

Producción de etanol carburante de segunda generación a partir de residuos como cáscaras de banana, maracuyá y naranja (eficiencia en obtención de melazas) utilizando la levadura *Candida utilis* en fermentación

Fuel ethanol production second generation from waste as shells banana, passion fruit and orange (efficiency in obtaining molasses) using the yeast *Candida utilis* fermentation

Jhon Sebastián Murillo Rueda
Zulay Esmeralda Andrade Velandia
Laura Natalia Florez Acosta
Carolina Gutiérrez Sánchez

Aprendices Tecnología en Química
Aplicada a la Industria

Nelly Patricia Lozano Puente
Dinamizadora Tecnoparque
nplozano@sena.edu.co

Paola Gissel Duarte Briceño
Facilitadora Innovación – Biotecnología
pduarteb@sena.edu.co

July Alexandra Rincón Chacón
Facilitadora Innovación -
Nanotecnología
jrinconch@sena.edu.co

Fabián Francisco Freyle Corro
Facilitador Innovación - Química
ffreyle@sena.edu.co

Servicio Nacional de
Aprendizaje SENA
Regional Cundinamarca
Centro Industrial y de Desarrollo
Empresarial (CIDE), Soacha



Resumen

El aumento de las normas reguladoras de los niveles de CO₂ emitidos al ambiente por el uso de combustibles fósiles, sumado al mal manejo, recolección, tratamiento y disposición de los residuos orgánicos generados en las plazas de mercado de Soacha (Cundinamarca), crea una amplia problemática ambiental que favorece, la proliferación de enfermedades.

En el 2008, se produjeron 6.412 toneladas mensuales de residuos sólidos, dentro de las cuales 4.117 toneladas correspondieron a residuos orgánicos, de los que menos del 0.1% se aprovecharon al mes (Mesa Interagencial de Soacha, 2012).

Es así como surge la idea de implementar un tratamiento que permita aprovechar en forma eficiente estos desechos en un proceso productivo, que contribuya a reducir la acumulación de estos residuos en rellenos sanitarios o botaderos, mitigando de esta manera los niveles de contaminación en el aire y a su vez, promoviendo al desarrollo de la región. La generación de biocombustibles a partir de residuos sólidos se constituye en una estrategia promisoriosa, innovadora y económicamente factible.

En la fase inicial de la presente investigación, se evaluó la capacidad de la levadura *Candida utilis* para utilizar y fermentar los azúcares provenientes de las cáscaras de frutas como banano, maracuyá y naranja; materias primas recolectadas de distintas plazas de mercado de Soacha.

En el proyecto se implementaron y adecuaron procesos de hidrólisis alcalina para eliminar la lignina e hidrólisis ácida. Todos los experimentos fueron monitoreados periódicamente con mediciones de grados Brix, concentración celular y porcentaje indirecto de etanol en la fermentación. Los bioensayos revelaron el mayor rendimiento en producción de etanol, de hasta 99%, a las 20 horas del proceso, en los tratamientos en que se empleó la cáscara de naranja.

Los resultados muestran además, que la levadura presenta extensas capacidades para adaptarse y aprovechar estos residuos orgánicos para su crecimiento y actividad.

Palabras claves:

Bioetanol, biocombustible, fermentación, residuos agroindustriales, *Candida utilis*.

Abstract

Increasing the norms that regulate the levels of CO₂ emitted into the environment by the use of fossil fuels, coupled with poor management, collection, treatment and disposal of organic waste generated in the marketplaces of Soacha (Cundinamarca), creates a wide environmental problems, which in turn facilitates the spread of diseases.

In 2008, were produced 6,412 tons of solid waste per month, within which 4,117 tonnes were organic waste, of which less than 0.1% were used in the month.

In this way the need to implement a treatment that could exploit efficiently this waste in a productive process, which would help to reduce the accumulation of these wastes in landfills or waste dumps, thus mitigating the pollution levels in the air and in turn contributes to the development of the region (Mesa Interagencial de Soacha, 2012). Thus was submitted the idea of generating biofuels from solid waste as a promising, innovative and economically feasible strategy.

In the initial phase of this research, the ability of the yeast *Candida utilis* to use and ferment the sugars from fruit peels was evaluated as bananas, passion fruit and orange; raw materials that came from different marketplaces of Soacha. During this project they implemented and adapted processes of alkaline hydrolysis to remove the lignin and acid hydrolysis. All experiments were monitored periodically with Brix measurements, cell concentration and indirect percentage of ethanol in the fermentation. Bioassays showed the best performance in ethanol production (up to 99%), at 20 hours of the process, in treatments that orange peel was used. The results also show that the yeast has great capacity to adapt and take advantage of these organic wastes for its growth potential and activity.

