

Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pre tratado

GUARNEROS-FLORES, Javier†, LOPEZ-ZAMORA, Leticia* y AGUILAR-USCANGA, María.

División de estudios de posgrado e investigación, Instituto Tecnológico de Orizaba, Oriente 9 No.582 Col. Emiliano Zapata C.P. 94320 Orizaba Veracruz

Recibido Octubre 14, 2016; Aceptado Noviembre 2, 2016

Resumen

El objetivo de la presente investigación consistió en optimizar el proceso de hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce a escala laboratorio, maximizando la obtención de glucosa. El bagazo fue sometido a pretratamiento ácido y alcalino con la finalidad de reducir la hemicelulosa y la lignina respectivamente. Finalmente se optimizó el proceso enzimático aplicando un diseño de experimentos Box Behnken, utilizando la enzima Cellic CTec3, se consideraron tres variables independientes (tiempo, % p/p de enzima y relación líquido-sólido) siendo la variable de respuesta la glucosa (g/L). El experimento se realizó en base húmeda (modo continuo) y base seca (implementando un periodo de secado después de cada etapa del proceso). El análisis estadístico de los datos obtenidos permitió determinar que las mejores condiciones son: 5 % p/p de enzima, tiempo de reacción de 51 h, y una relación líquido-sólido de 5:1, obteniendo valores superiores a los 120 g/L de glucosa. Es posible concluir que los pretratamientos aplicados son excelentes removedores de hemicelulosa (86 %) y lignina (85 %) facilitando la posterior degradación de la celulosa mediante el ataque enzimático, obteniendo de manera experimental hasta un 27.66 % más de glucosa respecto a lo predicho por el modelo óptimo obtenido.

Hidrólisis, bagazo sorgo dulce, glucosa, enzima

Abstract

The objective of this research was to optimize the enzymatic hydrolysis process from sweet sorghum bagasse in laboratory scale, maximizing the production of glucose. Bagasse was subjected to acid and alkaline pretreatment in order to reduce the hemicellulose and lignin respectively. Finally, the enzymatic process was optimized using an experimental design Box Behnken and using the enzyme Cellic CTec3, three independent variables (time, % w/w enzyme and liquid-solid ratio), being glucose (g/L) the response variable. The experiment was conducted on a wet basis (continuously) and dry basis (with a period of drying after each stage of the process). Statistical analysis of the data allowed to determine that the best conditions are: 5% w/w of enzyme, reaction time of 51 h, and liquid-solid ratio of 5:1, obtaining values higher than 120 g/L glucose. We conclude that the pretreatments applied are excellent removers hemicellulose (86%) and lignin (85%) facilitating subsequent degradation of cellulose by enzymatic attack, obtaining experimentally up to 27.66 % more glucose regarding predicted by the optimal model obtained.

Hydrolysis, sweet sorghum bagasse, glucose, enzyme

Citación: GUARNEROS-FLORES, Javier, LOPEZ-ZAMORA, Leticia y AGUILAR-USCANGA, María. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pre tratado. Revista de Investigación y Desarrollo 2016, 2-6: 75-81

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: letylopezito@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La necesidad de soluciones ante los altos índices de contaminación así como el agotamiento de los combustibles fósiles obliga a investigar nuevas formas de reducir la generación de desechos y a tratar de producir energía más limpia. Una alternativa se encuentra en la producción de biocombustibles de segunda generación, es decir, aquellos que son generados a partir de los diferentes residuos lignocelulósicos existentes en diversos procesos, siendo el bioetanol uno de los más importantes y fáciles de obtener.

Dentro de las materias primas alternativas que están alcanzando importancia mundial para la producción de bioetanol se encuentra el sorgo dulce, definido como un cultivo bioenergético promisorio por su gran producción de masa verde, mínimos requerimientos generales y su tolerancia a sequías e inundaciones. La subespecie sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es una variedad azucarada de sorgo, que se desarrolla adecuadamente en terrenos alcalinos en presencia de carbonato cálcico, lo que aumenta el contenido en sacarosa en tallos y hojas. El sorgo dulce es un cultivo con un tallo rico en azúcares fermentables (16-23 °Brix), por lo que es comparable con la caña de azúcar (Montes et al. 2010).

