

MODELAMIENTO Y SIMULACIÓN DE UNA SERIE DE CSTR'S CON ALIMENTACIÓN DISTRIBUIDA PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE CAÑA

A. GONZÁLEZ QUIROGA^{1*}; A. C. COSTA²; R. MACIEL FILHO¹

¹Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado LOPCA UNICAMP.

²Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos LEPFE UNICAMP.

*gqar7@yahoo.es

Fecha Recepción: 18 de septiembre de 2009

Fecha Aceptación: 25 de octubre de 2009

RESUMEN

Son presentadas consideraciones de diseño para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña en una serie de reactores continuos de tanque agitado (CSTR's) con alimentación distribuida de sustrato. Un modelo cinético previamente ajustado y validado es usado junto con los modelos de macrofluido y microfluido para describir el sistema de reacción. La alimentación distribuida de sustrato permite aumentar la concentración de sustrato superando los problemas de viscosidad y mezclado que se presentan en reacciones con concentraciones iniciales de sustrato mayores a 8-10% w/w. En la operación con alimentación distribuida se pueden obtener conversiones similares a las obtenidas en una serie con alimentación en el primer reactor.

Palabras claves: Hidrólisis enzimática, macrofluido, microfluido, concentración de sustrato

ABSTRACT

Design considerations for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse in a series of continuous stirred tank reactors (CSTR's) with distributed substrate feeding are discussed. A previously fitted and validated kinetic model is used along with the macrofluid and microfluid modeling approaches to describe the reaction system. Substrate distributed feeding allows increasing substrate concentrations overcoming viscosity and mixing limitations common to reactions at initial substrate concentrations higher than 8-10% w/w. The operation with distributed substrate feeding allows to achieve substrate conversions similar to the achieved in a series with feeding in the first reactor.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, macrofluid, microfluid, substrate concentration

INTRODUCCIÓN

La hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica ha recibido especial atención en la última década debido a su potencial para convertir la fracción celulósica de sustratos lignocelulósicos en azúcares reductores los cuales son materia prima para la producción de etanol y otros productos químicos. Para que el etanol producido a partir de la biomasa lignocelulósica pueda ser un sustituto

o un complemento de la gasolina, los costos de producción deben ser reducidos sustancialmente. En este contexto, el estudio de las condiciones y estrategias de operación de sistemas de reacción continuos para la hidrólisis enzimática es un punto central en la reducción de costos. Uno de los factores más importantes en el balance energético y en la economía global del proceso es la concentración de sustrato en la corriente de entrada del sistema de reacción[1].

Las ventajas de operar a altas concentraciones de sustrato (>10% w/w) incluyen menor costo de capital debido a la reducción en el volumen de reacción, menor costo de operación como resultado de la reducción de los requerimientos de calentamiento, enfriamiento y potencia de mezclado, menor costo de procesamiento de efluentes debido a una mayor concentración de producto y menor consumo de agua[2]. Sin embargo la hidrólisis enzimática a concentraciones iniciales de sustrato mayores a 10% w/w ha sido técnicamente difícil debido a que el sustrato puede absorber agua, la fase acuosa puede desaparecer y partes del sustrato pueden contener aire en vez de agua y comportarse como un material granular difícil de mezclar de manera uniforme[3]. Operar la hidrólisis enzimática en modo *semibatch*, adicionando sustrato fresco y/o enzimas a diferentes tiempos de reacción ha permitido incrementar significativamente las concentraciones de sustrato[4,5,6]. Para la operación en modo continuo, una serie de reactores de tanque agitado (CSTR) con alimentación distribuida de sustrato y/o enzimas es una alternativa viable para incrementar la concentración de sustrato y controlar la viscosidad en la serie de reactores.

Estudios anteriores han demostrado la presencia de límites rigurosos de la conversión a partir de la Distribución de Tiempos de Residencia (RTD) a la salida de un reactor[7]. Tales límites en conversión corresponden a dos estados extremos de micromezclado denominados macrofluido y microfluido. El estado de macrofluido prevalece si el material alimentado entra en contacto íntimo con elementos de fluido de todas las edades al entrar inmediatamente al reactor, tal como en un CSTR ideal.

Por el contrario, en el microfluido, el material alimentado es fragmentado, las moléculas que entran en cada fragmento permanecen juntas indefinidamente, elementos de fluido de diferentes edades no se mezclan y la reacción procede de forma independiente en cada elemento de fluido. El slurry de biomasa fue considerado equivalente a macrofluido para el modelamiento de la hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas. En estudios anteriores se encontró una buena concordancia entre las predicciones del modelo y los tiempos

de residencia experimentales necesarios para alcanzar conversiones de la fracción celulósica entre 0,50 y 0,85 en un CSTR[8].