Keywords:

Bioethanol, biofuel, fermentation, agro-industrial waste, *Candida utilis*.

Introducción

La acumulación de residuos orgánicos no solo genera una amplia y negativa problemática ambiental por el deterioro gradual del medio, sino también desde el punto de vista económico, eleva los costos de recolección, transporte y disposición final (Tejada et al., 2010).

En el caso particular del municipio de Soacha, ubicado en el departamento de Cundinamarca, los residuos se concentran en los vertederos; solo para el año 2008 se produjeron 6.412 toneladas mensuales de residuos sólidos, de los cuales 4.117 toneladas correspondieron a residuos orgánicos y se aprovecharon 0.46 toneladas al mes (Mesa Interagencial de Soacha, 2012).

Por otro lado, el uso de los combustibles fósiles como el carbón, el gas natural y la gasolina, generan una amplia problemática ambiental, ya que

intervienen de manera directa en la producción de gases de efecto invernadero (Gupta y Prakash, 2015). A pesar de que este tipo de combustibles genera cerca del 82% de la energía mundial, la gasolina en particular aporta alrededor del 60% del CO₂ que se emite a la atmósfera (Santis et al., 2014; Shaheen et al., 2013).

El alcohol carburante o bioetanol se emplea como combustible y es un sustituto para la gasolina en la industria automotriz. Este puede ser de primera, segunda y tercera generación, dependiendo de la materia prima que se emplee para su producción.

El etanol de primera generación, se obtiene de cultivos de caña de azúcar, yuca, remolacha o cereales. Los de segunda generación se producen a partir de residuos orgánicos de alto contenido de lignina y celulosa. Y los de tercera generación son originados a partir de biomasa

que ha sido genéticamente modificada con el fin de generar procesos más eficientes (Castillo, 2013).

Los residuos agroindustriales se constituyen como la biomasa más abundante del planeta y su uso presenta un amplio potencial, debido a que son sustratos renovables y no presentan ningún valor comercial (Gupta y Prakash, 2015).

Colombia es el segundo país a nivel latinoamericano, en producir biocombustibles de primera generación a partir de monocultivos de caña de azúcar y cereales (González, 2008).

Sin embargo, se ha encontrado que la producción de estos, genera problemas de seguridad alimentaria mientras que la producción de biocombustibles de tercera generación, crea dificultades respecto al valor económico del proceso.

En ese sentido, con el bioetanol de segunda generación se alcanzan las mayores ventajas técnicas, económicas y sociales.

La producción de biocombustibles se constituye en una alternativa viable de producción de energía, que busca mitigar los efectos contaminantes y el deterioro ambiental.

Con el desarrollo de este proyecto, se buscó establecer un proceso de producción de biocombustibles a partir de materiales renovables, como los residuos de cáscaras de frutas (naranja, maracuyá y banano), procedentes de las plazas de mercado del municipio de Soacha.

Durante el proceso se evaluaron dos tipos de hidrólisis, ácida y alcalina; se realizó un seguimiento del proceso a través de mediciones periódicas de porcentaje de

etanol (medida indirecta), degradación de azúcares (grados Brix) y crecimiento celular.

1. Materiales y Métodos

1.1. Pretratamiento materia prima



Figura 1. Montaje para la determinación del peso de las cáscaras secas y los procesos de hidrólisis.

Las cáscaras de frutas utilizadas (naranja, banano y maracuyá) provinieron de distintas plazas de mercado del sector de Soacha. A estos residuos se les realizó un pretratamiento que inició con un proceso de lavado para eliminar el exceso de tierra y polvo.

Seguidamente, se sometieron a un proceso de deshidratación o secado a una temperatura de 60°C. Y finalmente, se realizó una molienda hasta obtener un tamaño de partícula aproximado de 2 mm. En la Figura 1, se presenta el montaje para la determinación del peso de las cáscaras una vez secas y el montaje de cómo se llevaron a cabo los procesos de hidrólisis.

1.2. Hidrólisis y producción de melazas

Se evaluaron dos tipos de hidrólisis: alcalina y ácida.

- **Hidrólisis alcalina:** se sumergieron las cáscaras de frutas en una suspensión de NaOH al 1N por 15 minutos. Después, se realizó un proceso de filtración para separar la solución alcalina de la fracción sólida. Como las soluciones presentaron un pH entre 11 y 12 se ajustaron al pH óptimo para la levadura (4.5) con H₂SO₄.

