

Titulo

Estudio preliminar de la fermentación alcohólica de una mezcla de miel final e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.

Delvis Rafael Acosta Martínez 1, Leyanis Mesa Garriga 1, Erenio González Suárez 1, Georgina Michelena Rodríguez 2, María Elena Díaz de Villegas 2, Magdalena Lorenzo Izquierdo 2, Grolamys Castillo Portela

1 Departamento de Ingeniería Química, Universidad Central “Marta Abreu” de Las

Villas, Cuba. damartinez@uclv.edu.cu, leyanimg@uclv.edu.cu, erenio@uclv.edu.cu.

2 Departamento de Bioproductos, Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar, La Habana, Cuba. georgina.michelena@icidca.edu.cu, maiaelena.diaz@icidca.edu.cu, magdalena.lorenzo@icidca.edu.cu, grolamys.castillo@icidca.edu.cu.

Resumen.

El bagazo de la caña de azúcar es un residuo lignocelulósico que se ha propuesto como materia prima para la producción de etanol. El aprovechamiento de esta biomasa con el objetivo de obtener etanol está basado en la transformación de los polímeros contenidos en el material en azúcares fermentables. Este trabajo presenta el estudio de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar fraccionado, empleando enzimas comerciales donadas por Novozymes. Se obtuvo una solución de glucosa que posteriormente se fermentó a etanol empleando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Los estudios de fermentación se realizaron en un fermentador de la marca Marubishi completamente automatizado de 5 L de capacidad que contenía 2,5 L del licor hidrolizado y miel diluida.

La producción de etanol se monitoreó por cromatografía gaseosa y el consumo de azúcares reductores totales por el método del ácido 3,5 Dinitro Salicílico (DNS). La concentración de azúcares reductores totales en el licor hidrolizado, según la metodología propuesta, fue de 51 g/L, y la eficiencia del proceso de producción de etanol en estas condiciones experimentales estuvo en el orden del 87,53 % con respecto al máximo teórico para este proceso.

Palabras clave:

Pretratamiento Organosolv, bagazo de la caña de azúcar, hidrólisis enzimática, cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Introducción

El alto consumo energético nos ha llevado a una inevitable disminución de las reservas de combustibles fósiles y a la obtención de un ambiente con niveles preocupantes de contaminación. Ambos aspectos se han tornado altamente importantes en el mundo, afectando tanto cuestiones ambientales y económicas, como las que involucran la seguridad mundial y las políticas de producción y comercialización del petróleo y sus derivados.

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica con el objetivo de obtener etanol está basado en la transformación de los azúcares contenidos en la misma. Los microorganismos que realizan esta conversión necesitan disponer de los azúcares en formas monoméricas, por lo que es preciso la descomposición o hidrólisis de los polímeros azucarados presentes en la biomasa lignocelulósica. Sin embargo, mientras que es relativamente sencilla la hidrólisis en el caso de las materias primas ricas en almidón, como los cereales, resulta mucho más difícil el proceso cuando se parte de residuos lignocelulósicos, puesto que los polímeros que los constituyen están formando estructuras estrechamente ligadas entre sí y altamente empaquetadas, dificultando el acceso a los agentes hidrolíticos. Es por esto que es necesario el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica para alterar la estructura química y física del material a estudiar, así como uso de un crudo enzimático que sea capaz de hidrolizar las estructuras poliméricas que constituyen este sustrato, específicamente los enlaces α -1,4- glucosídicos que forman a la celulosa, dejando las estructuras de glucosa libre para que sean de fácil asimilación por los microorganismos que intervienen en la fermentación alcohólica. Es por ello que encaminamos el objetivo de este trabajo hacia la solución del siguiente

Problema Científico:

La necesidad de incluir al bagazo de la caña de azúcar como fuente de azúcar conjuntamente con la miel en la fermentación alcohólica, empleando eficientemente las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica del hidrolizado enzimático del bagazo.

