucosa. Si por el contrario la hidrólisis no procediese, el sustrato de dicha figura corresponde directamente a celulosa y el proceso total de SFES no existiría y por lo tanto no habría ningún análisis a realizar. Esto entonces permite establecer que en cualquier momento del proceso si existe todavía fuerza guía de la hidrólisis y la fermentación la esquina “sustrato” de la figura 18 siempre será una mezcla de celulosa y glucosa cuya composición varía a través del tiempo entre los extremos anteriormente citados. No obstante de esta mezcla el componente principal siempre será la glucosa, al ser el sustrato principal de la Fermentación. El n-dodecanol y el agua prácticamente forman una mezcla inmiscible la cual se extiende a todo el tetraedro generando un plano que lo limita el punto máximo de no solubilidad que tiene toda la mezcla. De tal manera si se parte de una mezcla bioreaccionante que contendrá glucosa y agua (punto A) a través de la fermentación llegaremos al punto B que corresponde al caso hipotético de una fermentación completa (que es válido para una cantidad infinitesimal de mezcla). Apenas se origina entonces la mezcla binaria etanol – agua, esta se mezcla con el n-dodecanol para obtenerse un ternario que se separa por una línea de reparto en refinado que tendera hacia abajo (fase acuosa) y extracto que tiende hacia arriba (fase orgánica). Como se observa de la fig. 18 no es necesario agregar grandes cantidades de n-dodecanol para lograr el efecto buscado. Esto es compensado por el hecho de que el arreglo experimental involucró la recirculación de la fase enriquecida en n-dodecanol con el fin de lograr un mejor mezclado en la zona de separación de sólidos y distribuir mejor el solvente entre las etapas para que arrastrase la mayor cantidad de etanol.



**Fig. 18.** Equilibrio líquido-líquido del sistema etanol, *n*-dodecanol, agua y glucosa.

### 6.2.1 Seguimiento de las variables del proceso integrado

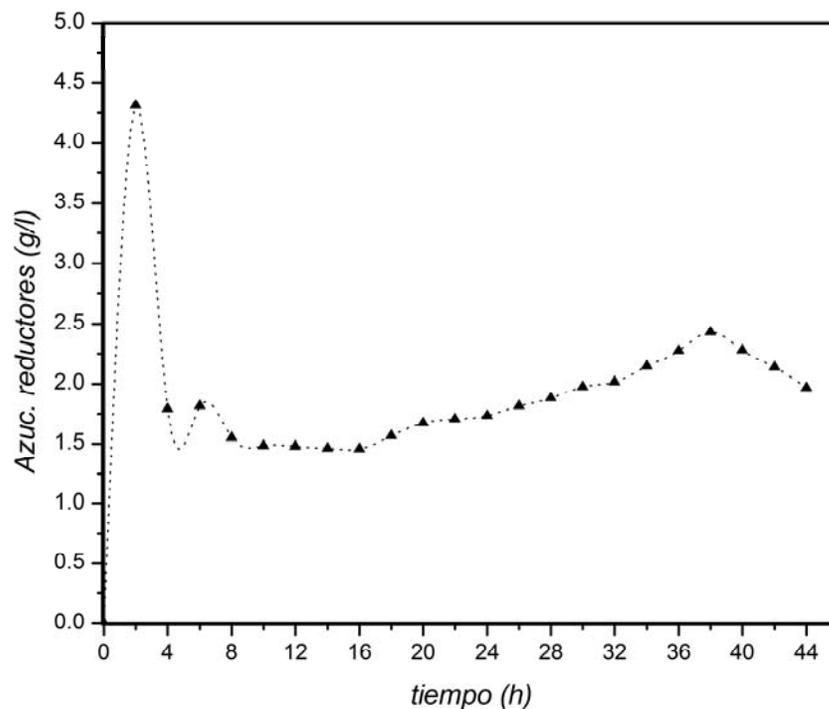
El seguimiento del proceso integrado de sacarificación-fermentación-extracción de etanol a partir de zoca de café se monitoreó durante 44 h en la producción de azúcares reductores y etanol. Dos muestras se tomaron periódicamente cada 2 h, una muestra de 1 ml se tomó de la zona de extracción (solvente) y otra de igual volumen se tomó de la zona de hidrólisis y fermentación (fase acuosa). A la muestra extraída de la fase extractiva se le analizó el contenido de etanol a partir de la curva de calibración previamente obtenida que relacionó el índice de refracción (IR) y la concentración de etanol a 37°C.