Finalmente, se enriqueció con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- **Hidrólisis ácida:** los residuos sólidos o pulpa generada durante el proceso anterior, se destinaron para el proceso de hidrólisis ácida con digestión en H_2SO_4 al 5%. Se adicionaron 50 mL de H_2SO_4 al 5% por cada 100 g de la pulpa. La hidrólisis se realiza en autoclave a una temperatura de 125°C y una presión de 15 Psi. Se filtra el material particulado y se obtiene la melaza ácida a la cual se le ajusta el pH a 4.5 con NaOH 1N y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

1.3. Microorganismo

El microorganismo seleccionado para la investigación fue la levadura comercial *Candida*

utilis, donada inicialmente por el Centro de Biotecnología del SENA Palmira (Valle) y suministrada por el Laboratorio de Biotecnología del Centro Industrial y de Desarrollo Empresarial (CIDE), de Soacha.

1.4. Medio de cultivo

Se utilizaron como sustrato las distintas melazas generadas después de cada proceso de hidrólisis y se suplementó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno.

1.5. Producción de bioetanol empleando *Candida utilis*

El proceso de producción de bioetanol empleando *Candida utilis*, se llevó a cabo en erlenmeyers de 250 mL con un volumen efectivo de 100 mL, una temperatura y pH inicial óptimos para la fermentación con la levadura de 35°C y 4.5, respectivamente.



Figura 2. Montaje de fermentación para medición de % etanol en atmósfera.

Las variables evaluadas fueron:

- Tipo de residuo (cáscaras de naranja, banano o maracuyá).
- Tipo de hidrólisis (alcalina o ácida).

Y con el fin de dar seguimiento al proceso, se midieron periódicamente los parámetros de porcentaje de etanol como una medida indirecta a través de sensores PASCO, consumo de azúcares en grados brix, con el uso de un refractómetro marca Brixco y concentración celular

por conteo directo en cámara de Neubauer.

En la Figura 2 se ilustra el montaje que se empleó para llevar a cabo los procesos de fermentación y específicamente la medición de etanol en el medio.

2. Resultados

2.1. Producción de bioetanol empleando *Candida utilis*

En la Figura 3 se observa la concentración celular durante el tiempo del proceso de producción de bioetanol. De manera general, las levaduras de *Candida utilis* presentan comportamientos similares en los tratamientos ácidos (Figura 3B), en los que se observa una pequeña fase lag (latencia donde el microorganismo se adapta a las condiciones del medio), al inicio del proceso, seguido de un crecimiento exponencial y una posterior

fase de muerte celular hasta el final del proceso. Por otro lado, los tratamientos alcalinos (Figura 3A) muestran tendencias distintas, pero cabe resaltar que la suspensión de naranja alcalina muestra crecimiento constante desde el inicio del proceso, es decir, no se evidencia fase lag y que las más se alcanzaron concentraciones celulares máximas de 6.5×10^6 cél/mL, 1.5×10^5 cél/mL, 3.3×10^7 cél/mL, respectivamente. Y en las suspensiones ácidas, las concentraciones celulares

máximas para la naranja, el maracuyá y el banano fueron de 7.7×10^6 cél/mL, 2.3×10^7 cél/mL, 1.0×10^7 cél/mL, respectivamente.

En la Figura 4 se presenta el porcentaje indirecto de producción de etanol durante el tiempo del proceso. Se evidencia un incremento significativo en el parámetro desde el inicio del proceso en las suspensiones en que se empleó la cáscara de naranja.

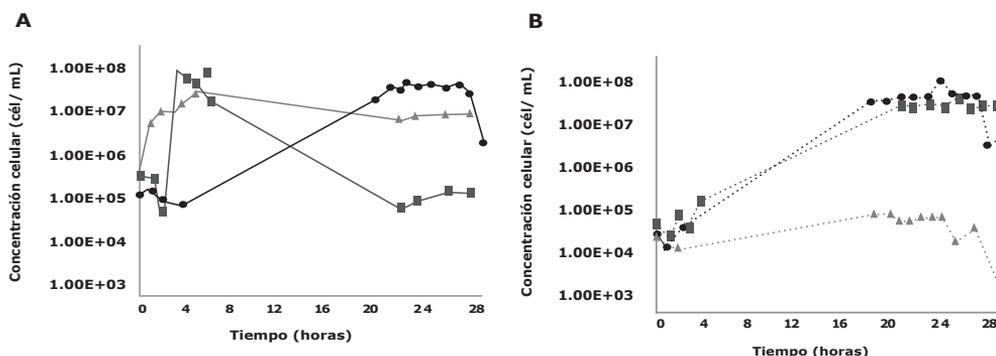


Figura 3. Concentración celular vs Tiempo para un proceso de producción de bioetanol con *Candida utilis*, empleando cáscaras de banano, maracuyá y naranja como sustrato, a partir de un proceso de hidrólisis alcalina (A) e hidrólisis ácida (B). Maracuyá (■), Banano (●), Naranja (▲). Las líneas continuas corresponden a la hidrólisis alcalina. Las líneas punteadas corresponden a la hidrólisis ácida.