En este estudio, un modelo cinético de la hidrólisis enzimática previamente ajustado a perfiles experimentales de bagazo de caña deslignificado[9] es modificado para incluir el efecto de alimentación distribuida de sustrato. El modelo modificado es utilizado para un estudio de modelamiento y simulación considerando las situaciones límite de micromezclado correspondientes a macrofluido y microfluido en una serie de CSTR's con alimentación distribuida de sustrato. El desempeño de una serie de CSTR's con alimentación distribuida de sustrato para concentraciones acumulativas de sustrato entre 5,8% y 13,6% w/w es analizado.

MODELO CINÉTICO

Bagazo de caña pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino fue usado como sustrato modelo. La composición del bagazo pretratado en base seca fue: celulosa 60,1%w, xilosa 16,6%w, lignina 9,87%w. Los datos experimentales para la estimación de los parámetros del modelo cinético fueron obtenidos para relaciones enzima/sustrato entre 10 FPU/g - 10 CBU/g y 50 FPU/g - 50 CBU/g (Filter Paper Activity (FPU) y Cellobiase Activity (CBU) son unidades de concentración de las enzimas celulasas y celobiasas definidas por la IUPAC).

La temperatura de incubación fue de 50°C; velocidad de agitación 150 rpm; pH inicial 5.0 y tiempo de incubación 72 h[10]. Se usó un reactor con agitación magnética y masa total de reacción de 100 g. No se detectó acumulación significativa de celobiosa durante la reacción.

La velocidad de producción de glucosa es dada por la siguiente ecuación[9]:

$$\frac{dG}{dt} = \frac{v_m (G^{inf} - G)}{k_m \left(1 + \frac{G}{k_{inh}}\right) + 0,9 (G^{inf} - G)} \quad (1)$$

Tabla 1. Parámetros del modelo cinético[9]

	Relación enzima/sustrato [FPU/g – CBU/g]				
	50,0	25,0	16,7	12,5	10,0
S [%w/w]	1	2	3	4	5
G^{inf} [g/L]	5,130	9,734	14,24	18,04	21,53
v_m [g/Lh]	78,55	153,4	201,2	228,2	245,8
k_m [g/L]			1,016		
k_{inh} [g/L]			3,148*10 ⁻³		

De acuerdo con la ecuación (1), la glucosa (G) es producida a partir de un sustrato soluble hipotético ($S_h = G_{inf} - G$) cuya concentración inicial corresponde a la concentración de glucosa producida a las 72 horas de reacción, asumiendo un mecanismo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por glucosa. v_m , k_m y k_{inh} son la constante aparente de reacción, la constante aparente de Michaelis-Menten, y la constante aparente de inhibición, respectivamente. Se asume que k_m y k_{inh} son intrínsecos al sistema de reacción, mientras que v_m se asume como dependiente de la relación enzima/sustrato.

ALIMENTACIÓN DISTRIBUIDA

Cuatro estrategias de alimentación distribuida de sustrato fueron modeladas, simuladas y comparadas en términos de conversión de celulosa y concentración de glucosa con la operación convencional donde el sustrato es alimentado sólo en el primer reactor. Se asume que la enzima adicional es alimentada junto con el sustrato fresco a fin de mantener la carga enzimática del primer reactor. Las concentraciones de sustrato acumuladas (% w/w) a lo largo de la serie fueron calculadas asumiendo que la densidad promedio del material en el primer reactor (R) es 1 y que la masa de sustrato adicionada en el segundo o tercer reactor es igual a la adicionada en el primer reactor. Las concentraciones de sustrato acumulado son: {3,0 R1; 5,8 R2}, {3,0 R1; 5,8 R2; 8,5 R3}, {5,0 R1; 9,5 R2}, {5,0 R1; 9,5 R2; 13,6 R3}. La carga enzimática en las dos primeras estrategias fue 16,7 FPU/g – 16,7 CBU/g, mientras que en las dos últimas fue 10 FPU/g – 10 CBU/g.