Hipótesis: Es posible llevar a cabo la fermentación alcohólica del bagazo de caña de azúcar pretratado utilizando previamente la hidrólisis enzimática conjuntamente con miel.

Objetivo General: Estudiar la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica del bagazo de caña de azúcar pretratado, utilizando enzimas comerciales y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación mezclándola con miel de caña.

Objetivos Específicos:

1. Realizar un estudio teórico de la bibliografía acerca de la obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.
2. Realizar la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado con una tecnología Organosolv en dos etapas desarrollada en la UCLV.
3. Realizar la fermentación alcohólica del hidrolizado utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* conjuntamente con miel.

Desarrollo

Materiales y Métodos

Metodología de ejecución de los experimentos.

Preparación de medios de cultivo para el

Saccharomyces cerevisiae

Para la ejecución del trabajo fue necesario primeramente realizar la preparación de todos los medios de cultivo necesarios para llevar a cabo el experimento.

Medio sintético para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Se prepara una cuña de levadura procedente del cepario ICIDCA, en un medio sintético agar papa dextrosa (APD). Se pesan 35 g de APD, se disuelven en un litro de agua destilada y se esteriliza por 20 minutos en autoclave a 121 OC, luego en ambiente estéril se funde y se añaden 10 ml del medio en tubos de ensayo, estos se ponen en un plano inclinado de manera que solidifique en forma de cuña. Luego, utilizando un flujo laminar, se siembra en forma de zig zag la capa de levadura y se encuba a 30 OC por 24 h.

Preparación del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*

Se preparan 750 mL de inóculo utilizando una solución de glucosa al 2 % para el desarrollo de las células contenidas en la cuña. Luego se distribuyen en 3 erlenmeyers de 1000 ml cada uno con un volumen de 250 mL, esto se esteriliza por 20 min a 121 OC en autoclave. Luego se pasa una cuña para cada uno de los inóculos preparados, se encuba a 30 OC por 24 h, utilizando zaranda.

2.1.2 Preparación del crudo enzimático

Las enzimas utilizadas fueron de calidad comercial donadas por Novozymes, las que contaban con 60 FPU/mL de actividad enzimática, las que se añaden directamente a la biomasa pretratada.

2.2 Preparación del licor hidrolizado

Se parte de 200 g de bagazo de caña de azúcar pretratado en un volumen de solución buffer acetato de 1 L que se corresponde con una relación de sólidos de 10 %, se utilizó una carga enzimática de celulasas de 15 FPU/g de

sustrato pretratado. Se mezcla en un reactor hidrolítico de 5 L de capacidad, utilizando 1 L del volumen utilizable. El reactor hidrolítico consta también de agitación mecánica a 150 rpm, este reactor está termostatzado para mantener la temperatura constante en 50 OC que es la temperatura donde la enzima alcanza su máxima actividad, esto se mantiene por espacio de 24 h. Luego de esta operación obtenemos un licor hidrolizado para su posterior fermentación alcohólica.

La solución buffer acetato pH 4,8 se prepara mezclando 300 mL de solución B y 600 mL de solución A, luego se completa a 1 000 mL.

Solución A: Ácido acético 0,2 M, mida 11,55 mL de ácido acético glacial y dilúyalo a 1000 mL. Solución B: Acetato de sodio 0,2 M, pese 27,2 * 3H₂O de acetato de sodio y dilúyalo a 1000 mL.