Una de las características principales del sorgo dulce es el alto contenido energético comparable con el de la caña de azúcar, considerando hasta tres cosechas por año haciendo de esta planta un candidato ideal para la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables. Dicho cultivo prospera en condiciones mucho más secas y calurosas de lo que muchos otros cultivos pueden hacerlo y es por esta razón que ha sido llamado el “camello” de los cultivos de campo (Medina et al. 2011).

La biomasa lignocelulósica del sorgo dulce (bagazo) presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa cuyas cadenas de glucosa se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad, su íntima asociación con la lignina dificultan su hidrólisis para la obtención de azúcares fermentables (Viñals et al. 2012).

El efecto de los pretratamientos en materiales lignocelulósicos ha sido reconocido en el tiempo. El propósito de los pretratamientos es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad del material (Agbor et al. 2011).

Hidrólisis literalmente significa destrucción o descomposición de una sustancia, en el caso de la hidrólisis enzimática la descomposición se lleva a cabo mediante el uso de enzimas. El uso correcto del tipo de enzimas depende de los pretratamientos aplicados al bagazo de sorgo dulce (BSD), es decir si se aplica un tratamiento ácido automáticamente se estaría eliminado la hemicelulosa y posteriormente con un tratamiento alcalino se lograría romper la lignina quedando la celulosa libre para ser tratada enzimáticamente y con ello únicamente utilizar una celulosa capaz de desdoblar la mayor cantidad de azúcares potencialmente fermentables (Chuck et al. 2011).

El objetivo del estudio fue determinar las mejores condiciones de trabajo en la hidrólisis enzimática del BSD a fin de maximizar la generación de glucosa la cual es susceptible a una posterior fermentación y destilación.

Metodología

Se molieron 10 Kg de sorgo dulce, recuperándose 6.1 Kg de bagazo, posteriormente el BSD se sometió a secado solar durante 48 h con la finalidad de eliminar la mayor parte de agua presente. Tras el secado solar, se procedió a la reducción de tamaño mediante una cortadora manual, en virtud de que un menor tamaño de la materia prima, incrementa la eficiencia de los pretratamientos aplicados debido a que existe una mayor superficie de contacto, finalmente se determinó la humedad final del bagazo antes de proceder con la experimentación.

Una vez acondicionada la materia prima, el BSD se sometió a un pretratamiento ácido utilizando H_2SO_4 al 1.5 % en una relación líquido sólido (RLS) de 5:1, en matraces de 500 ml en un autoclave marca AESA modelo CV-250 a una presión de 15 psia (1.2 Kg/cm^2), durante 33 min, cuando el proceso estuvo completo, el bagazo fue prensado y lavado 2 veces con agua común en una RLS de 5:1, pesando el bagazo húmedo obtenido y secándolo por 48 h mediante radiación solar. Es importante considerar el tiempo de calentamiento y enfriamiento de la resistencia de la autoclave debido a que la exposición prolongada del hidrolizado ácido a altas temperaturas podría derivar en la degradación de los azúcares.

La deslignificación del bagazo se realizó mediante la acción de un pretratamiento alcalino utilizando H_2O_2 al 4 % en una RLS de 16:1, ajustando el pH a 11.5 utilizando NaOH 10 M. La reacción se llevó a cabo por 45 h para finalmente separar la fracción líquida de la sólida, mediante un prensado manual, y a esta última realizarle nuevamente 2 lavados con agua del grifo en una relación líquido sólido de 5:1 a fin de eliminar los rastros de lignina aun presentes. Nuevamente se aplicó un secado solar de 48 h para continuar con la siguiente etapa del proceso.

Para la etapa enzimática, se planteó un diseño experimental Box Behnken (tabla 1). Se consideraron como variables independientes: la carga enzimática en relación p/p (5, 6 y 7 %), la RLS (5:1, 7:1 y 9:1) y el tiempo de reacción (24, 48, y 72 h) y como variable de respuesta la concentración de glucosa (g/L) cuantificados mediante HPLC, usando una agitación constante de 250 rpm y una temperatura de 50 °C, (temperatura óptima de la Cellic CTec3).