A la muestra extraída de la fase acuosa se le determinó la concentración de azúcares reductores mediante espectrofotometría a 540 nm, a partir de la curva de referencia que relacionó absorbancia a 540 nm y concentración de glucosa.

### 6.2.1.1 Comportamiento de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores durante el tiempo de tratamiento del proceso integrado para las muestras obtenidas en la etapa 2 (fase acuosa predominante) se muestra en la fig. 19. La concentración de glucosa en el tiempo cero fue corregida por la presencia de fuentes de carbono en el extracto de malta suplementado para el crecimiento y etapa inicial de adaptación del inóculo.

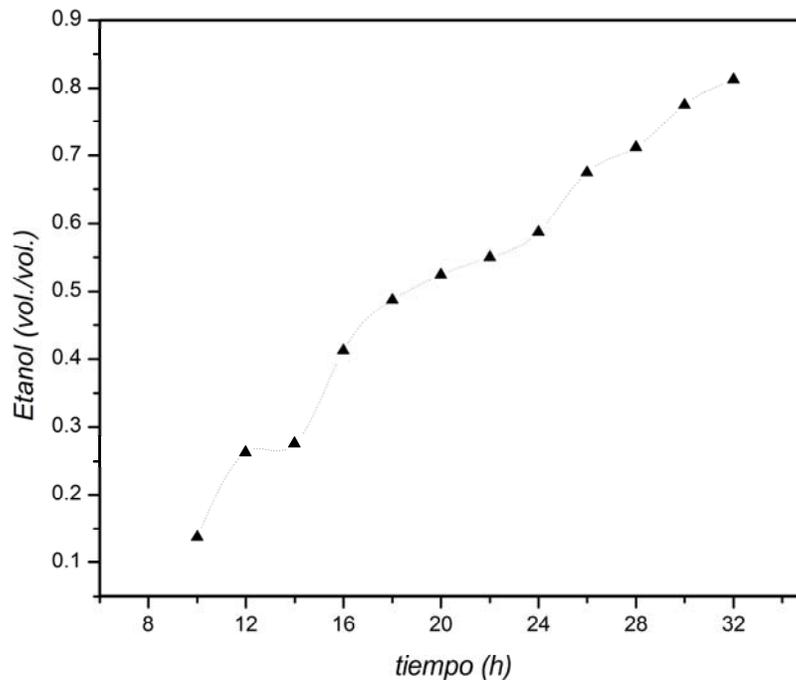
Como muestra la fig. 19, la máxima concentración de azúcares reductores se presentó a las 2 horas de inicio de la operación integrada. La figura muestra un descenso importante a partir de este punto hasta un valor mínimo de concentración cercano a 1.5 g/l a las 10 horas de tiempo de proceso. Igualmente, se observa un leve incremento en la concentración de azúcares pero de una manera marginal si se compara con el obtenido a las 2 h (máximo).



**Fig. 19.** Perfil de concentración de azúcares reductores

### 6.2.1.2 Comportamiento de la producción de etanol

La producción de etanol en el sistema integrado se observa en la fig. 20 para las muestras obtenidas en la etapa 4 (fase orgánica predominante) donde se desarrolla la extracción del alcohol. El perfil obtenido debe observarse como el enriquecimiento de la fase extractiva (*n*-dodecanol) que migra desde la etapa hidrolítica-fermentativa por acción de la configuración de recirculación establecida para el esquema experimental empleado. El perfil inicia en 10 h debido al hecho de que experimentalmente se eligió incluir el solvente a partir de 10 h de iniciada la etapa hidrolítica con el objeto de favorecer el sistema sacarificación-fermentación simultánea y evitar un efecto negativo de la presencia de solvente con la enzima celulasa. Sin embargo como era de esperarse, se observa que antes de las 10 h se ha producido etanol.



