

Implementación de una línea de evaluación para subproductos agroindustriales como sustrato para la producción de Bioetanol.

Presacarificación - sacarificación / fermentación simultánea.

Lopretti, M. ⁽¹⁾, López, A. ⁽¹⁾, Rey, F. ⁽¹⁾, Ottati, C. ⁽¹⁾, Damboriarena, A. ⁽¹⁾.

Contacto: mlopre@latu.org.uy

⁽¹⁾Departamento de Bioprocesos y Biotecnología - Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU)

Resumen

El estudio de vías alternativas con mayores rendimientos y bajos costos es en estos días el foco de estudio en el tema Bioetanol, por tal motivo, en el presente trabajo se utilizaron dos cepas de hongos filamentosos; *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*, actuando en diferentes sustratos residuales; orujo de uva, aserrín y torta de girasol provenientes de diferentes industrias nacionales, con el fin de establecer un sistema de evaluación de procesos conjuntos para la producción de alcohol a partir de microorganismos lignocelulósicos. En el diseño de estudio se contemplan la realización de una Presacarificación, con el objetivo de predigerir los sustratos, de forma de homogeneizar los diferentes sustratos acortando de esta forma las etapas posteriores; una Sacarificación enzimática utilizando el extracto de celulasas fúngicas obtenidas por Fermentación semi sólida en el proceso de Presacarificación; y un proceso de Fermentación, el cual involucra un microorganismo termoestable; *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-665), de tal forma que permita reunir los procesos de Sacarificación y Fermentación en forma simultánea.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos establecer que el sistema empleado de FSS previa presacarificación es un buen sistema para la producción de azúcares fermentables y alcohol. Los estudios comparativos realizados con diferentes sustratos demuestran que cuando el soporte es orujo de uva o torta de girasol, se utiliza un mayor porcentaje de los azúcares fermentables disponibles, aproximadamente un 50%.

Los productos de degradación, resultado de la presacarificación, pueden afectar al microorganismo y actuar como potenciales inhibidores de la fermentación, por lo que es crítico realizar estudios que determinen estos productos de degradación y los mecanismos para su reducción. Podemos concluir que el sistema utilizado es efectivo para el almacenamiento de la biomasa en forma estable en el mismo proceso de Presacarificación.

Abstract

The study of alternative routes with better efficiency and low costs is the focus of study in Bioethanol nowadays. For this reason, in this paper we use two kind of filamentous fungi; *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus ostreatus*, cultivating them in different kind of residual substrates; as grape pomace, sawdust and sunflower cake provided by national industries, to establish an evaluation system for the the alcohol production process by lignocellulitic microorganisms.

In this study, we contemplate three assays; a Presaccharification assay to reduce the saccharification time by predigesting the substrates; an enzymatic saccharification assay using the cellulases produced by the semi solid fermentation of the presaccharification process, and a fermentation assay which involved a thermostable microorganism; *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-665) for a simultaneous Saccharification and Fermentation assay.

From the results we could conclude that the system used is suitable for the production of reducing sugars and alcohol. Comparative studies using different substrates demonstrate that there is a great use of reducing sugars when the matrix is grape pomace or sunflower cake, roughly a 50%.

The subproducts from presaccharification can affect the microorganisms and act as inhibitors of the process, which makes critical the study of this degradation products and how to reduce them. Finally, we can conclude that this system is effective for biomass storage in a stable way and in the same presaccharification process.

Introducción

El continuo crecimiento de la demanda energética y la imparable reducción de las reservas petrolíferas mundiales prevé no solo un alza en los precios del petróleo y el gas (superiores a los de referencia) (1), sino que además se estima un incremento en el efecto invernadero [Rubió G., 2005].

Los datos relativos a la escasez mundial de los recursos no renovables (combustibles fósiles), ha abierto el camino al desarrollo de las llamadas fuentes de energías renovables, entre las que se encuentran los biocombustibles [Rubió G., 2005].

Los biocombustibles líquidos (biodiesel y bioetanol) son alcoholes, éteres, ésteres, aceites y otros compuestos químicos, producidos a partir de la biomasa residual [Rubió G., 2005].