2.3 Desarrollo de la fermentación alcohólica

En esta etapa se parte de 1 L de licor hidrolizado obtenido en la etapa de hidrólisis enzimática, de donde proviene con una concentración de azúcares de 5 1g/L, se introduce en un fermentador de 5 L de capacidad de la marca Marubishi completamente automatizado que contenía 1,5 L de solución de miel final para completar los 120 g/L utilizados durante la fermentación producto de la baja concentración de azúcares del hidrolizado, evitando un alto consumo energético a la hora de la destilación. Los aditamentos con los que cuenta el fermentador son frasco de antiespumante, en este caso se utilizó el aceite de girasol; frasco con NaOH y

H₂SO₄ al 25% respectivamente, para el control del pH del medio. El modo de operación del fermentador es sencillo, se comienza la inoculación del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* ya preparado. Se fijan los parámetros de

operación como son la temperatura 32 OC y el pH entre 4-4,2. La fermentación ocurrió en un tiempo de 24 h. Se toman muestras por espacio de 2 h, a partir de las primeras 4 horas, y se le determina concentración alcohólica y azúcares reductores totales. La miel final utilizada fue miel clarificada por el método de ácido en caliente, donde se prepara una solución de miel 1:1, se calienta por 30 min a 80 oC, luego se le ajusta el pH a 3 ó 3,2 con H₂SO₄ 1:1 y se calienta nuevamente a 80 oC por 1 h. Luego se deja enfriar para decantar.

2.4 Técnicas utilizadas para la caracterización

2.4.2 Azúcares reductores por el método del ácido 3.5-dinitro salicílico (DNS)

Fundamento del método

Procedimiento

Se añade en cada tubo de ensayo 0,5 mL de cada concentración por cada tubo duplicado más 0.5 mL del reactivo 3.5-DNS, se agita y se pone en baño a 100 OC por 5 min, enfriar y añadir 5 mL de agua destilada y leer contra blanco reactivo a 540 nm. En caso que se quiera azúcares reductores totales se necesita una previa preparación de la muestra la que consiste en tomar

Es un método colorimétrico que se basa en la capacidad que tienen los azúcares reductores totales de reducir el ácido 3.5-dinitro salicílico formando una solución coloreada que tiene su máximo de absorción a 540 nm.

Preparación de soluciones

Ácido 3.5-dinitro salicílico (DNS). Se disuelven 150 g de tartrato doble de sodio y potasio en 380 mL de agua destilada con agitación, luego añadir 8 g de

Concentración mg/L	mL a tomar	Volumen final en mL
0,5	0,5	100
0,7	0,7	100
0,9	0,9	100
1,1	1,1	100
1,3	1,3	100
1,5	1,5	100
1,7	1,7	100
1,9	1,9	100

hidróxido de sodio y al final comenzara añadir lentamente el ácido 3,5 dinitro salicílico. Dejar durante toda la noche en agitación, al otro día enrazar y filtrar, guardar en frasco de color ámbar, estable por seis meses. HCL 1:1, NaOH 10 %.

Preparación de la curva de calibración

Pesar 2,5 g de glucosa previamente seca a 600C en estufa a vacío durante 2h, y enrazar a un volumétrico de 25 mL. Los puntos de la curva se montan como se indica en la tabla 1.

1 mL de la muestra y llevarlo a un volumétrico de 100mL, al que se le añaden aproximadamente de 30 a 40 mL de agua destilada, se agita y se coloca en un baño de María a 65 OC, alcanzada esta temperatura se le añaden 5 mL de HCL 1:1 v/v, agitar y esperar 5 min, enfriar a TPEA y neutralizar a pH 6 con NaOH al 10 % con ayuda de un potenciómetro, luego se enraza con agua destilada a 100 mL.

1 mL de la muestra y llevarlo a un volumétrico de 100mL, al que se le añaden aproximadamente de 30 a 40 mL de agua destilada, se agita y se coloca en un baño de María a 65 OC, alcanzada esta temperatura se le añaden 5 mL de HCL 1:1 v/v, agitar y esperar 5 min, enfriar a TPEA y neutralizar a pH 6 con NaOH al 10 % con ayuda de un potenciómetro, luego se enraza con agua destilada a 100 mL.

Este es igual al procedimiento descrito para la curva pero utilizando la muestra.