**Fig. 20.** Perfil de concentración de etanol en la fase extractiva (*n*-dodecanol).

Los resultados observados en la concentración de etanol en el solvente de extracción muestran que la migración de etanol al *n*-dodecanol se realiza de manera simultánea a

medida que la etapa hidrolítica produce azúcares e inmediatamente el microorganismo fermentativo los transforma a etanol. También resultó conveniente la relación de solvente a fase acuosa en el sistema experimental estudiado, puesto que se esperaba que a altas relaciones de solvente se presenten dificultades de mezclado en el sistema e impida una óptima recirculación del solvente desde la zona extractiva hasta la zona de separación de sólidos e hidrolítica, impidiendo un arrastre efectivo del etanol que se debe producirse en las zonas inmediatamente inferiores a la zona superior donde se ubica el solvente.

## 7 CONCLUSIONES

---

Los materiales lignocelulósicos residuales zoca de café y aserrín de pino *Pátula* propios de la región de Caldas fueron estudiados tanto estructural como químicamente. La conformación estructural de ambos materiales evidenció una estrecha asociación con los componentes lignina y celulosa. La presencia de lignina en los materiales se observó como una zona altamente amorfa en los patrones de difracción. Por su parte, la celulosa mostró un patrón claro e inconfundible con respecto a la celulosa empleada como patrón de referencia en los análisis estructurales. La borra de café que de manera adicional fue estudiada y que como material de referencia tiene composición conocida, sirvió también de base para establecer la relación de los componentes constitutivos del material previo a la caracterización química.

La composición química determinada para los materiales de estudio fue similar en cuanto al contenido de celulosa, estableciendo a partir de esto, que ambos materiales tienen alto potencial celulósico disponible y aprovechable. Sin embargo, la zoca de café presentó cerca del 5% en peso más contenido celulósico con respecto al aserrín. Como se pudo deducir, un mayor contenido de celulosa en el material, está generalmente asociado a un menor contenido de lignina. Este hecho resulta de gran importancia al momento de decidir en un método efectivo de deslignificación ya que a menores contenidos de lignina es posible deslignificar casi completamente el material con grados de severidad menores a los comúnmente empleados. Por otro lado, es ampliamente documentado el efecto inhibitorio que tiene la lignina residual en los procesos fermentativos y de digestibilidad en la hidrólisis enzimática.

El pretratamiento alcalino, seleccionado para deslignificar la zoca de café previo a la hidrólisis en el proceso integrado, resultó bastante efectivo con respecto a la remoción selectiva de lignina del material (alrededor del 95% de remoción). Igualmente, se obtuvo una remoción cercana al 90% de la lignina original con un grado de severidad menor para el mismo material, aunque el tiempo de contacto fue de 24 h.

La simulación de un procedimiento de pretratamiento e hidrólisis de la zoca (material análogo en composición al aserrín de Pino Pátula), resultó de gran utilidad para identificar parámetros de severidad que pueden ser seleccionados para obtener corrientes efluentes de hidrolizado con mayor fracción másica de xilosa y solo trazas de componentes tóxicos o indeseables como el furfural en el caso de la pre-hidrólisis y HMF en el caso de la hidrólisis celulolítica. Por su parte, los modelos cinéticos empleados en la simulación presentan una amplia flexibilidad en cuanto al establecimiento de los parámetros de severidad; lo que se refleja en un margen amplio de condiciones que pueden ser evaluadas para optimizar los tiempos de contacto, las concentraciones de ácido y los gastos energéticos con las variaciones de temperaturas. En el caso particular de las condiciones establecidas para esta tesis, se observa que 3 minutos de tiempo de contacto a 200°C y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.4% se obtiene una fracción superior al 6% de glucosa y solo trazas de furfural.