Por biomasa residual nos referimos al conjunto de residuos y de subproductos procedentes de diversos sectores que provienen de un proceso biológico y que son de naturaleza orgánica, tal como las plantas herbáceas, oleaginosas y leñosas, residuos de la agricultura y actividad forestal y los subproductos de la industria agroalimenticia [Oyhantçabal W., 2005].

Actualmente la biomasa vegetal es gestionada principalmente mediante su combustión sin aprovechamiento energético, su compostaje o su deposición en vertederos.

Debido a la evolución del potencial de residuos de aserrín y el sostenido proceso de industrialización, fuerte expansión y modernización de las industrias en general, se incrementarán los volúmenes de biomasa residual provenientes de diversas industrias, por lo que se deberán diseñar estrategias y políticas para el uso eficiente de estos recursos renovables a nivel nacional (Oyhantçabal W., 2005).

La obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica de diferentes orígenes a través de un proceso de Sacarificación y Fermentación, requiere un tratamiento previo, (presacarificación) de la biomasa que altere su estructura, facilitando la acción de los enzimas y produciendo un sustrato homogéneo que sea sustrato de la tecnología de producción.

La presacarificación, es el pretratamiento químico o biológico que se le puede hacer a la biomasa amilácea o lignocelulósica con el objeto de obtener mediante una predigestión una matriz formada por oligómeros de celulosa o almidón, según el sustrato, que permitan acortar los tiempos de sacarificación posterior.

Durante el pretratamiento se forma una serie de productos de degradación que pueden afectar al microorganismo; ácidos alifáticos, productos de degradación de azúcares y compuestos aromáticos de degradación de la lignina, actuando como potenciales inhibidores de la fermentación [Ballesteros Perdices, M., 2005].

En el presente trabajo se evaluaron condiciones diferentes de tratamiento de diversos sustratos residuales; orujo de uva (residuo del prensado de uva fresca, procedente de las industrias alcohólicas), aserrín (residuo de la industria forestal) y torta de girasol (residuo obtenido a partir de la extracción del aceite de girasol) con el objetivo de determinar las condiciones óptimas en las cuales determinados organismos (*Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*) utilizan los azúcares fermentables disponibles en dichos sustratos, para la producción de etanol.

Esto se llevó a cabo mediante la evaluación de tres procesos consecutivos; presacarificación, sacarificación y fermentación, en la línea productiva de bioetanol, e incorporando a su vez, nuevas metodologías como la Sacarificación y Fermentación Simultánea.

Materiales y Métodos

Presacarificación

Se utilizó un sistema de fermentación sólida (FS) en columnas utilizando como sustratos: orujo de uva, aserrín y torta de girasol (Figuras 1, 2 y 3).



Figura 1: crecimiento de *T. harzianum* y *Pleurotus ostreatus* en una columna de FS con torta de girasol como sustrato.



Figura 2: crecimiento de *T. harzianum* en una columna de FS con orujo de uva como sustrato.



Figura 3: crecimiento de *T. harzianum* en una columna de FS con aserrín como sustrato.

Las mismas se inocularon con 1% *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*.

La fermentación se realizó durante un mes y medio, durante el cual se tomaron muestras a los 14, 18 y 21 días.

A 30 mL de suero fisiológico se le adicionaron 3 g de dichas muestras previamente molidas. Se mantuvo en agitación en un rango comprendido entre 100 y 200 rpm en un agitador orbital Thermolyne durante 30 min.

Posteriormente se filtró utilizando un cilindro de vidrio con émbolo y filtro de celulosa.

A partir de los filtrados obtenidos se realizaron determinaciones de azúcares reductores totales producidos durante la presacarificación y ensayos de actividad celulasa.

Determinación de azúcares reductores totales por el método de DNS

Se colocaron 0,1 ml del filtrado en un tubo de ensayo y se agregó 1 ml de reactivo DNS. Paralelamente se realizó un blanco con 0,1 ml de agua destilada. Se incubó a 100 °C durante 10 min y midió absorbancia relativa al blanco a 570 nm.

