

Estudio de la fermentación alcohólica de mezclas de glucosa y xilosa usando *Pachysolen tannophilus*

Analysis of the alcoholic fermentation of glucose and xylose using *Pachysolen tannophilus*

Yusimit Alvarez Ramon^{1*}, Dra. Layanis Mesa Garriga², Dr.C Erenio González Suárez².

Dpto Ing. Química. 5to año. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

***yaramon@uclv.edu.cu**

Centro de Análisis de Procesos (CAP). Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. leyanimq@uclv.edu.cu, erenio@uclv.edu.cu

Resumen

Los componentes de mayor contenido en el material lignocelulósico, glucosa y xilosa, son la materia prima utilizada para la obtención de etanol por vía fermentativa. En este trabajo se realiza un diseño de experimentos dirigido a estudiar la capacidad fermentativa de la levadura *Pachysolen tannophilus*, basado en la revisión de literatura especializada acerca de la obtención del etanol a partir de glucosa, xilosa, y mezclas de ambas. Se estudian las cepas de microorganismos y condiciones operacionales más comunes para ello. La fermentación se lleva a cabo empleando la levadura en su forma natural la cual es capaz de fermentar los azúcares de 5 átomos de carbono como la xilosa, durante un tiempo de estudio de 24 horas. Para el análisis de las mezclas de azúcares se utilizan diferentes relaciones, tales como: 25% xilosa/75% glucosa, 50% xilosa/50% glucosa y 75% xilosa/25% glucosa, con una concentración inicial de 20 g/L de azúcar, velocidad de agitación de 150 rpm y temperatura 30 °C. El tiempo de muestreo fue de 48 horas. Para el análisis de las muestras se emplea Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Obteniéndose una concentración de 4.5 g/L para mezclas de 50% xilosa/50% glucosa a las 48 horas de muestreo.

Palabras claves: etanol, fermentación, xilosa, *Pachysolen tannophilus*.

Abstract

Glucose and xylose, the highest components of the lignocellulosic material, are the raw material used for the production of ethanol by means of fermentation. This paper carries out a design of experiments aimed at studying the fermentative capacity of the *Pachysolen tannophilus* yeast, based on the specialized literature review about obtaining ethanol from glucose, xylose, and mixtures of both. Strains of microorganisms and common operating conditions are studied for this purpose. The fermentation is carried out using the yeast in its natural form which is capable of fermenting sugars from 5 carbon atoms such as the xylose, during a 24-hour study period. Several relationships are used for the analysis of mixtures of sugars such as: 25% xylose /75% glucose, 50% xylose / 50% glucose and 75% xylose/25% glucose, with an initial concentration of 20 g / l sugar, a 150 rpm rate of stirring and a 30 °C temperature. The sampling time lasted 48 hours. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used for the analysis of samples. At 48 hours from starting the test it was obtained a concentration of 4.5 g/L for 50% xylose / 50% glucose mixtures of sugars.

Keywords: ethanol, fermentation, xylose, *Pachysolen tannophilus*.

1. Introducción

Desde comienzos del siglo el uso desmedido de los combustibles fósiles ha sido una problemática a resolver tanto para países desarrollados como subdesarrollados. Debido a su agotamiento se han buscado alternativas que puedan suplirlos en determinados campos de aplicación. Ocupando un lugar importante encontramos la obtención de etanol por vías fermentativas, avanzando por la primera generación a partir de los derivados del almidón, e ingresando en la segunda: fermentación de la biomasa lignocelulósica.

La materia prima para este proceso lo constituye el material lignocelulósico, disponible de manera común en el ambiente, ya sea en residuos de la industria maderera, industria azucarera como el bagazo de caña de azúcar, residuos de la agricultura y desperdicios urbanos [1] y [2], disminuyendo con ello el costo de producción. El componente principal de la materia lignocelulósica lo constituye la celulosa y hemicelulosa, pudiendo ser hidrolizados a azúcares y estos fermentados a etanol. Los azúcares que se encuentran en mayor proporción son la glucosa y la xilosa. La obtención de etanol se ha desarrollado generalmente utilizando la glucosa, por ser el componente principal de la materia

lignocelulósica.

Para la fermentación de los azúcares se utilizan diferentes microorganismos, que pueden variar desde levaduras hasta bacterias. Son utilizados en su forma natural, salvo en algunos casos que no puedan fermentar la mezcla de azúcares entonces se hace necesario recurrir al empleo de microorganismos modificados genéticamente.

Ejemplo de ello son las bacterias recombinantes como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Zymomonas mobilis* o levaduras como *S. cerevisiae*, según Mesa L., [3].