Cada alimentación de sustrato que ocurre simultáneamente en reactores subsecuentes da lugar a una población de sustrato j . La velocidad de consumo de sustrato hipotético y la producción de glucosa a partir de la población de sustrato j son:

$$-r_j = - \frac{v_{mj} S_j^h}{k_m \left(1 + \frac{G}{k_{inh}}\right) + 0,9 S_j^h} \quad (2)$$

$$r_j = \frac{v_{mj} S_j^h}{k_m \left(1 + \frac{G}{k_{inh}}\right) + 0,9 S_j^h} \quad (3)$$

La velocidad de producción de glucosa en el reactor i de la serie se calcula a partir de:

$$\frac{dG}{dt} = \sum r_j \quad (4)$$

El número de poblaciones de sustrato que deben ser incluidas en la ecuación (4) para predecir la producción de glucosa en el reactor i depende de la localización del reactor en la serie y de la estrategia de operación. El sistema de ecuaciones diferenciales a ser resuelto está conformado por j ecuaciones similares a la ecuación (2) y la ecuación (4).

MODELAMIENTO DE LA SERIE DE CSTR'S

Las siguientes suposiciones fueron necesarias: (i) los reactores están perfectamente mezclados, (ii) la serie de reactores opera en estado estacionario y (iii) el tiempo de residencia de cada reactor (τ) es igual para todos los reactores de la serie.

Modelo de Macrofluido: Para una serie de CSTR's perfectamente agitados la RTD está dada por[11]:

$$E(t) = \frac{t^{nr-1}}{(nr-1)!} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (5)$$

Donde t es el tiempo de reacción y nr es el número de reactores entre el punto de alimentación y el último reactor considerado. La conversión de la población de sustrato hipotético j a la salida del reactor i ($X_{j,i}^h$) se obtiene a partir del modelo cinético y la función RTD correspondiente.

$$1 - X_{j,i}^h = \int_{t=0}^{t \rightarrow \infty} \left(\frac{S_j^h}{G_j^{\text{inf}}} \right) E(t)_j dt \quad (6)$$

Para asegurar un rango adecuado de valores de Δt en la solución numérica de la ecuación (6), se evaluaron diferentes valores hasta que la integral de la función RTD entre $t=0$ y $t \rightarrow \infty$ alcanzó como mínimo un valor ≥ 0.999 para cada población de sustrato.

Modelo de Microfluido: Los balances de masa para el sustrato hipotético y la glucosa en el reactor i son:

$$S_{j,i-1}^h - S_{j,i}^h - \tau r_j = 0 \quad (7)$$

$$G_{i-1} - G_i + \tau \sum r_j = 0 \quad (8)$$

Al igual que en el modelo de macrofluido, el número de poblaciones de sustrato hipotético incluidas en el tercer término de la ecuación (8) depende de la localización del reactor en la serie y de las estrategias de operación. S_j^h fue predicho solucionando simultáneamente los balances de masa para las poblaciones de sustrato presentes y el balance de masa para la glucosa. La conversión de la población de sustrato hipotético j a la salida del reactor i fue calculada por medio de la ecuación (9).

$$X_{j,i}^h = \frac{G_j^{\text{inf}} - S_{j,i}^h}{G_j^{\text{inf}}} \quad (9)$$

Conversión de la fracción celulósica del sustrato

La conversión de la fracción celulósica de la población de sustrato j a la salida del reactor i fue calculada a partir de la conversión correspondiente de sustrato hipotético:

$$X_{j,i}^c = \frac{\underbrace{C_{0,j}}_a - \underbrace{[(C_{0,j} - 0,9G_j^{\text{inf}})]}_b + \underbrace{(0,9G_j^{\text{inf}}(1 - X_{j,i}^h))}_c}{C_{0,j}} \quad (10)$$

Donde a es la concentración inicial de celulosa, b es la fracción de celulosa que permanece sin reaccionar cuando todo el sustrato hipotético es consumido y c es la celulosa solubilizada (el factor 0,9 resulta de la relación másica entre glucosa en celulosa y glucosa en solución).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se considera que el número de reactores en una serie de CSTR's debe estar entre 3 y 6 debido a que el beneficio obtenido con la reducción en el volumen de reacción es contrarrestado por los costos de agitadores, bombas y controladores, si más reactores son usados[12]. Así, una serie de 10 CSTR's es suficiente para mostrar las ventajas de la operación con alimentación distribuida de sustrato. Para la reacción de hidrólisis enzimática es de esperarse un comportamiento de micromezclado cercano al modelo de macrofluido para tiempos de residencia cortos ($< \sim 10$ h) y una evolución gradual hacia un flujo parcialmente segregado a medida que la celulosa es solubilizada y la estructura sólida del sustrato colapsa. Así, la predicción de la conversión en esas dos situaciones límite constituye un marco de referencia para evaluar el desempeño de la serie de CSTR's.

