

Tratamiento hidrolítico de *Luffa Cylindrica* (LC) para la obtención de azúcares reductores

Hydrolytic treatment of *Luffa Cylindrica* (LC) for reducing sugars producing

Ana Cristina Chávez Mejía¹; Luis Eduardo Díaz Barrero¹; Gabriel Alberto Ortegón Rey¹; A. López - Vásquez^{2*}.

¹Department of Chemical Engineering, Universidad de La Sabana, Campus Universitario del Puente del Común, Km 7, Autopista Norte, Chía.

²Department of Environmental Engineering, Universidad Libre, Av Cr 70 # 53-40, Sede Campus Bosque, Bogotá, Colombia.
*andresf.lopez@unilibrebog.edu.co.

Fecha de recepción del artículo: 30/05/2013 Fecha de aceptación del artículo: 05/06/2013

Resumen

En este trabajo se evaluó la producción de azúcares reductores a partir de hidrólisis de *Luffa Cylindrica* (LC). Se determinó el contenido de celulosa (82,54%) y lignina (9,73%), de la materia prima y se redujo de tamaño, mediante un molino de cuchillas hasta malla 100. El máximo contenido de azúcares reductores obtenidos fue 1.207 mg/mL, 1.493 mg/mL y 2.441 mg/mL para las hidrólisis ácida, básica y enzimática, respectivamente. Un diseño tipo Box-Behnken, permitió determinar las condiciones óptimas de pH, tiempo y temperatura para las hidrólisis ácida (pH 4.0, 60 min, 150°C) y básica (pH 10.0, 30 min, 112.5°C), así como pH, volumen de celulosa, y temperatura para la hidrólisis enzimática (pH 6.2, 2.39 mL y 42.4°C). Se realizaron estudios fermentativos con *Saccharomyces Cerevisiae* inmovilizada, a diferentes condiciones, con el fin de validar los modelos obtenidos en cada tipo de hidrólisis y se alcanzaron rendimientos del orden del 10% en contenido de alcohol, para los tratamientos estudiados.

Palabras clave

Alcohol celulósico, Hidrolisis, *Luffa Cylindrica*, Metodología de superficie de respuesta.

Abstract

In this study, reducing sugars production by *Luffa Cylindrica* (LC) hydrolysis was evaluated. The cellulose and lignin content (82.54% and 9.73%) of raw material, was determined and reduced in size by a cutter mill to a size of 100 mesh. The maximum reducing sugar content obtained was 1.207 mg/mL, 1.493 mg/mL and 2.441 mg/mL for acid, basic and enzymatic hydrolysis respectively. The optimal conditions of pH, time and temperature for acid hydrolysis (pH 4.0, 60 min, 150°C), alkaline hydrolysis (pH 10, 30 min, 112.5 °C) and enzymatic hydrolysis to pH, amount of cellulose and temperature (pH 6.2, 2.39 mL, 42.4°C) were determined by a design type Box-Behnken. Fermentation studies were performed with immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* at different conditions in order to validate models obtained for each type of hydrolysis and achieved yields of 10% ethanol content for treatments studied.

Keywords

Cellulosic ethanol, Hydrolysis, *Luffa Cylindrica*, Response surface methodology.

1. Introducción

El etanol, adicionado a la gasolina, se obtiene a partir de la fermentación de azúcares reductores provenientes de productos vegetales, que generalmente son: cereales, remolacha y caña de azúcar. La producción de etanol en Colombia proviene exclusivamente de la fermentación de jugos de caña de azúcar, a pesar de que el país cuenta con gran variedad de recursos lignocelulósicos. Sin embargo no se han realizado investigaciones sobre sus beneficios, ni tampoco se ha evaluado la posibilidad de utilizarlos como materia prima para la obtención de bioetanol, como es el caso de la *Luffa Cylindrica*. El principal mercado de este material es la industria cosmética, sin embargo debido a su alto contenido de celulosa y lignina, y su amplia presencia en el territorio colombiano, se constituye en una buena opción como materia prima para la obtención de etanol [1].