Muestra	Enzima (% p/p)	Tiempo (h)	RLS
1	4	24	7:1
2	6	24	7:1
3	4	72	7:1
4	6	72	7:1
5	4	48	5:1
6	6	48	5:1
7	4	48	9:1
8	6	48	9:1
9	5	24	5:1
10	5	72	5:1
11	5	24	9:1
12	5	72	9:1
13	5	48	7:1
14	5	48	7:1
15	5	48	7:1

Tabla 1 Diseño Box-Behnken para la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo pretratado

Para preparar las muestras, se empleó CH_3COONa 0.05 molar como fase líquida inicial variando las cantidades de bagazo pretratado de acuerdo a las diferentes RLS, así mismo se ajustó el pH a 5.0, valor óptimo al que trabaja la enzima celulasa Cellic CTec3.

La inactivación de la enzima se realizó mediante un choque térmico exponiendo las muestras a baños de 10 min en agua hirviendo y 10 min en agua fría, finalmente se separó la fase Líquida de la sólida por centrifugación, la primera fue analizada en el HPLC introduciendo cada uno de los resultados al software NCSS 2007 para completar el diseño experimental y obtener las condiciones óptimas de trabajo del proceso enzimático.

La experimentación en base húmeda siguió la misma metodología realizada en base seca con la diferencia de que durante toda la experimentación no hubo ninguna etapa de secado, convirtiéndolo en un proceso continuo.

Resultados

Los resultados de la composición porcentual del bagazo se muestran en la tabla 2.

Bagazo	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Otros (%)
Crudo	39.54	29.83	22.21	8.42
Ácido	60.70	4.20	28.80	6.30
Alcalino	79.03	6.68	4.25	10.04

Tabla 2 Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce en sus diferentes etapas

El porcentaje de remoción de hemicelulosa fue calculado después del pretratamiento ácido mediante la ecuación 1, obteniendo un total del 86 % de remoción, 6.17 % superior a lo reportado por Chen et al. (2007).

$$\% \text{ Rem}_{\text{Hem}} = \left[\frac{\% \text{ Hem}_i - \% \text{ Hem}_f}{\% \text{ Hem}_i} \right] * 100 \quad (1)$$

Empleando la ecuación 2, se determinó el porcentaje de remoción de lignina, logrando eliminar hasta un 85 % de esta, resultado superior en un 17 % respecto a lo obtenido por Viveros et al. (2014).

$$\% \text{ Rem}_{\text{Lig}} = \left[\frac{\% \text{ Lignina}_i - \% \text{ Lignina}_f}{\% \text{ Lignina}_i} \right] * 100 \quad (2)$$

Las concentraciones de glucosa obtenidas a partir del diseño experimental se presentan en la tabla 3, oscilando entre los 55.42 y 99.60 g/L en base seca y 85.12 y 156.12 g/L en base húmeda, generando los mejores resultados en las pruebas 5 y 6 en base seca y 5 y 10 en base húmeda.

Muestra	Base Seca (g/L)	Base Húmeda (g/L)
1	63.7712	95.25
2	71.9412	113.25
3	86.3650	130.82
4	71.8150	117.52
5	95.1125	147.45
6	99.6062	112.85
7	62.1312	86.82
8	63.8662	96.65
9	88.5012	110.55
10	88.4687	156.125
11	55.4287	85.12
12	67.4553	92.86
13	77.0412	95.045
14	78.2412	120.87
15	75.4937	118.29

Tabla 3 Resultados obtenidos a partir del diseño experimental para la obtención de glucosa

El análisis estadístico realizado mediante el software NCSS generó el modelo matemático presentado en la ecuación 3, correspondiente a la experimentación en base seca con un ajuste del 95.05 % y una respuesta teórica de 97.07 g/L de glucosa, cumpliendo con las condiciones óptimas de trabajo de carga enzimática (CE) = 5 % p/p, tiempo (t) = 51 h y RLS = 5:1.

$$\text{Glucosa}_{(g/L)} = -28.34 - 26.14 * \text{CE} + 2.27 * t + 12.17 * \text{RLS} + 3.38 * \text{CE}^2 - 0.012 * t^2 - 0.33 * \text{RLS}^2 - 0.23 * \text{CE} * t + 0.26 * \text{CE} * \text{RLS} + 0.009 * t * \text{RLS} \quad (3)$$