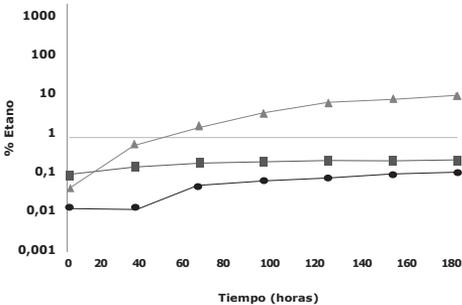


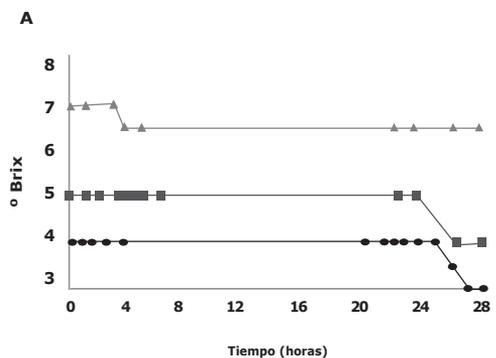
Figura 4: % Etanol vs. Tiempo, para un proceso de producción de bioetanol con *Candida utilis*, empleando cáscaras de banano, maracuyá y naranja como sustrato, a partir de un proceso de hidrólisis alcalina. Maracuyá (■), Banano (●), Naranja (▲).

Mientras que con el uso de las cáscaras de maracuyá y banano, no se observó un porcentaje significativo de etanol en el medio. Se obtienen finalmente a las 180 horas de proceso, concentraciones de etanol del 15.7% con la naranja, 0.2% de maracuyá, y 0.1% con el banano.

En la Figura 5 se muestra el consumo de sustrato medido en

grados Brix, durante el tiempo del proceso de producción de bioetanol. Se observa en todos los tratamientos, tanto alcalinos, como ácidos, una tendencia a la estabilidad las primeras 25 horas del proceso, tiempo después del cual se observa una tendencia a la estabilidad hasta el final del proceso en la suspensión con cáscara de naranja, y a disminuir en los tratamientos con cáscaras de banano y maracuyá.

La melaza ácida de maracuyá presenta el mayor contenido de grados Brix durante el proceso.



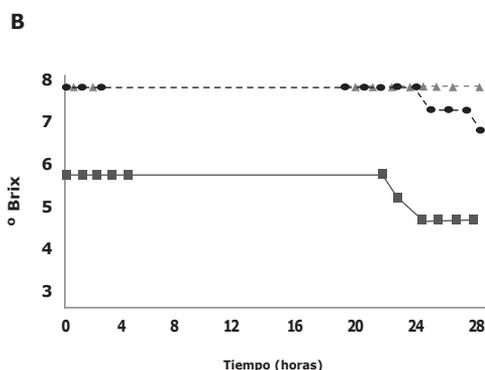


Figura 5: °Brix vs. Tiempo, para un proceso de producción de bioetanol con *Candida utilis*, empleando cáscaras de frutas, a partir de un proceso de hidrólisis alcalina (A) e hidrólisis ácida (B). Maracuyá (■), Banano (●), Naranja (▲). Las líneas continuas corresponden a la hidrólisis alcalina. Las líneas punteadas corresponden a la hidrólisis ácida.

3. Discusión

En el presente trabajo, se evaluó la influencia de la concentración de azúcares presentes en cáscaras de frutas (naranja, maracuyá y banano) y el tipo de hidrólisis (alcalina o ácida), sobre el crecimiento celular, el consumo de azúcares y la producción indirecta de etanol.

Se observó que la concentración de azúcar (°Brix) en las suspensiones de naranja, tanto alcalinas, como ácidas, permanecieron siempre altas e invariables a lo largo del proceso, en comparación con los demás tratamientos evaluados, en donde después de la hora 25 se observa una reducción en el parámetro. Esto parece estar directamente relacionado con el hecho de que en la melaza de naranja se alcance el mayor porcentaje de etanol. Indicando que, cuando hay un mayor contenido de glucosa, se presenta un incremento en la producción de etanol, como se ha observado en distintos trabajos de investigación (Sánchez y Cardona, 2005; Peña y Arango, 2008; Santis et al., 2014; Gupta y Prakash, 2015). Peña y Arango (2008), en su investigación encontraron que la producción de etanol se favorece con el incremento del contenido de sacarosa en la suspensión, independientemente del tipo de microorganismo evaluado.