El material lignocelulósico está constituido por tres polímeros estructurales: hemicelulosa, celulosa y lignina; componentes que hacen de ella un sustrato de enorme valor biotecnológico. Además de esto y debido a su alto contenido de azúcares fermentables, la biomasa ha merecido particular atención como sustrato alternativo en la producción de etanol. Para obtener los azúcares de la biomasa, ésta debe ser tratada con ácidos o enzimas que facilitan su obtención. La celulosa y hemicelulosa, son hidrolizadas por enzimas ó diluidas por ácidos para obtener sacarosa, que es entonces fermentada. Los principales métodos para obtener estos azúcares son tres: la hidrólisis con ácidos concentrados y diluidos, la hidrólisis básica, y la hidrólisis enzimática [2].

Para la obtención de alcohol etílico, a partir de biomasa lignocelulósica, se han utilizado productos tales: como residuos de madera, maíz, bagazo de caña de azúcar, paja, cascarilla de arroz, residuos de algodón, entre otros. Sin embargo, no se conocen trabajos en los cuales la fuente de biomasa lignocelulósica, para la obtención de bioetanol, sea la LC. Para los anteriores productos, el procedimiento para obtener alcohol lignocelulósico, consta de las etapas :pretratamiento de la biomasa, hidrolisis, fermentación y destilación [3].

La composición química de la LC, depende de varios factores como: el origen de la planta, condiciones ambientales, naturaleza del suelo, etc. Por ejemplo: los contenidos de celulosa varían de 55 a 90%, el contenido de lignina está dentro del rango de 10 a 23%, el contenido de hemicelulosa está alrededor de 8 a 22% y cenizas cercanas al 0.4%. La *Luffa Cylindrica* producida en el Valle del Cauca-Colombia, está compuesta por un 7.6 % de agua y 0.71% en cenizas (hecho que evidencia que en la composición existe una mínima cantidad de materia inorgánica). Tiene un poder calorífico de 3644 cal/g y presenta resistencia a temperaturas relativamente altas [4]. Es común encontrarle usos a la LC como esponja de baño, pero también es utilizada a nivel industrial como materia prima para la elaboración de filtros para agua y aceite, así como para calderas y destilerías, rellenos para muebles y embalajes, planchas acústicas, fabricación de papel, cartón, entre otros. El principal mercado de la LC es la industria cosmética y pocas investigaciones han sido dedicadas a su estudio como fuente de fibras. Debido a su composición (alto contenido de celulosa y hemicelulosa, y bajo contenido de lignina), se constituye en una opción como materia prima para la obtención de etanol celulósico [5].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la obtención de azúcares reductores a partir de la hidrólisis ácida, alcalina y enzimática de la LC, y la fermentación de los mismos con *Saccharomyces Cerevisiae*, para la producción de etanol.

2. Metodología

2.1 Caracterización de LC

El contenido de lignina y celulosa presentes en la LC, se determinó mediante la norma TAPPI T 222 os-74 y TAPPI T 203 os-74 respectivamente [6].

2.2 Hidrólisis ácida básica y enzimática

Para los ensayos, se utilizó una muestra de 1 g de LC que fue tratada con 100 ml de solución de ácido

sulfúrico, hidróxido de sodio o celulosa. Las hidrólisis, se llevaron a cabo a presión atmosférica, mediante ebullición a reflujo. Las variables de estudio, fueron tiempo de reacción (30–60) min, temperatura (100–150)°C y pH (2.0–4.0 y 9.0–11.0 para hidrólisis ácida y alcalina respectivamente). Para la hidrólisis enzimática, las variables de estudio fueron el pH (5.0–7.0); la temperatura (40–60) °C y volumen de celulosa (1–3) mL durante 8 horas de tratamiento. Una vez terminadas las corridas experimentales, se detuvieron las reacciones mediante enfriamiento rápido y el producto hidrolizado se filtró para su posterior análisis. El contenido de azúcares reductores, se cuantificó mediante el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar [7]. Las lecturas de la absorbancia se midieron a $\lambda=584$ nm.

2.3 Diseño experimental

Para evaluar el efecto de las variables de proceso, en cada uno de los tratamientos, se desarrolló un diseño Box–Benkhem para las hidrólisis ácida, alcalina y enzimática. Los tratamientos se muestran en la Tablas 1– 3.

El análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó mediante el empleo del paquete estadístico Design Expert 7.1 versión de prueba. las condiciones óptimas para los tres tratamientos, se obtuvieron mediante la metodología de superficie de respuesta.