Se realizó una curva de calibración utilizando soluciones de glucosa de 0,8, 1,6, 3,2, 4,8 y 6,4 mg/ml, las cuales se realizaron a partir de una solución estándar de 8 mg/ml.

Determinación de actividad celulasa

Se pesó 1 g de papel de filtro cortado en trozos en un erlenmeyer. Se agregaron 50 ml de buffer pH 6 y 1 ml de filtrado. Se incubó a 37°C durante una hora.

Se realizó un blanco sin el agregado de filtrado

Se determinó la cantidad de glucosa formada a partir de la celulosa del papel mediante la acción de la celulasa, por el método de DNS.

Finalmente se extrajeron los lixiviados correspondientes a las co-

lumnas anteriormente mencionadas, mediante el agregado de 2 litros de agua.

Los lixiviados fueron liofilizados con leche descremada en polvo al 5 %, para lo cual se congelaron a -80 °C y luego se almacenaron por 12 horas en (Liofilizador HETO).

Con el fin de comprobar la presencia de celulasas en el sistema se realizó una SDS-PAGE al 10 %. Las bandas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

Sacarificación y Fermentación

Para cada uno de los sustratos anteriormente mencionados se llevó a cabo una sacarificación para lo cual a 10 g de cada uno de los sustratos se le agregaron 10 ml de buffer fosfato pH 6 y 25 ml de los filtrados respectivos (25U*; U* = 1U/mL enzima) obtenido por Sacarificación/Fermentación Simultánea (Nomenclatura: A1; Torta de Girasol/Pleurotus + Trichoderma, B1; Orujo de uva/Trichoderma, C1; Aserrín/Trichoderma).

Al mismo tiempo se realizó una sacarificación y fermentación simultáneas para lo cual a erlenmeyers preparados en las mismas condiciones que en la sacarificación se le agregaron 2 ml de un inóculo de *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-665) de 1 semana de crecimiento a 25 °C en un medio conteniendo extracto de levadura al 3%, extracto de malta al 3%, bacto peptona al 0.5% y bacto dextrosa al 1% (Nomenclatura: A2; Torta de Girasol/P.ostreatus + T.harzianum/K.marxianus, B2; Orujo de uva/T.harzianum/K.marxianus, C2; Aserrín/T.harzianum/ K.marxianus).

Los erlenmeyers fueron mantenidos durante 2 días a 50 °C. Finalizado éste periodo a todas las muestras se les determinó azúcares reductores y a las muestras A2, B2 y B3 se les determinó el contenido de etanol por Cromatografía Gaseosa - Espectrometría de Masa.

Finalmente se determinó; Fibra detergente ácida (FDA) y Fibra detergente neutra (FDN) según los siguientes protocolos: FDA: PEC QCO MPCC F 003 (Basado en AOAC 16° Ed.1996, método 973.18-4.6.03 Cap.4 pág.28 (Método Fibertec, Foss-Tecator)); FDN: PEC QCO MPCC F 004 (Basado en AACC Método 32-20) (Método Fibertec, Foss-Tecator).

Resultados y Discusión

El sistema de fermentación sólida (FS) en columnas empleado en este trabajo mostró ser un sistema eficaz para la degradación de residuos a partir de las celulasas producidas por las dos cepas empleadas; *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*, mostrando una mayor actividad celulasa el ensayo realizado a partir del lixiviado de la columna que contenía orujo de uva como sustrato inoculado con *T.harzianum*. Los lixiviados a partir de aserrín y torta de girasol mostraron iguales valores de actividad celulasa (Tabla 1).