2.4.3 Conteo celular

Fundamento del método

Se basa en el recuento de células totales, utilizando una cámara de Neubawver, con 0.1 mm de altura y 1 mm² de área de la cámara.

Procedimiento

Se toma 1 mL de la muestra y se disuelve en ml de agua destilada estéril, se carga la cámara y se hace el recuento por campos observados definiendo

tamaño, nivel de contaminación, morfología, así como número de células.

4.4 Viabilidad

Fundamento del método

Las células vivas permanecen intactas en cuanto a coloración debido a que pueden metabolizar la solución de Fink y Khüle, mientras que las muertas no lo pueden hacer, se tiñen de azul lo que las hace fácilmente diferenciables, entonces se hallan por diferencia entre el número total de células y las células muertas, teñidas con solución de Fink y Khüle.

Procedimiento

De la dilución realizada en el conteo celular se toma 1 mL y se adiciona en un tubo de ensayo que contenga 2 mL de la solución de Fink y Khüle, luego se monta nuevamente la cámara de Neubawver, y se cuenta el número de células muertas.

2.4.5 Concentración de etanol

La concentración de etanol se siguió durante la cinética de formación del mismo utilizando la cromatografía gaseosa, tanto para esto como para el etanol rectificado obtenido luego de la fermentación.

Condiciones Cromatográficas:

Cromatógrafo SHIMADZU con columna capilar modelo GC-17A con detector de llama (FID) y equipado con inyector automático. Se utilizó una pre-columna de sílica fundida de 1,5 m, a continuación la columna capilar CP-WAX 10 (30 m x 0,25 mm d.i. 0,25 µm espesor de película), seguida de Columna capilar de DB- WAX (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25µm espesor de película). Las columnas son conectadas entre ellas con conectores de presión.

Volumen de inyección: 1 µl

Para la cinética de etanol

Gas portador: Hidrógeno 132 kPa, Temperatura de columna: 70° C, Temperatura del Inyector: 250 °C, Temperatura del Detector: 250 °C, Volumen de inyección: 1µl split 1:25. Método de cálculo por estándar externo. Concentraciones de 1-6 g /100 mL.

Para el etanol rectificado

Gas portador: Hidrógeno, aumento de Presión de 65 a 128 KPa con incremento de 30 KPa. **Rampa de calentamiento**

Temperatura de columna: 40 °C por 10,4 min., 40 a 70 °C a 15 °C / min por 9,5 min, de 70° a 110 °C a 30 °C /min.

Temperatura del Inyector: 150 °C,
Temperatura del Detector: 250 °C, Volumen de inyección: 1µl split 1:25.

Método de cálculo por estándar externo. La curva patrón se realizó para identificar y cuantificar los compuestos de acetaldehído, acetato de etilo, acetal, metanol, Propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol y alcohol isoamílico en el etanol rectificado.

Preparación de las curvas de calibración

Para la cinética

Se preparó la curva de calibración para determinar etanol en el licor hidrolizado, donde se realizaron diferentes pruebas de ajuste para determinar el rango de trabajo. Para los puntos se utilizó etanol absoluto PA, M 46,07, y luego se montaron los cuatro puntos con las respectivas concentraciones. (tabla 2)

Puntos	Conc. (g/100mL)
1	2,1517
2	4,0973
3	6,1443
4	8,0510

Luego de preparados estos puntos se tomó 1 mL y se diluyó a 100 mL, de aquí se toma el volumen a inyectar que fue de 1 µl, y todos los demás parámetros se mantuvieron como se explica arriba.

Discusión de los Resultados

3.1 Estudio del licor hidrolizado

En la tabla 3 se observa que en un tiempo de 24 h se logra la máxima concentración de azúcares liberados de las cadenas poliméricas, por la acción del complejo enzimático celulolítico, mientras que los demás parámetros observados permanecen prácticamente constantes.