2.4 Estudio cinético de la fermentación

Para realizar los estudios cinéticos y validar cada modelo estadístico determinado, se eligió el tratamiento que produjo mayor contenido de azúcares reductores en cada hidrólisis. Así, se eligieron los experimentos 17 (Tabla 1), 10 (Tabla 2) y 06 (Tabla 3). Cada filtrado obtenido (ácido, alcalino y enzimático) fue sometido a fermentación anaeróbica con *Saccharomyces Cerevisiae*, inmovilizada en alginato de calcio. Durante los ensayos fermentativos, se evaluó el consumo de sustrato durante 48 horas de

Tabla 1. Diseño experimental para la obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida.

Experimento	Temperatura (A), °C	pH (B)	Tiempo (C), min	Azúcares reductores, mg mL ⁻¹
1	100	2.0	45	1.054
2	125	2.0	60	1.077
3	125	2.0	30	1.105
4	150	2.0	45	1.016
5	125	3.0	45	1.041
6	150	3.0	30	1.105
7	125	3.0	45	1.048
8	150	3.0	60	1.089
9	100	3.0	60	1.048
10	125	3.0	45	1.045
11	125	3.0	45	1.091
12	125	3.0	45	1.093
13	100	3.0	30	1.143
14	125	4.0	30	1.073
15	100	4.0	45	1.175
16	125	4.0	60	1.116
17	150	4.0	45	1.207

Tabla 2. Diseño experimental para la obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis alcalina.

Experimento	Temperatura (A), °C	Tiempo (B), min	pH (C)	Azúcares reductores, mg mL ⁻¹
1	125	45	10.0	1.331
2	125	60	11.0	1.315
3	125	30	11.0	1.322
4	100	45	11.0	1.301
5	150	45	9.0	1.233
6	150	45	11.0	1.251
7	150	30	10.0	1.223
8	125	45	10.0	1.431
9	125	30	9.0	1.436
10	100	30	10.0	1.493
11	125	45	10.0	1.267
12	125	45	10.0	1.402
13	125	60	9.0	1.303
14	125	45	10.0	1.310
15	150	60	10.0	1.347
16	100	60	10.0	1.294
17	100	45	9.0	1.146

Tabla 3. Diseño experimental para la obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis enzimática.

Experimento	Temperatura (A), °C	pH (B)	Volumen de celulosa (C), mL	Azúcares reductores, mg mL ⁻¹
1	50	6.0	2.0	1.203
2	50	6.0	2.0	1.367
3	50	5.0	1.0	1.472
4	50	7.0	1.0	1.561
5	50	6.0	2.0	1.434
6	40	6.0	3.0	2.441
7	60	6.0	3.0	1.374
8	50	5.0	3.0	1.833
9	50	7.0	3.0	1.577
10	60	6.0	1.0	1.376
11	40	5.0	2.0	1.899
12	60	7.0	2.0	1.312
13	40	7.0	2.0	2.011
14	50	6.0	2.0	1.667
15	60	5.0	2.0	1.509
16	40	6.0	1.0	1.454
17	50	6.0	2.0	1.422

tratamiento. El consumo de sustrato, se determinó evaluando el contenido de azúcares reductores con la técnica de DNS. El consumo de sustrato (CS), se cuantifico mediante la Ecuación 1.

$$CS = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \% \quad (1)$$

Donde:

S₀: Concentración inicial de azúcares reductores, g L⁻¹

S: Concentración final de azúcares reductores hasta 48 horas de tratamiento, g L⁻¹.

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización de la LC

La Tabla 4, muestra los resultados obtenidos para el contenido de celulosa y lignina, antes y después

de los tratamientos de: hidrólisis ácida, alcalina y enzimática.

Tabla 4. Contenido de celulosa y lignina de la LC antes y después de los tratamientos.

Tratamiento	% Lignina	% Celulosa
LC sin tratamiento	9.73	82.54
Hidrólisis ácida	7.44	70.43
Hidrólisis básica	9.30	75.26
Hidrólisis enzimática	9.69	37.31

Luego de los tratamientos hidrolíticos, no se evidencian mayores cambios en contenido de lignina, excepto para la hidrólisis ácida (7.44%). Por su parte, el contenido de celulosa cambió en los tres tratamientos, siendo más notoria la conversión de celulosa en la hidrólisis enzimática (37.31%). Aunque los niveles de celulosa disminuyeron en las hidrólisis ácida y alcalina, los niveles alcanzados en ambos fueron del orden del 70%. Con base en esto, no hay diferencias significativas entre los tratamientos ácido y alcalino, en cuanto al contenido de celulosa.