La Figura 1 muestra la conversión de celulosa a lo largo de la serie cuando el sustrato es alimentado solamente en el primer reactor. El extremo superior de cada línea vertical representa la conversión predicha por el modelo de macrofluido mientras que el extremo inferior representa la predicción del modelo de microfluido. El modelo de macrofluido predice conversiones mayores que el modelo de microfluido especialmente en los primeros tres reactores de la serie. Para la hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas en un CSTR se encontró que las conversiones predichas por el modelo de macrofluido fueron más cercanas a las experimentales que las predichas por el modelo de microfluido[9]. Para una reacción sólido-líquido en una serie de CSTR's se encontró que las conversiones predichas por el modelo de macrofluido para el primer reactor fueron cercanas a las conversiones experimentales, mientras que las conversiones predichas por el modelo de microfluido fueron cercanas a las experimentales para más de tres reactores[13].

Los perfiles de conversión de celulosa (Figura 1) muestran que operando a una concentración de

sustrato de 3% w/w se alcanzan conversiones de celulosa mayores, usando un número menor de reactores, y que la conversión de celulosa a la salida de la serie de 10 CSTR's, para τ mayores de 30 h, es significativamente mayor comparada con la operación a 5% w/w. La principal razón para este resultado está en las diferencias en

la relación enzimas/sustrato. Además, ha sido reportado que el desempeño de las enzimas decrece gradualmente cuando la concentración de sustrato se incrementa[1]. Para concentraciones de sustrato de 3% y 5% w/w las concentraciones de glucosa a la salida de la serie de 10 CSTR's no excede 1,4% y 2,1% w/w, respectivamente.

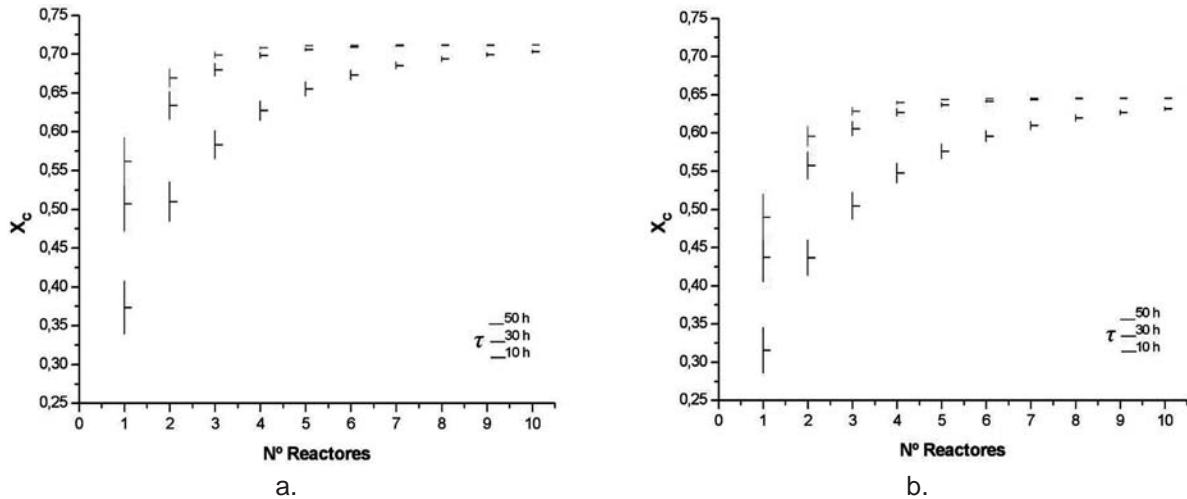


Figura 1. Perfiles de conversión de celulosa a lo largo de la serie cuando se alimenta sustrato sólo en el primer reactor. Concentraciones de sustrato de a) 3% w/w y b) 5% w/w.

Las Figuras 2 y 3 muestran los perfiles de conversión de glucosa a lo largo de la serie de CSTR's para las cuatro operaciones con alimentación distribuida. La conversión de celulosa al final de la serie para valores de τ de 30 y 50 h es similar a la obtenida cuando se alimenta sustrato sólo en el primer reactor. Sin embargo, para tiempos de residencia

en el reactor de 10 h la conversión alcanzada en la operación con alimentación distribuida es significativamente menor. Los resultados utilizando alimentación distribuida muestran concentraciones de glucosa de hasta 6,3% w/w a la salida de la serie para una concentración acumulada de sustrato de 13,6% w/w.