Por otra parte, la curva de calibración realizada para la determinación de azúcares reductores totales por el método del ácido 3.5-dinitro salicílico (DNS), se verifica con un buen coeficiente de correlación de 0,9997, no dando intercepto, lo que indica que no pasa por el origen del centro de coordenadas.

3.2 Estudio de la fermentación alcohólica

En la tabla 4 se observa que a medida que avanza la fermentación alcohólica en el tiempo el contenido de azúcares disminuye producto del consumo de los mismos por las células de levadura, así como la concentración de etanol formado va aumentando hasta concentraciones de 5,000, estando este valor en correspondencia con lo reportado en la literatura. Tabla 4.

Tiempo (h)	ART (g/L)	pH	Agitación	Temp. (°C)
1	0	4,8	150	50
4	30	4,9	150	50
6	32	4,8	150	50
8	34	4,8	150	50
10	38	4,9	150	51
12	42	4,9	150	51
14	46	4,8	150	50
16	48	4,8	150	51
18	48.5	4,8	150	50
20	49	4,8	150	50
22	50	4,8	150	50
24	51	4,8	150	50
26	51	4,8	150	50

Resultados cromatográficos.

Curva de calibración realizada para la cinética de formación de etanol por cromatografía gaseosa, se obtuvo con un coeficiente de correlación de 0,9993. Gráfico en 3D de la curva patrón para la cinética g/100 mL.

Tabla 4.

Hora	pH	Temp (°C)	ART (g/L)	Conc. Alcohol. (g/100ml)
4	4.2	32	114	0.9955
6	4.2	32	108	1.1299
8	4.3	33	98	2.5699
10	4.2	32	83	3.8993
12	4.2	32	75	3.9745
14	4.2	32	61	3.9999
16	4.2	32	48	4.1026
18	4.2	32	36	4.2213
19	4.2	32	23	4.3511
20	4.2	32	15	4.5597
22	4.2	32	10	4.8556
24	4.2	32	8	5.0000
26	4.2	32	8	5.0000

Figura 1. Cromatograma de la hora 10 de fermentación

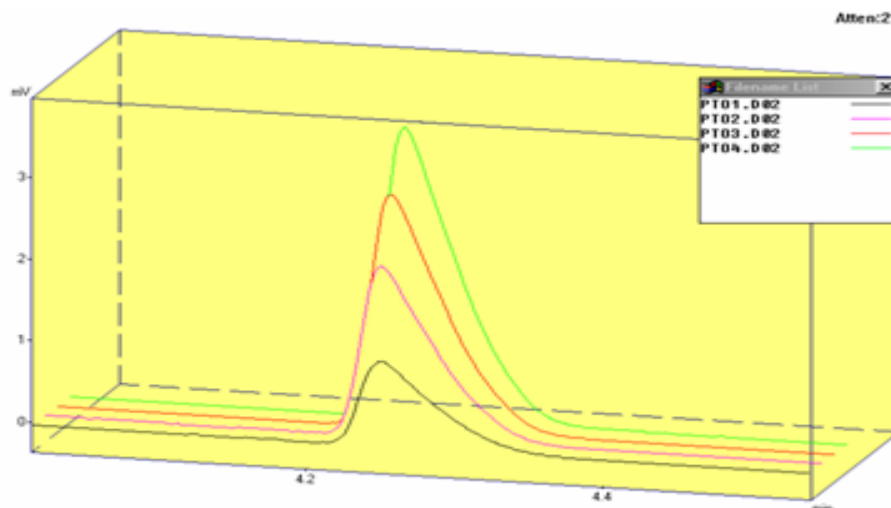


Figura 2. Comparación de los cromatogramas en la cinética de fermentación (4-18 horas)