3.1 Diseño de experimentos

El análisis estadístico, se realizó mediante el software Design Expert 7.1, versión de prueba. La superficie de respuesta y los gráficos de algunas interacciones, para cada uno de los tratamientos, se muestran en las Figuras 1 y 2.

La Figura 1a muestra una superficie en forma de plano, con ligera curvatura. No existen términos estadísticamente significativos en el modelo. Sin embargo, las interacciones pH-temperatura, son importantes para el desempeño del mismo. Las condiciones óptimas determinadas fueron pH 4.0, 60 min y 150°C. La ecuación 2, describe el modelo de regresión para el tratamiento ácido.

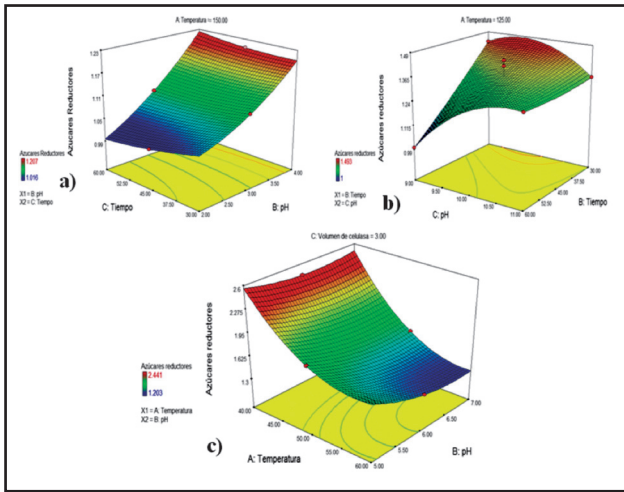


Figura 1. Superficie de respuesta para los tratamientos.
a) Hidrólisis ácida. b) Hidrólisis alcalina. c) Hidrólisis enzimática

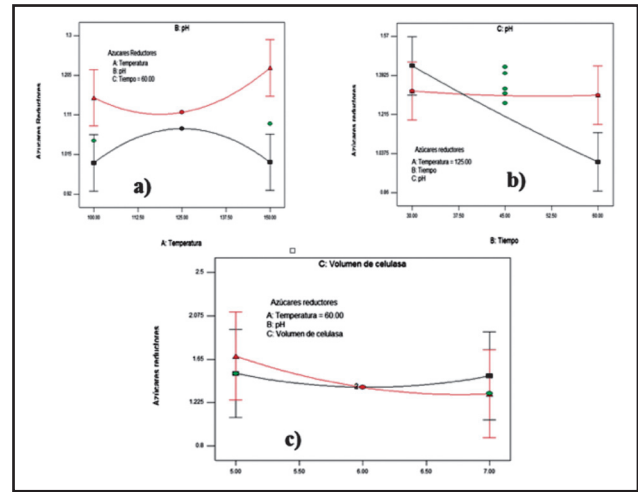


Figura 2. Interacciones para los tratamientos. a) Hidrólisis ácida. b) Hidrólisis alcalina. c) Hidrólisis enzimática

Azúcares reductores

$$= 1.06 + 7.50 \times 10^{-4} * A + 1.75 \times 10^{-3} * B + 3.75 \times 10^{-3} * C + 0.017 * A * B + 0.020 * A * C + 0.018 * B * C + 0.026 * A^2 + 0.023 * B^2 + 6.20 \times 10^{-3} * C^2 + 0.076 * A^2 * B - 0.031 * A^2 * C - 2.25 \times 10^{-3} * A * B^2 \quad (2)$$

La Figura 2a muestra la interacción entre los factores de temperatura y pH. A un tiempo de 60 minutos, un aumento del pH provoca un aumento en la respuesta; mientras que un aumento en la temperatura, provoca una ligera disminución en la producción de azúcares reductores.

La Figura 1b muestra una superficie en forma de teja. El tiempo es la variable más significativa del proceso. Una disminución del mismo, provoca un aumento en la respuesta. Las condiciones óptimas determinadas son pH 10.0, 30 min y 112.5°C. La ecuación 3, describe el modelo de regresión para el tratamiento alcalino.

Azúcares reductores

$$= 1.35 + 9.25 \times 10^{-3} * A - 0.11 * B + 0.047 * C + 0.10 * B * C - 0.021 * A^2 + 0.012 * B^2 - \quad (3)$$

La Figura 2b, muestra la interacción entre pH y tiempo. A 112.5 °C, un aumento del pH provoca un ligero aumento en la respuesta, mientras un aumento del tiempo desfavorece la producción de azúcares reductores.