La glucosa, es fermentada históricamente por el microorganismo *Saccharomyces Cerevisiae*, obteniendo altos niveles de rendimiento. Otro componente que se encuentra en la materia lignocelulósica es la xilosa, no siendo fermentada por el microorganismo antes mencionado en su cepa natural, sino modificado genéticamente.

Existen otros microorganismos que fermentan a la glucosa y a la xilosa indistintamente, entre los más destacados en la literatura especializada podemos

encontrar a: *Zymomonas Mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, y *Candida Shehatae*, [4], [5], [6].

Los microorganismos más utilizados en la fermentación de la xilosa, debido a su considerable capacidad fermentativa, son: *Pachysolen tannophilus*, *P. stipitis*, y *Candida Shehatae*. Estos microorganismos fermentan la xilosa bajo determinadas condiciones del medio y de operación.

Por lo expuesto anteriormente nos proponemos como objetivo de la investigación avanzar en el estudio de la capacidad fermentativa de *Pachysolen tannophilus* utilizando un diseño experimental de azúcares simples y de mezclas de ambos.

2. Materiales y métodos

Se desarrolla un estudio experimental de la obtención de etanol a partir de la fermentación de glucosa, xilosa, y mezcla de ambas. Para el estudio de la fermentación de los azúcares se aplica un diseño de experimentos factorial del tipo 2² donde la variable independiente será: la temperatura (30°C como nivel inferior y 35°C como nivel superior), y el tipo de azúcar como variable independiente cualitativa (glucosa como nivel superior y xilosa nivel inferior), obteniendo un total de 4 experimentos con 1 réplica por cada uno. Se escoge este rango de temperatura según los resultados alcanzados por Ke-Ke Cheng [7] y S. Sánchez [8].

Además se determinan las relaciones porcentuales de los azúcares contenidos en el caso de las mezclas para una concentración inicial de 20 g/L para cada una.

Se realiza un diagrama de bloques donde se define la secuencia de actividades a realizar para el logro de los objetivos trazados, ver Figura 1

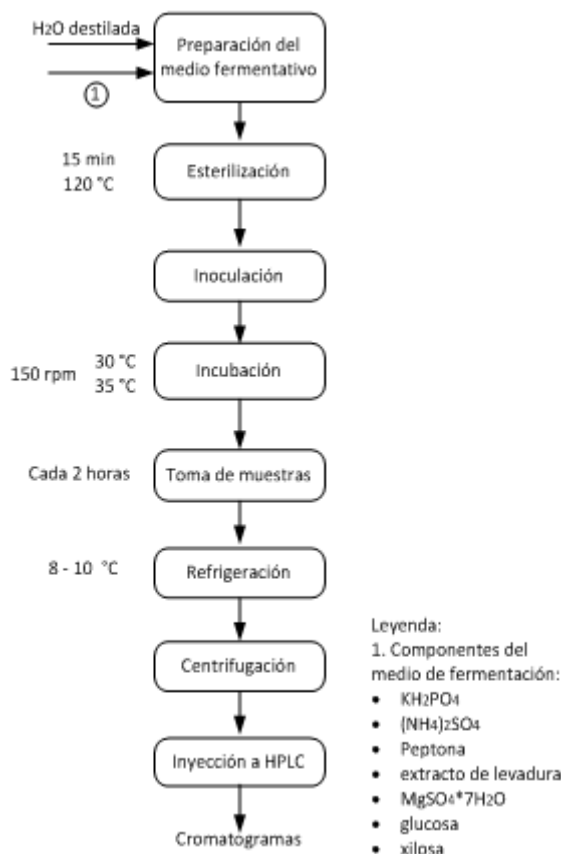


Figura 1. Diagrama de bloques del proceso fermentativo de glucosa, xilosa y mezcla de ambas

2.1. Matriz experimental

Los parámetros a variar en el diseño de experimentos fueron:

- Temperatura: 30 - 35 °C (X1)
- Tipo de azúcar: xilosa – glucosa (X2)

Obteniendo la siguiente matriz experimental, ver Tabla 1:

Tabla 1. Matriz experimental

Experimento	X1	X2
1	+	-
2	+	+
3	-	-
4	-	+

2.1. Fermentaciones simples de azúcares

Para la realización de las fermentaciones de azúcares simples, se necesitan un medio a fin a la levadura y que contenga los nutrientes necesarios para que esta pueda llevar a cabo la fermentación.

Los compuestos que conforman el medio fermentativo son compuestos de tipo nitrogenados, hidrogenados y minerales, los cuales contribuyen al desarrollo metabólico de la levadura *Pachysolen*

tannophilus. El medio es común para todos los experimentos. Este contiene: 5 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura y xilosa o glucosa en concentración de 20 g/L, ver [7]. Se realizan en alícuotas de 25 ml.