Lo que indica que la determinación de la concentración de azúcares fermentables en las materias primas, permite identificar de forma directa con qué tipo de sustrato las levaduras generarán las más altas concentraciones de etanol.

Se evidenció además que el tratamiento de hidrólisis ácida contribuye a incrementar el porcentaje de azúcares fermentables, disponibles para los microorganismos empleados en el proceso, por encima del tratamiento con álcali, como han observado en otras investigaciones (Fonseca y Maturana, 2010). Además, es el método que se considera más adecuado, que brinda mejores rendimientos a escala comercial, por sus bajos costos y la facilidad para su almacenamiento, comparado con los procesos de hidrólisis enzimática (Aditiya et al., 2016).

Por otra parte, los bajos rendimientos de producción de etanol observados en las

suspensiones de maracuyá y banano, pueden estar relacionados con una baja concentración de azúcares presentes en dichas cáscaras (Castillo, 2013), lo que hace que el proceso no sea viable o atractivo para la producción de alcohol carburante con estos dos tipos de residuos.

Adicionalmente, con el seguimiento que se realizó a la concentración celular se encontró que el inicio de la fase de muerte en los distintos tratamientos, coincide con el hecho de que después de la hora 25 se presenta una reducción de los azúcares presentes en el medio (melaza).

Con los resultados observados en cuanto al porcentaje de producción de etanol, *Candida utilis* probablemente se encontró bajo condiciones de estrés, como se ha observado en otras investigaciones. Este tipo de levaduras son menos tolerantes al pH,

etanol y algunos inhibidores presentes en el hidrolizado, en comparación con otros microorganismos (Kuhad et al., 2016; Aditiya et al., 2016). Adicionalmente, la velocidad de producción de etanol a partir de glucosa es por lo menos cinco veces menor con *Candida* que la observada con *S. cerevisiae* (Sánchez y Cardona, 2005) e incluso el etanol no constituye en ocasiones, el producto principal de su actividad fermentativa (Kuhad et al., 2016).

Estos resultados motivan la continuación de la investigación y evaluación de otros tipos de microorganismos que sean aptos para el consumo hexosas, menos sensibles a ciertas condiciones del ambiente y que presenten altos rendimientos de producción de etanol como *Zymomonas mobilis* y *S. cerevisiae*.

4. Conclusiones

Las cáscaras de naranja con cualquiera de las hidrólisis empleadas pueden considerarse como una biomasa agroindustrial competitiva, frente a las demás materias primas que han sido usadas en distintos trabajos de investigación para la producción de biocombustibles de segunda generación. Esta materia prima es interesante por su alto contenido de azúcares, su disponibilidad y el hecho de que no presenta ningún costo.

Bibliografía

Aditiya H.B., Mahlia T.M.I., Chong W.T., Nur Hadi, Sebayang A.H., 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66: 631-653

- Castillo A, 2013. Determinación de parámetros de co.cultivo de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol. Tesis para optar título de Magíster. Universidad Iberoamericana, Ciudad de México, México.
- Domínguez-Bocanegra A.M, Torres-Muñoz J.A, Aguilar R, 2015. Production of bioethanol from agro-industrial wastes. *Fuel* 149:85-89.
- Gupta A, Prakash J, 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 41:550-567.
- Kuhad R. C., Gupta R, Khasa Y.P., Singh A., Zhang Y.H. P., 2011. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 4950 – 4962.
- Mesa Interagencial de Soacha, 2012. Informe PNUD, Soacha.
- Peña C, Arango R, 2009. Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dyna* 76 (159): 153-161. ISSN 0012-7353.
- Sánchez O. J. y Cardona, C.A., 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30 (11):671-678.
- Santis F, Pérez B, Saldaña S, Eapen D, Sebastián P, 2014. *Energy procedia*, 57: 860-866.
- Shaheen M, Choi M, Ang W, Zhao Y, Xing J, Yang R, 2013. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. *Renew Energy*, 57: 462-468.
- Tejeda L, Tejeda C, Villabona A, Alvear M, Castillo C, Henao D,

Marimón W, Madariaga N, Tarón A, 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, (Colombia). Revista Educación en Ingeniería 10: 120 -125.