Mientras que para la experimentación en base húmeda se generó el modelo presentado en la ecuación 4, con un ajuste del 92.62 % (ajuste inferior al obtenido en base seca) y una respuesta teórica de 130 g/L de glucosa, cumpliendo con las condiciones óptimas de trabajo de carga enzimática = 5 % p/p, tiempo = 48 h y RLS = 5:1.

$$\text{Glucosa}_{(g/L)} = -239.05 + 39.43 * \text{CE} + 0.526 * t + 7.49 * \text{RLS} + 1.293 * \text{CE}^2 + 0.003 * t^2 - 0.033 * \text{RLS}^2 - 0.32 * \text{CE} * t + 0.74 * \text{CE} * \text{RLS} + 0.025 * t * \text{RLS} \quad (4)$$

Las condiciones de trabajo óptimas obtenidas para ambos procesos (tiempo, RLS y Carga enzimática) fueron comprobadas de manera experimental, realizando una prueba con su respectiva replica para cada una. Las concentraciones de glucosa obtenidas en ambas hidrólisis se muestran a partir de la tabla 4.

Modalidad	Glucosa (g/L)
Base seca	125.20
Base Húmeda	148.64

Tabla 4 Concentraciones de glucosa (g/L) obtenidas mediante la comprobación de las condiciones óptimas en base seca y húmeda

La figura 1 muestra una superficie de respuesta generada a partir de los resultados obtenidos combinando los efectos del tiempo (h) vs RLS (mL/g) vs glucosa obtenida (g/L) para la línea en base seca en donde se observa que la mayor generación de glucosa ocurre con una RLS de 20 lo equivalente a 5 mL/g, además de que a partir de las 50 h ya no existe un incremento considerable de glucosa, corroborando las condiciones óptimas proporcionadas por el NCSS.

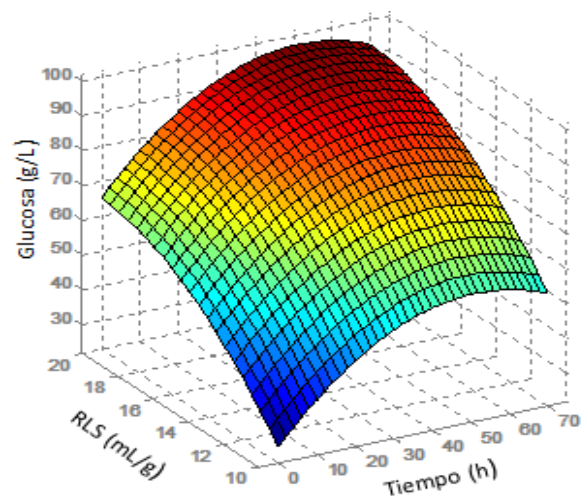


Gráfico 1 Superficie de respuesta del contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática del efecto de Tiempo (h) vs RLS (mL/g)

Discusión

La cantidad de fibra determinada en el bagazo de sorgo dulce crudo presenta una composición similar a las obtenidas por otros autores (Prasad, 2007; Kim et al. 2007) en cuanto a celulosa, hemicelulosa y lignina tal como se observa en la tabla 5, además de estar dentro de lo obtenido por Montes et al. (2010).

Autores	Contenido de Fibra (%)			
Prasad (2007)	46	27	20	3 - 5
Kim et al. (2007)	44.8	25.9	20.1	9.2
Montes et al. (2010)	35 – 50	15 - 25	20 - 30	-----
Presente Trabajo	39.54	29.83	22.21	8.42

Tabla 5 Comparación del contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce crudo

La mayor concentración de glucosa generada en base seca fue de 99.60 g/L, lo cual significa un incremento del 79.71 % en comparación a los resultados obtenidos por Nochebuena et al. (2012) a partir de bagazo de caña que fue de 55.42 g/L. Siendo las pruebas 5 y 6 las que mostraron la mayor conversión 95.11 y 99.60 g/L respectivamente ambas con un tiempo de reacción de 48 h.