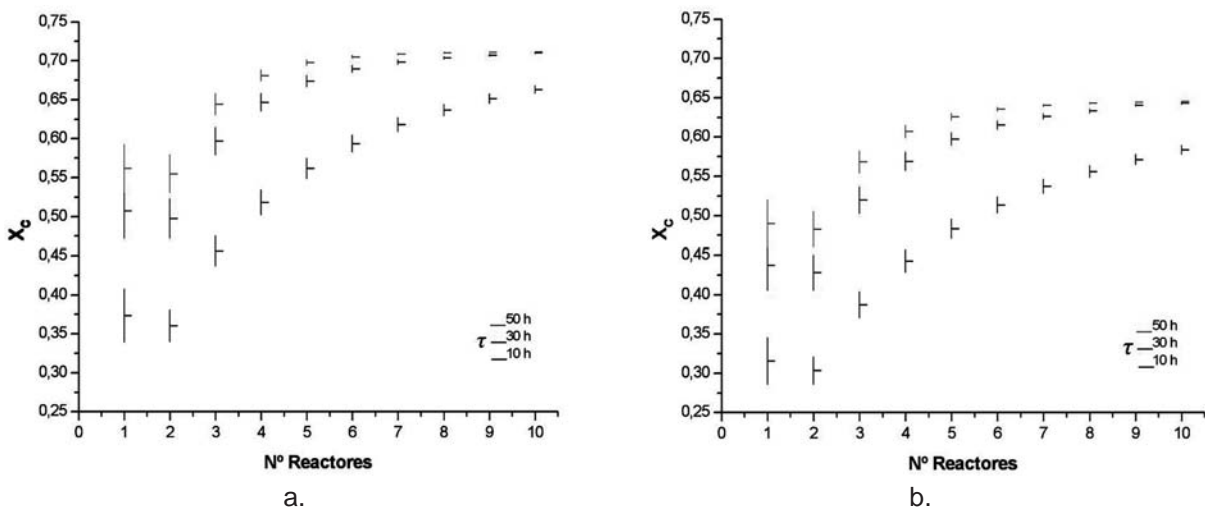


Figura 2. Perfiles de conversión de celulosa cuando se alimenta sustrato en los primeros dos reactores. Concentraciones acumuladas de sustrato de a) 5,8% w/w y b) 9,5% w/w.

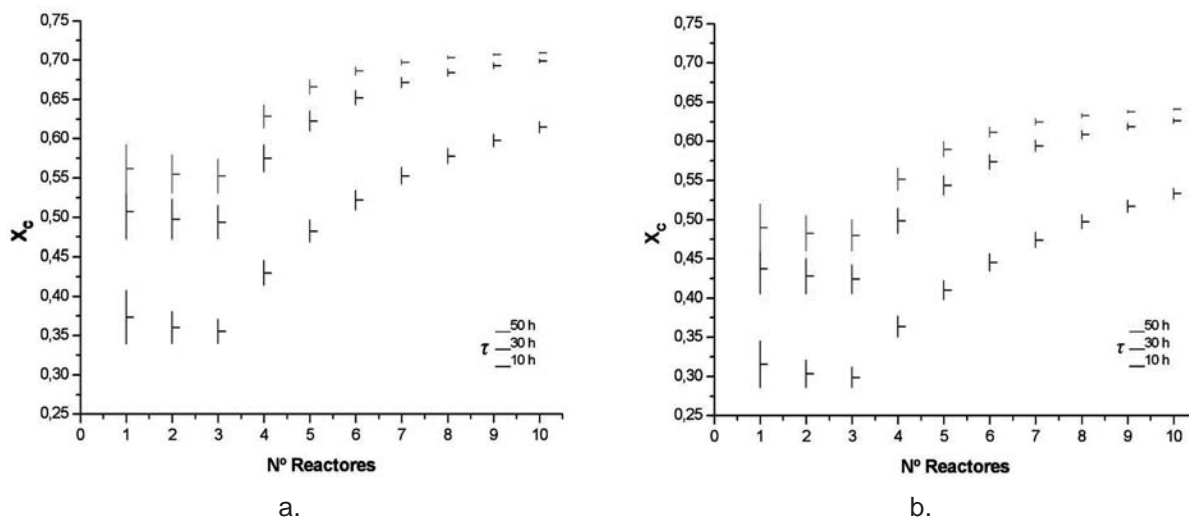


Figura 3. Perfiles de conversión de celulosa cuando se alimenta sustrato en los primeros tres reactores. Concentraciones acumuladas de sustrato de a) 8,5% w/w y b) 13,6% w/w.