Por último, la evaluación experimental del proceso integrado de sacarificación-fermentación-extracción de etanol mostró una alta estabilidad operativa en las condiciones establecidas en el estudio de simulación (Cardona *et al.*, 2006.) que sirvió de base de esta tesis. Esto estuvo evidenciado en el comportamiento predictivo de las fases involucradas y los perfiles de las variables de seguimiento (azúcares reductores y etanol) obtenidos. Igualmente, el comportamiento de la producción de azúcares reductores estuvo estrechamente relacionado con otros trabajos experimentales como el realizado por Moritz *et al.* (1995) con otro solvente. Igualmente, se pudo evidenciar claramente que el n-dodecanol tiene gran biocompatibilidad con el microorganismo fermentativo empleado en esta tesis. Adicionalmente, se pudo observar un enriquecimiento de la fase solvente a medida que la sacarificación y fermentación prosiguen, llevando a concluir que este solvente actúa como un buen agente de extracción de etanol en procesos integrados de sacarificación-fermentación-extracción. Mediciones más tempranas en el seguimiento de etanol en la fase extractiva en el proceso integrado debe llevar a un mejor entendimiento de la acción del solvente en el sistema y a un mayor ajuste en el perfil de concentración.

## 8 RECOMENDACIONES

---

Emplear las metodologías empleadas en este estudio para otros materiales lignocelulósicos de interés en la región.

Evaluar pretratamientos como el alcalino para aprovechar el contenido aprovechable de celulosa del Aserrín de pino.

Evaluar experimentalmente el pretratamiento con  $H_2SO_4$  diluido de la Zoca de Café para validar o contrastar la información obtenida por simulación.

Evaluar el proceso SFES de etanol para materiales con mayor contenido de lignina para observar el efecto inhibitorio en el sistema.

Disminuir la relación de solvente para llegar establecer la relación óptima experimental para sustratos residuales locales.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. **Ana-Rita F D, Ian W D.** Pyrolysis of sugar cane bagasse in a wire mesh reactor. *Ind & EC Res* 35, pages 1263–1268, 1996.
2. **Agudelo, R. A.** Obtención de etanol a partir de la borra de café. Tesis de pregrado Ingeniero Químico. Manizales (Caldas). Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 2002. 121 p.
3. **Aguilar R. et al.** Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*. pages 309-318, 2002.
4. **Akpinar O., Erdogan K. and Bostanci S.** Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research*, pages 660-666, 2009.
5. **Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Cabañas, A.; Carrasco, J. C.; Martín, C.; Negro, M. J.; Saez, F.; Saez, R.** Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29: 307-315, 1991.
6. **Ballesteros, I.; Oliva, j. M.; Ballesteros, M.; Carrasco, J. C.** Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnolog*, 39/40: 201-211, 1993.
7. **Cardona C., Marulanda V. and Young D.** Analysis of the environmental impact of butylacetate process through the WAR algorithm, *Chemical Engineering Science*, Vol. 59, pages 5839-5845, 2004.
8. **Cardona, C., Sánchez, O.** Analysis of integrated flow sheets for biotechnological production of fuel ethanol. *In: PRES 16th international congress of chemical and process engineering*, Prague, Czech Republic, 2004.

