

Estrategia para evaluar las alternativas de uso de la xilosa para la obtención de Xilitol o Etanol

Autora: Talhita Benítez Pardillo*

Coautores: George González Batista*, Leyanis Mesa Garriga**, Erenio González Suárez**, Eulogio Castro Galiano***

*Profesora Auxiliar. Universidad de Camagüey, Circunvalación Norte Km 5 ½, Cuba. email: talhita.benitez@reduc.edu.cu

**Universidad Central de Las Villas, Cuba.

***Universidad de Jaén, España.

Fecha de presentación: 7 junio 2010

Resumen

En la producción de etanol empleando bagazo de caña de azúcar como materia prima mediante la tecnología UCLV, una corriente rica en Xilosa puede ser transformada a varios productos, siendo interés del mercado nacional cubano su utilización como fuente de etanol y xilitol. La estrategia de investigación incluye un estudio de Vigilancia Tecnológica sobre las alternativas disponibles, las vías experimentales para la asimilación de estas tecnologías a nivel de laboratorio, y los requerimientos para mediante su escalado realizar la evaluación de las mismas. Se han revisado 80 patentes, para conocer la situación a nivel mundial del uso de la xilosa en la obtención de etanol y xilitol, que incluyó 7 sitios específicos y otros generales, siendo de interés 31 patentes, lo que permitió quedara definida la estrategia viable a seguir en cada caso. Las cepas mas importantes en la obtención de xilitol son: *Candida guilliermondii*, *Pichia stipitis* NRRL Y-11545 y *Pachyssolen tannophilus* y las técnicas analíticas a emplear son la biomasa y la determinación de Xilitol con HPLC. En el caso de la obtención de etanol las cepas mas empleadas son: *Candida shehatae* NRRL Y-1285, *Pichia stipitis* NRRL Y-11545 y *Pachyssolen tannophilus* siendo las determinaciones analíticas la biomasa, azúcares reductores totales por el método del DNS y el etanol por colorimetría con $K_2Cr_2O_7$. Finalmente se realiza una proyección de trabajo futuro.

Palabras claves: bagazo de caña de azúcar, xilosa, etanol, xilitol.

Abstract

In the ethanol production from sugarcane bagasse by the technology UCLV, a rich current in Xilosa can be transformed to several products, being interest of the Cuban national market its use like source of ethanol or xilitol. The investigation strategy includes a study of Technological Monitoring about the available alternatives, the experimental ways for the assimilation of these technologies at the laboratory level, and the requirements for by means of the scale up, carry out their assesment. 80 patents has been revised to know the situation at world-wide level of the used xilosa to obtain ethanol and xilitol, that included 7 specific places and other generals, being of interest 31 patents, what gave the possibility of defining a viable strategy to followed in every case. The most important stocks to obtain xylitol are *Candida guilliermondii*, *Pichia stipitis* NRRL Y-11545 and *Pachyssolen tannophilus*, and the analytical techniques to employ are the biomass and xylitol determination with HPLC. In the case to obtain ethanol the stocks more employing are *Candida shehatae* NRRL Y-1285, *Pichia stipitis* NRRL Y-11545 and *Pachyssolen tannophilus* and the analytical techniques are the biomass, total reducing sugar by DNS method and ethanol to colorimetric technique with $K_2Cr_2O_7$. Finally the projections are detailed to future.

Keywords: sugarcane bagasse, xilosa, ethanol, xilitol.

INTRODUCCION

Dentro de las materias primas más usadas para la producción de productos de alto valor agregado (xilitol, etanol) encontramos: la paja de arroz, el bagazo de caña de azúcar, virutas de madera, entre otras. (Martínez *et al*, 2002)

El bagazo de caña de azúcar es un subproducto lignocelulósico abundante en países como Brasil, India y Cuba donde la industria azucarera tiene gran importancia comercial (Biswas, 1998)

Está constituido por, aproximadamente, 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 25% de lignina. A pesar de que este residuo es utilizado como combustible en las industrias azucarera, alimenticias, de papel, alcohol y química, grandes cantidades son acumuladas en la naturaleza.