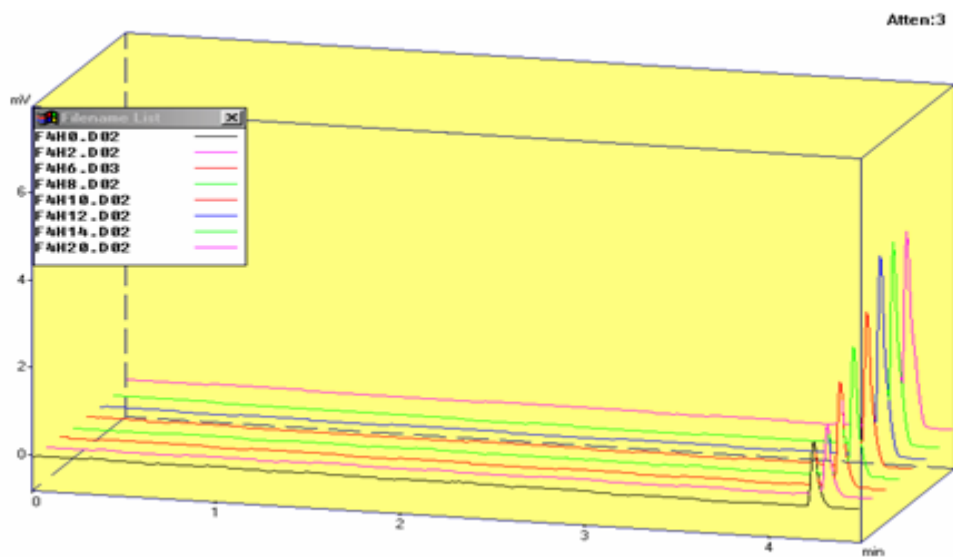
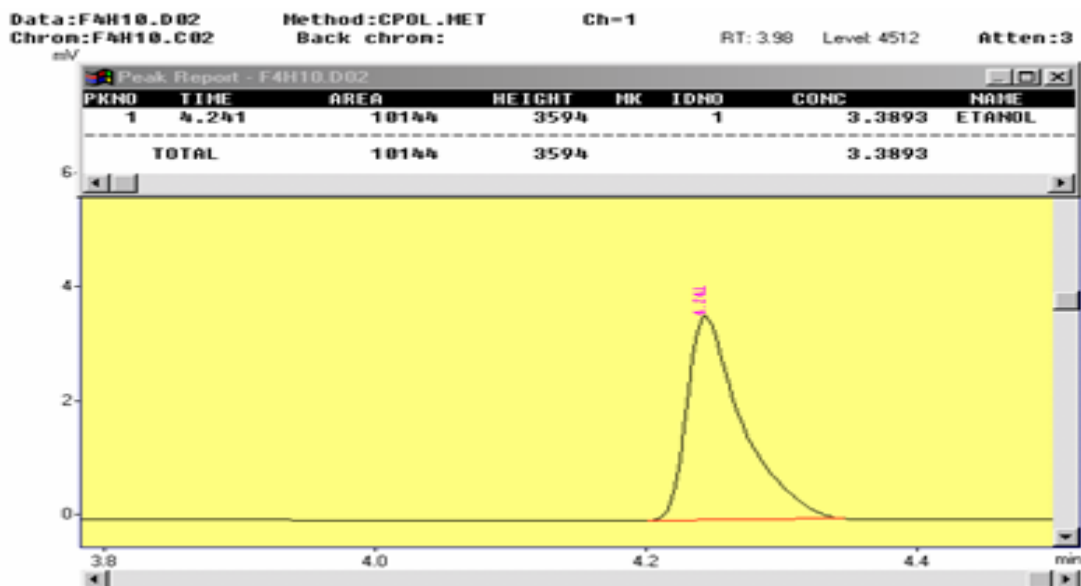


Figura 3. Gráfico en 3D de la curva patrón del etanol de 4 puntos, se identifican y cuantifican los compuestos de acetaldehído, acetato de etilo, acetal, metanol, Propanol, isobutanol, 2metil - 1- butanol y alcohol isoamílico en el etanol rectificado