9. **Cardona, C. A., Sánchez, O. J.** Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy* 31 (13), 2447- 2459, 2006.
10. **Cardona, C.A., Sánchez, O.J., Montoya, M.I., Quintero, J.A.** Analysis of fuel ethanol production processes using lignocellulosic biomass and starch as feedstocks. *In: Seventh World Congress of Chemical Engineering, Glasgow (Scotland), 2005.*
11. **Carrasco F. y Roy C.** Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xilan-containing biomass, *Wood Science and Technology*, Vol. 26, pages 189-208, 1992.
12. **Chandel A. [y otros]** Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Vol. 2, pages 014-032. February de 2007.
13. **Claassen PAM, van Lier JB, López Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA,** Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechno*, 52: 741-755, 1999.
14. **Duff S.** Ethanol from lignocellulosic, *Bioresource Technology*, pages 411-436, 1996.
15. **Duff, S.J.B.; Murray, W.D.** Bioconversion of forest products industry waste cellulotics to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 55: pages 1-33, 1996.
16. **Esteghlalian A. [y otros]** Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass, *Bioresource Technology*, - pages 129-136, 1997.
17. **Garrote G., Dominguez H. and Parajo J.** Kinetic modelling of corncob autohydrolysis, *Process Biochemistry*, Vol. 36, pages 571-578, 2001.

18. **Gutiérrez L.F., Sánchez O.J. and Cardona C.** 2005. Modelling of batch extractive fermentation for the fuel ethanol production. *In: Eighth Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction*, Giardini Naxos, Italy, 2005.
19. **Gyamerah M., Glover J.**, Production of ethanol by continuous fermentation and liquid–liquid extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol 66, 145–152. 1996.
20. **Han J. and Rowell J.** Chemical Composition of Fibers, Paper and Composites From Agro-based Resources. Boca Raton, FL : CRC Lewis Publishers, 1997.
21. **Harris J.** Two-stage, dilute sulfuric acid hydrolysis of wood: An investigation of fundamentals, Madison, WI : U.S. Department of Agriculture, Forest Service, *Forest Products Laboratory*, pages 1-74, 1985.
22. **Hendriks A.M., Zeeman G.** Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, (100):10–18, 2009.
23. **Jacobsen S. and Wyman C.** Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatments processes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (84-86): 81-96, 2000.
24. **Kollerup F. and Daugulis A.J.** Evaluation of solvents for extractive butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum* and the use of poly(propylene glycol). *Appl. Microbiol. and biotechnol.*, 36(5):632-639,1985.
25. **Kumar R. y Wyman C.** The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydrate Research*. pages 290-300, 2008.

26. **Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H. and Dale, B.** Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, pages 1081–1099, 2005.
27. **Lloyd T. and Wyman C.** Application of a depolymerization model for predicting thermochemical hydrolysis of hemicellulose. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* (105-108):53-67, 2003.
28. **Lynd L.** Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. *Annu. Rev. Energy Environ.*,(21):403-465, 1996.
29. **Lynd LR, Weimer PJ and Van Zyl WH.** Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Research*, 66: 506-577, 2002.
30. **Montoya M.I., Quintero J.A., Sánchez O.J. and Cardona C.A.** Effect of product separation scheme on biotechnological production of fuel ethanol. In: II Simposio Sobre Biofábricas. Avances de la Biotecnología en Colombia, Medellín, 2005.
31. **Morais P.B., Rosa C.A., Linardi V.R., Carazza F. and Nonato E.A.** Production of fuel alcohol by *Saccharomyces* strains from tropical habitats. *Biotechnology Letters*, 18(11):1351-1356, 1996.
32. **Mosier N., Wyman C. and Dale B.** Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96: 673-686, 2005.
33. **Okamoto T, Taguchi H, Nakamura K, Ikenaga H, Kuraishi H and Yamasato K.** *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting *Peritrichous* bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol.*, 21:333–337, 1993.

34. **Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B.** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.*, 74: 17-24, 2000a.
35. **Palmqvist E and Hahn-Hägerdal B.** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.*, 74: 25-33, 2000b.
36. **Philippidis G.P., Hatzis C.** Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. *Biotechnology Progress*, 13: 222-231, 1997.
37. **Philippidis GP, Smith TK.** Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 51/52:117–124, 1995.
38. **Prasad S., Singh A. and Joshi H.** Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation & Recycling*, pages 1-39, 2007.
39. **Rajeev K. and Wyman C.** The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydrate Research.*,343: 290-300, 2008.
40. **ResearchWikis** Coffee Marketing Research [En línea] // ResearchWikis. February 2009. [http://www.researchwikis.com/Coffee\\_Marketing\\_Research](http://www.researchwikis.com/Coffee_Marketing_Research).
41. **Saha B.C.** Hemicellulose bioconversion. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 279–291, 2003.
42. **Sánchez O.J. and Cardona C.A.** Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(11): 671-678, 2005.