Muestra	Azúcares reductores totales [glucosa] mg/ml	Actividad celulasa (µmol/ml.h) *
Orujo de uva/T.harzianum t1 (1)	0,29	1,77
Orujo de uva/Trichoderma t2	0,42	1,83
Orujo de uva/T.harzianum t3	0,31	1,77
Lixiviado final orujo de uva/T.harzianum	0,41	1,39
Aserrín/T.harzianum t1 (2)	0,45	1,61
Aserrín/T.harzianum t2 (3)	0,62	1,61
Aserrín/T.harzianum t1	0,67	1,66

Lixiviado final aserrín/T.harzianum	0,28	1,33
Girasol/P.ostreatus + T.harzianum (4)	0,67	1,66
Girasol/P.ostreatus + T.harzianum (5)	0,64	1,94
Girasol/P.ostreatus + T.harzianum (6)	0,61	1,66
Lixiviado final de girasol/P.ostreatus+T.harzianum	4,8	1,33

Tabla 1: Datos de la concentración de azúcares reductores totales y actividad celulasa obtenidos a partir del lixiviado de la columna Orujo-T. harzianum; Aserrín -T. harzianum y Torta de girasol -T. harzianum+P. ostreatus. Actividad celulasa* Actividad enzimática = µmol/ml.h

La presencia de las enzimas en los lixiviados fue visualizada en geles de acrilamida al 10%, mostrando un patrón de bandas más definido cuando se migraron las mismas muestras previamente liofilizadas

(Figuras 4 y 5).

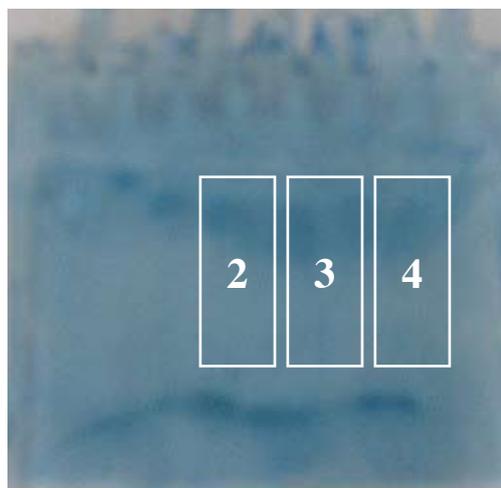


Figura 4; SDS-PAGE 10%, tinción con azul de Coomassie; 2.-Lixiviado orujo de uva/T.harzianum; 3.-Lixiviado torta de girasol/P.ostreatus+T.harzianum; 4.-Lixiviado aserrín/T.harzianum

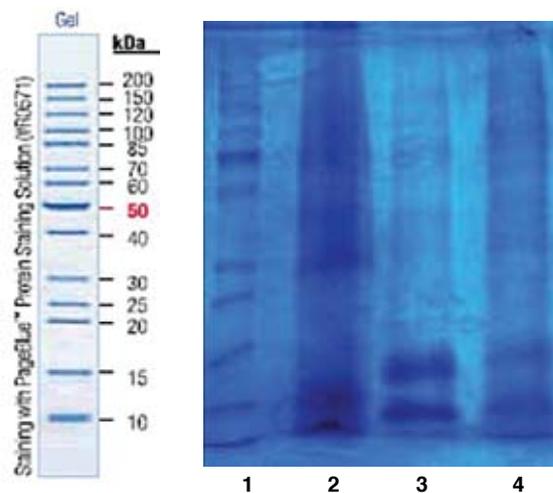


Figura 5: SDS-PAGE 10%, tinción con azul de Coomassie; de izquierda a derecha: P.M. de 10-200kDa, PageRuler Unstained Protein Ladder; lixiviado Torta de Girasol- P. ostreatus/T. harzianum; lixiviado Aserrín-T. harzianum; lixiviado Orujo de uva-T. harzianum.

En la figura 5 se destacan bandas a nivel de los 40-50 kDa que podrían corresponder a la endogluconasas (EG) I y II presentes en muestras de lixiviado Torta de Girasol- *P. ostreatus*/*T.harzianum*; lixiviado Aserrín- *T. harzianum*; lixiviado Orujo- *T. harzianum*.

Se destacan también bandas con pesos moleculares superiores a 50 kDa, éstas podrían corresponder a celobiohidrolasas I y II (codificadas a partir de los genes *cbhI* y *cbhII*).

Las bandas que se observan a nivel de 15 y 20 kDa podrían corresponder a proteasas u otras enzimas presentes en los lixiviados. La separación de cada una de las fracciones del complejo enzimático será motivo de futuros trabajos.