La concentración de glucosa generada mediante la comprobación de las condiciones óptimas obtenidas para el proceso en base seca (125.20 g/L), resultó superior en un 27.66 % respecto a la respuesta teórica predicha por el modelo que fue de 97.07 g/L, mientras que la obtenida en base húmeda (148.64 g/L) representa un incremento del 18.71 % de glucosa en comparación con la concentración de 130 g/L establecida por su respectivo modelo matemático, además de la disminución del 6 % en el tiempo de reacción de 51 h en base seca a 48 h en base húmeda, dicho resultado puede ser atribuido a la presencia de agua dentro de la materia prima lo cual beneficia la actividad enzimática y su consiguiente penetración de la fase líquida dentro de la celulosa de acuerdo a lo observado en ambas líneas experimentales.

En ambos procesos es posible comprobar que los tiempos prolongados de reacción en la etapa enzimática son innecesarios, además de destacar que el ajuste presentado por ambos modelos matemáticos resultó superior al 90 %, lo cual garantiza la reproducibilidad de ambos procesos.

El proceso enzimático del BSD presenta una mayor eficiencia cuando se realiza en base húmeda (modo continuo), sin embargo se declina por llevarlo a cabo en base seca debido a la falta de espacios para el almacenamiento de la materia prima la cual es susceptible a la descomposición por el ataque de microorganismos los cuales proliferan en presencia de humedad y pueden causar la putrefacción del bagazo, caso contrario al proceso en base seca el cual alarga la vida útil de la materia prima sin representar una disminución drástica en la producción de glucosa y mucho menos un aumento considerable en el tiempo de reacción del proceso enzimático.

Agradecimientos

Se hace un agradecimiento especial al Instituto Tecnológico de Veracruz por permitir hacer uso de las instalaciones del laboratorio de Bioingeniería, así mismo se agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) el cual brindó la oportunidad de llevar a cabo los análisis lignocelulósicos de la materia prima dentro de sus instalaciones utilizando todo el material y equipo de trabajo necesario. Al TecNM, por el financiamiento otorgado a través del proyecto 5831.16-P

Conclusiones

Al término de esta investigación es posible afirmar que el bagazo de sorgo dulce es un excelente portador de azúcares potencialmente fermentables presentando concentraciones incluso superiores a las de la caña de azúcar, además de que los pretratamientos empleados ácido y alcalino son capaces de remover hasta un 86 % de hemicelulosa y un 85 % de lignina respectivamente, facilitando el posterior ataque enzimático.

Dentro de la hidrólisis enzimática, se comprobó que los procesos desarrollados tanto en base seca como en base húmeda, proporcionan concentraciones de glucosa similares y superiores a los 120 g/L. Finalmente se ratifica la eficiencia de la celulasa Cellic CTec3 de Novozymes empleada en la degradación de la celulosa tratada, favoreciendo los buenos resultados generados.

Referencias

Agbor, B. V., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin D. (2011). *Biotechnology Advances. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application.* 29, 675:685.

Chen, Y., Sharma, R., & Chen, C. (2007). Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme engineering and biotechnology.* 142:276-290.

Chuck, H. C., Carrillo, E. P., & Serna, H. S. (2011). Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 10 (3):529-549.

Kim, H. J., Kim, S. B., & Kim, C. J. (2007). The effects of nonionic surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. *Biotechnology and Bioprocess engineering.* 12:147-151.

Medina, M. M. A., Fernández, L. L., Aguilar, C. L., & De la Garza, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 3(6), 35-41.

Montes, G. N., Quintero, P. V., López, C. M. E., & García, A. M. (2010). RB. Cañero: sorgo dulce [*sorghum bicolor (L.) Moench*] para la producción de etanol. Folleto técnico 43. ISBN: 978-607-425-355-9.

Nochebuena, M. L. E., López, Z. L., Aguilar, U. M. G., & Dominguez, G. C. X. (2012). Optimización del tratamiento oxidativo sobre la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar empleando superficie de respuesta. *Revista Latinoamericana de Química* ISSN 0370-5943.

Prasad, S., Singh, A., Jain, N., & Joshi, H. C. (2007). Etanol Production from Sweet Sorghum Syrup for utilization as automotive fuel in India. *Energy fuels* 21 (4):2415-2420.

Viñals, V. M., García, B. A., Álvarez, M. G., & Ramil, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). 7-16.

Viveros, R. I. P., López, Z. L., & Partida, S. G. (2014). Maximization of glucose production using hydrogen peroxide as an alkaline pretreatment of sweet sorghum bagasse. *Journal of chemical, Biological and Physical Sciences.* ISSN 2249-1929 (4) 3-2