43. **Sánchez O. J, Cardona C.A. and Cubides D.C.** Modelling of simultaneous saccharification and fermentation process coupled with pervaporation for fuel ethanol production. *In: Second Mercosur Congress on Chemical Engineering and Fourth Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Rio de Janeiro, Brazil, 2005.*
44. **Sánchez O.J., Gutiérrez L.F., Cardona C.A. and Fraga, E.S.** Analysis of extractive fermentation process for ethanol production using a rigorous model and a short-cut method. *In: Computer Aided Methods in Optimal Design and Operations. Series on Computers and Operations Research, Vol. 7. World Scientific Publishing Co, pp. 207.216. 2006a.*
45. **Sánchez O. J., Fraga E. S. and Cardona C. A.** Process synthesis for fuel ethanol production from lignocellulosic biomass using an optimization-based strategy. *In: World Renewable Energy Congress IX and Exhibition, Florence, Italy, 2006b.*
46. **Saxena A, Garg SK and Verma J.** Simultaneous saccharification and fermentation of waste newspaper to ethanol. *Bioresource Technology, 39: 13–15, 1992.*
47. **SECEX.** Centro de Estudios CEPAL. Análisis Económico y de Factibilidad de la Producción Global de Etanol, 2006.
48. **Sivers M., Zacchi, G.** Ethanol from lignocellulosics: A review of the economy. *Bioresource Technology, 56: 131-140. 1996.*
49. **Skotnicki M, Warr R, Goodman A, Lee KJ and Rogers PL.** High-productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. *Biochem Soc Symp 19: 53–86, 1982.*
50. **Starzak M., Krzystek L., Nowicki L., Michalski H.** Macroapproach kinetics of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: experimental studies and mathematical modelling. *Chemical Engineering Journal, 54: 221-240. 1994.*

51. **Sivers M. y Zacchi G.** Ethanol from lignocellulosic: a review of the economy. *Bioresource Technology*, 56: 131-140, 1996.
52. **Sun Y, Cheng J.** Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1–11, 2002.
53. **Taherzadeh M. and Karimi K.** Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 1621-1651, 2008.
54. **Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI)**, T 211 om-83 standard. Ash in Wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525. 1993.
55. **Wyman C.** Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annu. Rev. Energy Environ.*, 24: 189-226, 1999.
56. **Yang B. and Wyman C.** Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. *Bioresource Technology*, pages 5756-5762, 2008.
57. **Yang B. and Wyman C.** Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2: 26-40, 2008.
58. **Yat S., Berger A. and Shonnard D.** Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource Technology*, pages 3855-3863, 2008.
59. **Zhang Y and Lynd L.R.** Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol. Bioengineering*. 8: 797-882, 2004.
60. **Zhao H.** Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*. 68:235-241, 2007.

61. **Zheng Y., Lin, H.M., Tsao, G.T.** Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Progress.* 14: 890–896, 1998.

THE NATIONAL UNIVERSITY OF COLOMBIA DISSERTATIONS FROM THE GRADUATE PROGRAMME IN  
CHEMICAL ENGINEERING



**THE NATIONAL UNIVERSITY OF**  
**COLOMBIA**

FACULTY OF ENGINEERING

Experimental Evaluation of Simultaneous Saccharification,  
Fermentation and Ethanol Extraction (*SSF*)  
of Lignocellulosic Material