A escala industrial, el xilitol es producido generalmente por reducción química de la D-xylosa derivada de residuos de plantas, que han sido hidrolizadas (Nigam, 1995) los cuales son ricos en xilosa (Johansson, 2001)

El xilitol se cotiza en el mercado mundial a razón de \$8 000/ton. Es un azúcar alcohol que posee varias aplicaciones clínicas que lo indican para el tratamiento de personas con diabetes, desórdenes

en el metabolismo de lípidos, lesiones renales y parenterales, en la prevención de otitis, es anticariogénico y cariostático, previene infecciones pulmonares y osteoporosis (Mäkinen, 1995) por tanto tiene gran importancia económica y social por su aplicación en las industrias farmacéutica, química, odontológica y alimentaria.

Así mismo el etanol ha adquirido un gran valor por la posibilidad de su uso como combustible en mezclas con gasolina o petróleo siendo una fuente renovable de energía, por lo que el aumento del mismo ha estado aparejado al incremento de nuevas tecnologías que permiten obtenerlo a partir de residuos de madera, desechos sólidos y todos los materiales que contengan celulosa y hemicelulosa, revalorizando los desechos de varias industrias convirtiéndolos en materia prima para la obtención de etanol. (González, 2003)

En el presente trabajo se formula la estrategia de investigación para evaluar las alternativas más adecuadas en la utilización de la xilosa que se genera en el fraccionamiento ácido del bagazo de caña de azúcar, lo que incluye un estudio de Vigilancia Tecnológica sobre las alternativas disponibles,

las vías experimentales para la asimilación de estas a nivel de laboratorio, y los requerimientos para mediante su escalado realizar la evaluación de las mismas.

DESARROLLO

El xilitol es obtenido por hidrogenación catalítica a partir de xilosa comercial, lo cual implica un proceso de alto costo y bajo rendimiento pero también puede ser producido por fermentación por medio de microorganismos como bacterias, mohos y levaduras.

Este proceso es altamente específico y económico debido a que un 80 % del azúcar es transformado en xilitol, y se puede aumentar el rendimiento, ya sea modificando la célula por ingeniería genética u optimizando las condiciones culturales de producción del microorganismo seleccionado.

Se ha demostrado que las levaduras son las mejores productoras de xilitol, especialmente aquellas del género *Candida* ya que reducen la xilosa a xilitol bajo la acción de una enzima denominada xilosa reductasa, la cual es NADP-dependiente. La cantidad de xilitol y la productividad del mismo dependerán de las condiciones de cultivo y del tipo de cepa que se utilice (Martínez, 2002)

La literatura refiere que dentro de los principales géneros de levaduras podemos encontrar:

§ *Candida guilliermondii*

§ *Candida shehatae* NRRL Y-1285

§ *Pichia stipitis* NRRL Y-11545

§ *Pachysolen tannophilus*

Muchos han sido los métodos descritos para la producción del xilitol:

A través de la llamada ingeniería metabólica, mediante nuevas levaduras capaces de metabolizar la xilosa transformándola en xilitol, el que se acumula en el medio de cultivo del que será luego recuperado. Con la tecnología de DNA para dotar a algunos microorganismos de la propiedad de fermentar azúcares de cinco carbonos con alta eficiencia (Ho, 1998). Un ejemplo de ello es la cepa bacteriana de la especie *Escherichia coli*, desarrollada por la Universidad de Florida (EUA), que puede fermentar azúcares de seis y cinco carbonos al mismo tiempo, el que ha sido registrado bajo la patente US 5.000.000 (Ethanol production by *Escherichia coli* strains co-expressing *Zymomonas* PDC and ADH

genes).

Por otro lado, partiendo del ácido glucónico el procedimiento consiste en la transformación del mismo en arabinosa, hidrogenación de la misma formándose arabitol, isomerización de este último a una mezcla de pentitoles y posterior separación de los mismos.

Además, empleando como materia prima los licores al sulfito provenientes de la elaboración de pulpa de celulosa. Dichos licores contienen xilosa y ácido xilónico los cuales se separan del material original para ser refinados y mediante posterior hidrogenación se obtiene el xilitol. (Patente de Invención de Xyrofin Oy – Finlandia)

Según la materia prima empleada, la D-xilosa presente en la solución puede estar acompañada por otras pentosas (arabinosa, ribosa), las que son necesarias eliminar. Esta separación se efectúa por separación cromatográfica. (patentes de invención: US 3.748.408, 4.008.285).