La utilización de azúcares cuando el soporte es aserrín es más lenta teniendo en cuenta el tiempo en el cual se realizó el estudio.

Los azúcares disponibles se utilizan más lentamente en el caso del aserrín (se utilizan el 25% de los azúcares fermentables disponibles) (Tabla 2).

Cuando el soporte es orujo de uva o torta de girasol (se utiliza el 50% de los azúcares fermentables disponibles) por lo que la utilización de azúcares es mayor (Tabla 2).

Este comportamiento probablemente se deba a la presencia de monómeros de lignina, producto de la degradación de la misma que están presentes en la matriz aserrín en mayor porcentaje que en los otros sustratos.

Muestra	Promedio Azúcares reductores totales [glucosa] mg/ml	DN (g/100 g)	FDA (g/100 g)	Etanol (mg/ml)
A1 Girasol	14,9			
A2	17	79	65	0,5
		78	61	
B1 Orujo	74			
B2	43	55	58	1,6
		63	57	
C1 Aserrín	13			
C24	3,5	78	72	0,6
		78	72	

Tabla 2: Datos obtenidos del Promedio de Azúcares reductores totales (expresado como [glucosa] mg/mL), valores de FDN (g/100g), FDA (g/100g) y concentración de etanol producida. A1', A2', B1', B2', C1', C2'. corresponden a duplicados.

Aserrín	PS	0.67 mg/mL x 30 = 20.1mg
	S	13mg/mL A2 x 30 = 390mg
	S + F	3.5 mg/mL A x 30 = 105mg
	EtOH	0.6mg/mL EtOH x 30 = 18 mg EtOH

Orujo de uva	PS	0.42 mg/mL x 30 = 12.6 mg
	S	74mg/mL x 30 = 2220mg
	S + F	43mg/mL x 30 = 1290mg
	EtOH	1.6mg/mL EtOH x 30 = 48mg EtOH

Torta de Girasol	PS	0.61 mg/mL x 30 = 18.3mg
	S	28 mg/mL x 30 = 840mg A2
	F	17 mg/mL x 30 = 510 mg A2
	EtOH	0.5 mg/mL EtOH x 30 = 15 mg EtOH

Tabla 3 : Balance de masas para las columnas conteniendo: Aserrín ; Orujo de uva y Torta de girasol como sustrato. PS = presacarificación; S = sacarificación; S + F = sacarificación + fermentación; EtOH = etanol.

Conclusiones

El estudio de distintos sustratos residuales gana importancia a la hora de pensar en un aprovechamiento de subproductos de la agroindustria y es necesario ajustar tecnologías y mejorar rendimientos ya que las materias primas son mezclas de distintas especies moleculares, que actúan tanto en forma indefinida como de promoción o de inhibición.

En futuros trabajos comenzaremos a estudiar cada uno de los pasos presacarificación, sacarificación y fermentación simultánea, haciendo especial hincapié en la realización de estudios de aquellos eventos que incrementan la producción de elementos tóxicos en dichos procesos, con el objeto de obtener mejores rendimientos en el proceso global. La optimización de esta metodología permitirá mejorar los rendimientos productivos de bioetanol en base a disminuir costos de inversión, disminuir costos operativos y mejorar los rendimientos de fermentación.

Referencias

- Perspectivas de la evolución mundial hasta 2030 en los ámbitos de la energía, la tecnología y la política climática. Disponible en: www.europa.eu.int/comm/research/energy
- Rubió, Gustav. 2005. Los biocombustibles : situación actual, análisis y perspectivas de la producción en el MERCOSUR y del comercio con la UE. Disponible en: www.fao.org/sd/dim_en2/docs/working1_es.doc
- Oyhançabal, Walter. 2005. Biomasa forestal para producción de energía en Uruguay: una visión desde la oferta. Disponible en: www.iram.com.ar/Eventos/OPET_OLA/Ponencias/session3/forestal%20oyhantcabal.pdf
- Oliva Domínguez, José Miguel. 2004. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre "Kluyveromyces marxianus". Disponible en: <http://www.ucm.es/eprints/4804/>

Nota: Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto Avances en Bioetanol.