BY

ROBERTO AGUDELO

76 pp. *System Number* 44454  
2009

In this study two local lignocellulosic by-products referred to as *coffee cut-stems* and *Pinus sawdust* (from variety *Pátula*) were structural and chemically analyzed with the aim of identifying their cellulosic contents as potential feedstock for ethanol production. Additionally, an effective alkali pretreatment for the enriched cellulose material was established to be used for lignin removal before carrying out the ethanol production by simultaneous saccharification, fermentation and extraction process (*SSF*). The structural analysis was carried out using an X-ray diffractometer (Rigaku MiniFlex II), and the patterns were obtained in  $2\theta$  range between  $3.0$  and  $70^\circ$ . The pretreatment procedure was evaluated employing 2% sodium hydroxide as delignification agent at two severity levels,  $130^\circ\text{C}$  and 2 h of contact time (severity I), and  $25^\circ\text{C}$  during 24 h (severity II). In each case lignin removal was also verified by structural analysis and residual composition by analytical methods. Among the studied material *coffee cut-stems* had the highest cellulose content, which was further used as raw material for ethanol production. Alternatively, one of the most promising pretreatment process known as two-step dilute acid process was simulated using *Aspen Plus* software. The simulation procedure was carried out using experimental information gathered for *coffee cut-stems* and the change in the amount of xylan and glucan in the material with time were obtained by biphasic equations. A reliable model for hemicellulose hydrolysis reaction was included considering two fractions, one fast-hydrolyzing and one slow. Likewise, degrees of cellulose and hemicellulose depolymerization to its monomeric constituents were analyzed. In addition, the kinetic models took into consideration the undesirable formation of Furfural and HMF co-products from degradation of monosaccharides as pretreatment proceeds.

The experimental *SSF* configuration was carried out at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h in a five-stage reactor of 5 L of total volume which was specifically designed taking into account consideration of the *SSF* process. Reaction feed consisted by coffee-cut stems previously delignified, enzyme dosage of 25 IFPU/g, inoculum of commercial yeast and *n*-dodecanol as extracting solvent. Ethanol concentration in the aqueous and extracting phases, and reducing sugars in the aqueous phase were set up the main *SSF* process variables. The structural analysis of the materials showed strong cellulose content in association with lignin. Chemical distribution of the main components in the *coffee cut-stems* showed 32.32% cellulose, 13.8% hemicellulose, 1.69% extractives compounds, 46.7% total lignin (quantified as acid-soluble and acid-insoluble lignin), 4.61% total protein and minor ash content. On the other hand, *Pinus sawdust* contained 24.80% cellulose, 10.62% hemicellulose, 0.87% extractives, 62.62% total lignin, 0.47% total protein, and 0.62% ash. For its part, *spent coffee grounds* were composed by 35.16% total lignin, 33.62% cellulose, and 30.38% fats quantified as extractives. For *coffee cut-stems*, up to 95% of the lignin content was removed by pretreatment at severity (I), and 89% of the lignin content was removed at severity (II). The results of the pretreatment simulation showed that the higher xylose production was obtained at  $160^\circ\text{C}$ , even though the slow-hydrolyzing xylan fraction remained almost unchangeable. On the other hand, the higher glucose production was obtained at  $170^\circ\text{C}$ , but the co-product profiles (HMF and Furfural) showed the lowest concentrations at  $160^\circ\text{C}$ .

*Coffee cut-stems* as a large local lignocellulosic waste were a promising feedstock enriched in cellulose to ethanol production by the integrated *SSF* configuration. The *SSF* experimentation proved to increase significantly ethanol productivity up to 50% over conventional *SSF* (nonextractive) process by reducing the inhibitory effects of the fermentation reaction due to the continuous extraction of the product ethanol into the nonmiscible phase (*n*-dodecanol). Furthermore, the chosen solvent *n*-dodecanol showed excellent biocompatibility with the other bio-agents working in the *SSF* configuration, and served as effective ethanol-extracting for this system, leading to conclude that the potential use of the integrated *SSF* configuration employing *n*-dodecanol most probably would reduce the energetic requirements to separate ethanol from the solvent over conventional aqueous phases. ■