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO (obtención de xilitol a partir de xilosa)

Los hidrolizados fueron, primeramente, concentrados a vacío para obtener una concentración de xilosa de 100 g/L. Posteriormente fueron tratados con CaO, para elevar el pH hasta un valor de 7,0 y con H₃PO₄ hasta pH 5,5. Finalmente se trataron con carbón activado (2,4 %). El proceso de fermentación de los hidrolizados (pH 5,0 a 30 oC) fue realizado en frascos Erlenmeyer de 125 ml, agitados a 300 rpm durante 80 h. El estudio cinético permitió observar el comportamiento de la *C. guilliermondii* en estos hidrolizados y sus consecuencias sobre los parámetros fermentativos. Se obtuvo una productividad de 0,50 g/Lh en hidrolizado de bagazo de caña.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Inóculo: El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 h de incubación (*Candida guilliermondii*), para obtener células en la misma fase de crecimiento. La cepa se agregó al medio fresco hasta obtener una DO 0,30 a una long. de onda de 560 nm, correspondiente a 0,75 mg p.s/ml.

Medio sintético: El medio sintético contiene en g/l: 33, xilosa; 3, extracto de levadura; 3, (NH₄)₂SO₄; 0,1 CaCl₂ x 2 H₂O y se ajustó a pH, 5 con NaOH al 20 % (p/v).

Medio base: xilosa a partir de la hidrólisis ácida diluida del bagazo de la caña de azúcar :

Se utilizó el bagazo de caña de azúcar como materia prima para la obtención de xilosa. Para esto se usó H_2SO_4 del 1% (v/v) durante 40 minutos a 120 grados celsius. La concentración de xilosa fue de 40 g/L y la de inhibidores (furfural) por debajo de 1 g/L, por lo que no hubo necesidad de detoxificar.

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Biomasa: La biomasa fue separada por centrifugación a 10000 rpm, 15 min., se lavó varias veces con agua destilada y se secó a 105 °C hasta peso constante.

Xilitol: La determinación de xilitol se realizó en un HPLC, marca Young Lin, con una columna cromatográfica OHR-801. Las muestras se eluyeron con una solución de ácido sulfúrico (0,01N) pH, 2,1, a una velocidad de 0,5 ml/min y a temperatura ambiente. La producción de xilitol y azúcares se cuantificaron relacionando el área de los picos obtenidos, respecto al área de los azúcares estándar como xilosa, glucosa, arabinosa

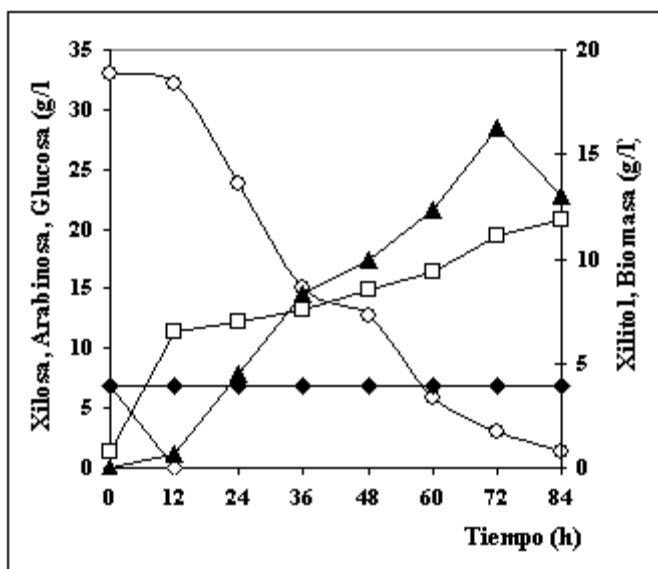


Figura 1: Cinética de producción de xitol en medio de licor de marlo por *Cándida guilliermondii*. En g/l: □, Biomasa; ▲, xitol; ○, xilosa; ◆, arabinosa; ◆, glucosa.

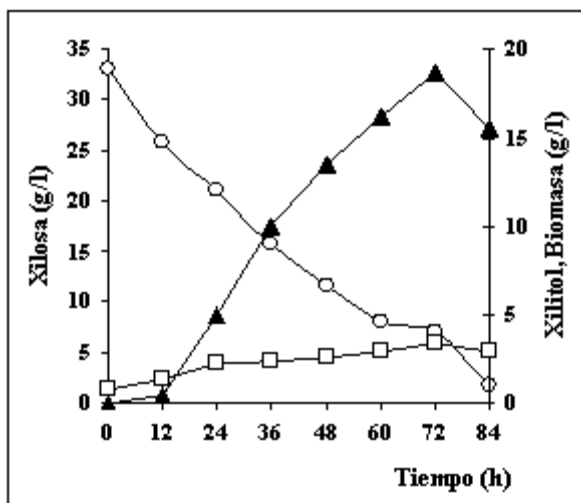


Figura 2: Cinética de producción de xitol en medio sintético por *Cándida guilliermondii*. En g/l: □, Biomasa; ▲, xitol; ○, xilosa.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO (obtención de etanol a partir de xilosa)