La Figura 1c muestra una superficie inclinada con forma de plano. La temperatura es la variable más relevante del proceso enzimático. Los mejores resultados se obtienen a bajo nivel de esta variable. Las condiciones óptimas determinadas son: pH 6.2, 2.39 mL de celulosa y 42.4°C. El modelo de regresión, se muestra en la ecuación 4.

Azúcares reductores

$$= 1.42 - 0.29 * A - 0.042 * B + 0.094 * C - 0.077 * A * B - 0.25 * A * C - 0.086 * B * C + 0.16 * A^2 + 0.11 * B^2 + 0.085 * C^2 + 0.021 * A^2 * B + 0.15 * A^2 * C + 0.014 * A * B^2 \quad (4)$$

La Figura 2c muestra la interacción entre el volumen de celulosa y pH. A 60°C, un aumento del pH provoca un ligero aumento en la respuesta, mientras que un aumento en el volumen de celulosa, genera una disminución en la producción de azúcares reductores.

3.2 Validación de los modelos estadísticos

Se eligió una corrida experimental de cada hidrólisis, con el fin de validar los modelos propuestos. Con base en las Ecuaciones 2-4, se obtuvieron los valores correspondientes a cada uno de ellos. La Tabla 5, muestra dicha información: los valores obtenidos vs los resultados experimentales.

Tabla 5. Valores predichos vs valores experimentales para los tratamientos hidrolíticos.

Azúcares reductores, mg/ mL			
Hidrólisis	Modelo	Experimental	R ²
Ácida (17)	1.817	1.207	0.932
Básica (10)	1.039	1.493	0.920
Enzimática (6)	2.575	2.441	0.927

Los datos experimentales se ajustaron a los modelos de regresión obtenidos en el análisis.

3.3 Cinética de fermentación

Las tabla 6 y 7, muestran las condiciones a las que se desarrollaron la validación de los modelos obtenidos y el estudio cinético de los tres tratamientos.

Tabla 6. Condiciones para ensayos cinéticos de los productos obtenidos en las hidrólisis ácida y alcalina.

Hidrólisis	Tiempo, min	pH	Temperatura, °C
Ácida	30	4.0	100
Básica	30	10.0	110

Tabla 7. Condiciones para ensayo cinético del producto obtenido en la hidrólisis enzimática (ocho horas de tratamiento).

Hidrólisis	Volumen de celulosa, mL	pH	Temperatura, °C
Enzimática	3.0	5.0	40

Bajo esas condiciones, se realizaron sendos ensayos cinéticos de fermentación, a partir de *Saccharomyces Cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio. Con base en la Ecuación 1, se determinó la cinética de consumo de sustrato (azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis de LC) durante 48 horas de tratamiento.

Tabla 8. Consumo de sustrato durante 48 horas para los diferentes tratamientos hidrolíticos.

Hidrólisis	Consumo de sustrato, %
Ácida	96,27
Básica	96,99
Enzimática	94,6

En la Figura 3, se presenta el consumo de azúcares reductores durante la fermentación, a diversos tiempos, para cada una de las hidrólisis, las cuales presentaron un comportamiento similar. La velocidad de consumo de azúcares reductores, durante las primeras cinco horas de fermentación, fue significativamente mayor, en comparación con tiempos mayores. Se observó un menor consumo de sustrato en la hidrólisis enzimática; esto se atribuye a posibles inhibidores, generados durante el proceso de fermentación.

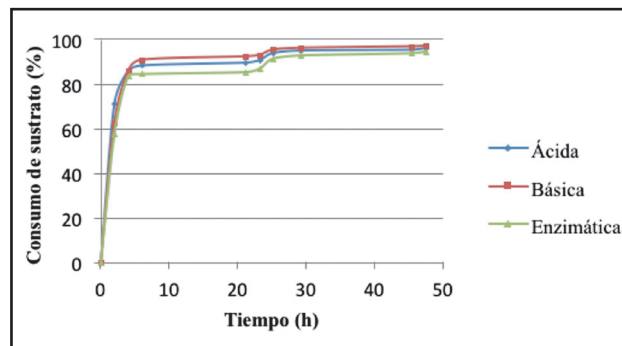


Figura 3. Consumo de azúcares reductores producidos mediante hidrólisis de LC durante la fermentación.