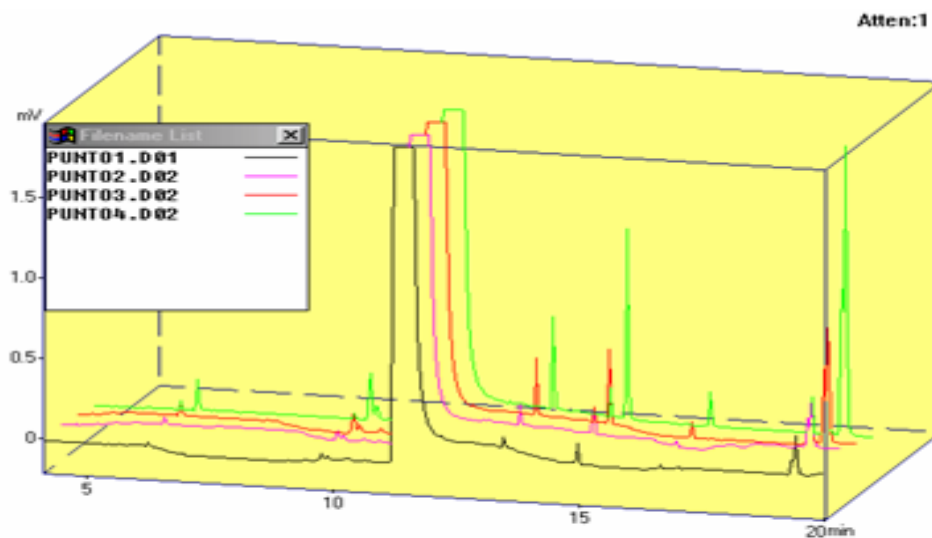


Figura 4.

Aunque la rectificación y caracterización del etanol no constituía objetivo de nuestro trabajo, se pudo lograr la rectificación y caracterización del mismo para el que se utilizó una curva ya elaborada, obteniéndose muy buenos resultados en cuanto a la composición del etanol.

Conclusiones

1 Con la utilización del bagazo de caña de azúcar para la obtención de alcohol se pueden reducir los niveles de consumo de miel quedando esta disponible para otras aplicaciones.

2 Es factible la utilización del hidrolizado enzimático del bagazo de la caña de azúcar en la fermentación alcohólica lo cual está evidenciado por la eficiencia que es de 87,53 %.

3 La cromatografía gaseosa resultó un método eficaz para la identificación y cuantificación de etanol y componentes mayoritarios en el mismo.

Recomendaciones

1 Continuar con la optimización del proceso de obtención de etanol a partir de bagazo de caña para alcanzar concentraciones superiores de etanol.

2 Estudiar condiciones óptimas de mezclado de soluciones azucaradas a partir de diferentes sustratos.

Bibliografía

Panchal, C. y col. Caracterización de levaduras. Rev. Afinidad 457 (52): 50-55; 1995. Fahrasmane, L. y col. Determinación de microcomponentes orgánicos por cromatografía

gaseosa. Memorias. TIPAL'97, Matanzas, Cuba. 1997.

Stryer, Lubert. Biochemistry / Lubert Stryer, W.H.Freeman and Company. New York. 4th Edic., 1995.

Fahrasmane, L. y col. Microbiologic research and rum industry in French West Indies. Trabajo presentado en TIPAL'97. Universidad de Matanzas, Cuba, 1997.

Summer.J.B.J, Biol. Chem. 47, 5 (1921). <http://www.miaula.org/biología/carbohidratos/LA%20Celulosa.ppt>.

<http://www.fsalazar.bizland.com/PQILignina.doc>.

<http://www.fai.unne.edu.or/biología/macromoléculas/azúcar.htm>.

<http://www.gestiopolis.com/.../etanol-y-biocombustibles-en-latinoamerica.htm>.

<http://www.fiqus.unl.edu.or/.../primer taller modelado molecular.ppt>.