El modelamiento propuesto para la serie de CSTR's con o sin alimentación distribuida de sustrato puede ser utilizado para explorar otras alternativas de operación tales como perfiles de adición de enzima, separaciones intermedias de producto y operación con hidrólisis enzimática en los primeros reactores de la serie y fermentación en los reactores restantes.

CONCLUSIONES

Fue modelada y simulada una serie de CSTR's con alimentación distribuida de sustrato para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña. Se reportan las modificaciones necesarias en el modelo cinético a fin de incorporar los efectos de la alimentación distribuida de sustrato. El flujo del slurry a lo largo de la serie de reactores fue considerado como equivalente a macrofluido y microfluido para obtener la conversión máxima y mínima de sustrato asumiendo que los reactores están perfectamente agitados. La concentración de sustrato en el primer reactor de la serie fue fijada en 3% y 5% w/w y se estudiaron el perfil de conversión a lo largo de la serie y la concentración final de glucosa cuando se alimenta sustrato adicional en el segundo y tercer reactor para alcanzar concentraciones acumuladas de sustrato de 5,8%; 8,5%; 9,5% y 13,6% w/w. Las conversiones de celulosa predichas por el modelo de macrofluido son significativamente mayores que las predichas por el microfluido en los primeros tres reactores de la serie, pero se aproximan al mismo

valor con el aumento del número de reactores y/o el aumento del tiempo de residencia. En la operación con alimentación distribuida se pueden obtener conversiones similares a las obtenidas en una serie con alimentación en el primer reactor. Las concentraciones de glucosa al final de la serie alcanzaron valores entre 2,8% y 6,3% w/w. La alimentación distribuida de sustrato permite incrementar significativamente la concentración de sustrato y la concentración final de glucosa controlando la viscosidad del slurry y manteniendo conversiones similares a las obtenidas cuando el sustrato se alimenta sólo en el primer reactor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen el apoyo financiero de FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) y CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jorgensen, H; Vibe-Pedersen, J; Larsen, J; Felby, C. Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 96: 2007, pgs. 862-870.
- [2] Mohagheghi, A; Tucker, M; Grohmann, K. High solids simultaneous Saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 33: 1992, pgs. 67-81.

- [3] Viamajala, S; McMillan, J; Schell, D; Elander, R. Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations – Effects of saccharifications and particle size. *Bioresour Technol.* 100: 2009, pgs. 925-934.
- [4] Ballesteros, M; Oliva, J; Manzanares, P; Negro, M. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation in a fed-batch basis. *World J Microbiol Biotechnol.* 18: 2002, pgs. 559-561.
- [5] Rosgaard, L; Andric, P; Dam, K; Pedersen, S; Meyer, A. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 143: 2007, pgs. 27-40.
- [6] Lu, Y; Wang, Y; Xu, G; Chu, J; Zhuang, Y; Zhang, S. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Appl Biochem Biotechnol.* DOI: 10.1007/s12010-008-8306-0. 2008.
- [7] Zwietering, T. The degree of mixing in continuous flow systems, *Chem Eng Sci.*, 11, 1959, pgs. 1–15.
- [8] South, C; Hogsett, D; Lynd, L. Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. *Enzyme Microb Technol.* 17: 1995, pgs. 797-803.
- [9] González A, Costa A, Maciel Filho R. A pseudo-homogeneous kinetic model for the enzymatic hydrolysis of alkaline hydrogen peroxide pretreated sugarcane bagasse, in “Séminaire scientifique Fractionnement des Agro Resources et Environnement”. (Lundi, France) 2009.
- [10] Reis-Garcia D. Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Mestrado 2009.
- [11] Levenspiel O. Chemical Reaction Engineering. New York: John Wiley & Sons Inc. 1999.
- [12] Perry, R; Green, DW; Maloney, J. Chemical Engineering Handbook. New York. McGraw Hill. 1999, pgs. 7-17.
- [13] Çacal, G; Eroğlu, I; Özkar, S. Simulation of continuous boric acid slurry reactors in series by microfluid and macrofluid models. *J Crystal Growth.* 306: 2007, pgs. 240-247.