Se realizan fermentaciones simultáneas (una por levadura) con:

1. *Candida shehatae* NRRL Y-1285,
2. *Pichia stipitis* NRRL Y-11545
3. *Pachysohlen tannophilus*

Durante dos fines de semanas consecutivos y se toman muestras cada dos horas por un periodo de 38 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Inóculo: El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 h de incubación (*Pichia stipitis*), para obtener células en la misma fase de crecimiento.

Medio sintético: El medio sintético contiene en g/l: 50, xilosa; 3, extracto de levadura; 5, glucosa; 3, extracto de malta; 5, pectona y se ajustó a pH 5.

Medio base: xilosa a partir de la hidrólisis ácida diluida del bagazo de la caña de azúcar :

Se utilizó el bagazo de caña de azúcar como materia prima para la obtención de xilosa. Para esto se usó 100 gramos de bagazo con una relación sólido-líquido de 1-4 (g-g) y una concentración de H₂SO₄ del 1% (v/v) durante 40 minutos a 120 grados celsius. La concentración de xilosa fue de 40 g/L y la de inhibidores (furfural) por debajo de 1 g/L, por lo que no hubo necesidad de detoxificar.

Fermentación Batch

En erlenmeyer de 500 ml con volumen efectivo de 125 ml. El medio de fermentación fue inoculado con 5% (v/v) de inóculo (20 h, 1x10⁷ cells/ml) manteniendo la temperatura a 30 °C y 200 rpm

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Biomasa: La biomasa fue separada por centrifugación a 10000 rpm, 15 min., se lavó varias veces con agua destilada y se secó a 105 °C hasta peso constante

Azúcares: Los azúcares totales fueron determinados por el método del DNS, mientras que las pentosas fueron determinadas por Roe and Rice

Etanol: se determinó colorimétricamente con dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

Además del análisis de las muestras se puede determinar: la producción de etanol como función

de la concentración de xilosa (YP/S) y de célula de levadura (YP/X) y la concentración de células como función de la concentración de xilosa, YX/S. (Y=deltaX/deltaS). También se determinará la razón máxima de crecimiento, μ_{max} .

El análisis de muestras y los resultados demostraron que *Pichia stipitis* tiene un mayor 'yield' de etanol para fermentaciones con xilosa. (Martínez et al., 2000)

CONCLUSIONES

La estrategia de desarrollo de derivados a partir de bagazo de caña de azúcar como materia prima mediante la tecnología UCLV la en la obtención de xilitol y/o etanol, contribuirá al incremento de la eficiencia de explotación de este material así como a una solución a los problemas ambientales causados por la acumulación de estos residuos.

La materia prima propuesta en este trabajo proporciona hidrolizados hemicelulósicos capaces de ser bioconvertidos en xilitol y/o etanol, por distintas cepas de levadura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Biswas, S.; Washishtha, N.: Xilitol: Technology and Business opportunities, Chemical Engineering World 33, 103-108, 1998.
2. Johansson, B.; Christensson, C.; Hobbey, T.; Hahn-Hägerdal, B.: Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosichydrolysate, Appl. Environ. Microbiol., 67, 4249-4255, 2001
3. Mäkinen, K. K. et al: Xylitol chewing gums and caries rates: a 40-month cohort study, J. Dent. Res., 74, 1904-1913, 1995.
4. Martínez, E.A.; y otros: Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. Cienc. Technol. Aliment. Vol. 3, N° 5: 295-301. Agosto 2002.
5. Martínez, A.; et al: Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. Biotechnol. Bioeng. 69, 526-536, 2000.

6. Nigam, P.; Singh, D.: Processes for fermentative production of xylitol—a sugar substitute, *Process Biochem.*, 30, 117–124, 1995.

7. Sakakibara, Y; Saha, B. C.; Taylor, P.: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, VOL. 107 No. 5, 506–511, 2009

8. US 5.000.000. Ethanol production by *Escherichia coli* strains co-expressing *Zymomonas* PDC and ADH genes.