4. Conclusiones

Mediante caracterización química de la *Luffa Cylindrica*, se determinó el contenido de lignina (9,73%)

y celulosa (82,54%). El contenido de celulosa es mayor respecto a otros materiales lignocelulósicos reportados en la literatura.

Estadísticamente, no existen factores relevantes para la hidrólisis ácida. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de tercer orden con un R² de 0,927. Las condiciones óptimas son pH 4,0, 60 min y 150°C. Existe interacción entre pH y temperatura. La variable más significativa en el tratamiento alcalino, fue el tiempo. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de tercer orden con un R² de 0,932. Las condiciones óptimas son pH 10, 30 min y 112,5°C. Para la hidrólisis alcalina, existe interacción entre los factores tiempo-pH. La temperatura es la variable más significativa del tratamiento enzimático. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo cúbico con un R² de 0,925. Las condiciones óptimas son pH 6,2, 2,39 mL y 42,4°C. Existe interacción entre volumen de celulosa y pH.

La validación del modelo, mostró un ajuste en los datos experimentales de los diferentes tratamientos hidrolíticos; en donde se observó un mejor resultado en la hidrólisis enzimática, obteniendo una desviación de 5,20%, respecto al modelo enzimático.

De las tres hidrólisis estudiadas, aquella que mostró mayor producción de azúcares reductores fue el tratamiento enzimático. En general, los niveles de formación de producto son mayores en comparación con los niveles de los demás tratamientos. La hidrólisis básica, mostró la mejor fermentación ya que generó el mayor consumo de sustrato; es decir, se generaron menos inhibidores respecto a los demás tratamientos hidrolíticos.

Se evaluó la cinética de degradación de azúcares reductores durante la fermentación de los mismos. Se observó que el consumo de azúcares reductores es de forma exponencial. Se detectó que en las primeras cinco horas, hubo una mayor fermentación (degradación de azúcares reductores) que en tiempos más altos del proceso, debido a menores inhibidores en el caldo de cultivo.

Referencias

1. Abril, D. (2009). Ethanol from lignocellulosic biomass. *Cien.Inv.Agr*, 36, 177-190.
2. Ferrer, J.; Páez, G.; Arenas, L.; Chandler, C.; Mármol, Z. and Sandoval, L. (2002). Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Fac. Agron*, 19.
3. Cortínez, V. (2010). Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: Hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Universidad de Chile.
4. Navarrete, L.; Martínez, D. and Duarte, D. (2009). Caracterización preliminar del estropajo "Luffa Cylindrica" como posible materia prima para la construcción. *Avances investigación en ingeniería*, 11.
5. Siqueira, G.; Bras, J. and Dufresene, A. (2010). Luffa cylindrica as a lignocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose and cellulose nanocrystals, 5, 727-740.
6. Pérez, J.; Honorato, A. and Hernández, J. (1998). Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del Estado de Puebla. *Madera y Bosque*, 4, 79-93.
7. López- Vázquez, A.; Ortégón, G. and Robles, F. (2011). Obtaining reducing sugars from Kikuyu Grass (*Pennisetum Clandestinum*). *Avances*, 13.
8. Lázaro, L. and Arauzo, J. (2004). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. *Hidrólisis Enzimática*. Universidad de Zaragoza.
9. Mussato, S.; Dragone, D.; Fernández, M.; Rocha, G. and Roberto, I. (2006). Efecto de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa, Argentina.
10. Yu, Z. and Zhang, H. (2003). Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. *Biomass Bioenerg*, 24, 257-262.
11. Lázaro, L. and Arauzo, J. (2004). Aprovechamiento de residuos de la industria de conser-

- vas vegetales. Hidrólisis Enzimática. Universidad de Zaragoza.
12. Andren, R.; Mandels, M. and Modeiros, J. (1976). Production of sugars from waste cellulose by enzymatic hydrolysis: Primary evaluation of substrates. *Proc. Biochem* ,10,1-11.
 13. Brethauer, S. and Wyman, C. (2010). Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Journal Bio-resource technology* , 101, 486 – 487.
 14. Talnoba, V. (2005). A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa Cylindrica*). *Polymer Testing* , 24, 474 – 482.
 15. Finalyson , M. and Donald, L. (1971). Oxidation of ethanol by chromium(VI). A kinetics experiment for freshmen. *Journal of chemical education* , 48.
 16. Gutiérrez, A. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Sevilla.