La fermentación se lleva a cabo aproximadamente por 24 horas con una velocidad de agitación de 150 rpm y temperatura según la indicada en el diseño de experimentos.

2.2. Fermentaciones de mezclas de azúcares

Los componentes del medio serán los mismos y en igual concentración que para la fermentación de azúcares simples, incluyendo la concentración de estos. Las relaciones de las mezclas se efectuarán de manera porcentual, según Frank Agbogbo [4] y Miranda, J.C.S [9], como se establece a continuación: 25% xilosa/75% glucosa, 50% xilosa/50% glucosa y 75% xilosa/25% glucosa, también en alícuotas de volumen igual a 25 ml y 150 rpm.

El tiempo de muestreo para las mezclas será de 48 horas y la temperatura de 30°C por ser a la cual se alcanzaron los mejores resultados en los experimentos de fermentaciones simples.

2.3.1 Cálculos de composición de las mezclas de azúcares

Para el cálculo de la composición de azúcares en las mezclas debemos tener en cuenta la concentración de trabajo de ambas, el volumen a preparar y el valor porcentual al que se conformará el medio fermentativo. Se trabaja con una concentración inicial de azúcar igual a 20 g/L, tanto para la xilosa como la glucosa. El volumen a preparar por mezcla es de 50 ml, 25 ml para el experimento y los otros 25 ml para la réplica, y el valor porcentual varía de acuerdo a la mezcla en cuestión.

Ejemplo de cálculo para la mezcla de 25% xilosa/75% glucosa:

Para una concentración de azúcares de 20 g/L, la cantidad que representa la xilosa es de:

20 – 100% concentración de 5 g/L, llevados a un volumen de 50 ml:

$$X - 25\% \quad C = \frac{m}{V}$$

$$m = 0.25 \text{ g de xilosa}$$

$$m = 0.75 \text{ g de glucosa}$$

El cálculo para las demás mezclas se realiza de forma análoga, mediante balance de materiales.

2.3. Tecnología empleada

La tecnología empleada para el análisis de los experimentos realizados es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta técnica separa con gran eficacia, identifica los compuestos separados por la columna y además los cuantifica por su altura o área de picos en el cromatograma. Permitiendo determinar la presencia del etanol en las muestras de las fermentaciones efectuadas.

En la solución de este diseño experimental se utilizó un equipo HPLC YL9100, equipado con un detector de Índice de Refracción (IR) y columna del tipo CARBOSep CHO-682. La fase móvil de la columna es agua ultra-pura, con un flujo de 0.4 ml/min, presión de trabajo de 350 psi, temperatura del horno de 80 °C y tiempo de corrida de las muestras azucaradas de 30 minutos.

2. Resultados y análisis

En el análisis de los resultados del estudio realizado a partir de azúcares, xilosa y glucosa, y mezcla de ambas, en la obtención de etanol por vía fermentativa, se utiliza tecnología de cromatografía líquida (HPLC). Obteniendo un conjunto de cromatogramas indicadores de los tiempos de elución de cada componente o sustancia presente en los analitos en cuestión, en este caso prestando especial atención al etanol, siendo el producto de interés de la investigación.

3.1 Resultados de las fermentaciones simples de azúcares

Tabla 2. Concentración de etanol aplicando el diseño 2²

Experimento	X ₁ (Temperatura, °C)	X ₂ (Tipo de azúcar, xilosa o glucosa)	Concentración de etanol (g/L)
1	35	glucosa	1 ± 0.001
2	35	xilosa	-
3	30	glucosa	5 ± 0.003
4	30	xilosa	-

Según el diseño de experimentos factorial 2², donde se varía la temperatura y tipo de azúcar contenido en el medio fermentativo, utilizando el microorganismo *Pachysolen tannophilus*, nos reporta los siguientes niveles de concentración de etanol para un tiempo de muestreo de 24 horas, ver Tabla 2.

Como se observa, en el caso que el azúcar es la xilosa no se obtiene etanol. En los casos 1 y 3 que el azúcar es la glucosa se obtiene mayor concentración de etanol a la temperatura de 30°C. Para el caso del experimento 3, el rendimiento de etanol fue el 49 % del rendimiento potencial teórico para la obtención de etanol a partir de azúcares y para el experimento 1 fue del 10%. Estos resultados son bajos en comparación con la fermentación realizada por la *Saccharomyces cereviceae*, pero debido a la imposibilidad de esta levadura de fermentar los azúcares de 5 átomos de carbono en su forma natural, es que se tiene la necesidad de experimentar con otras cepas de levadura, como el *Pachysolen tannophilus*.

Se realiza un análisis de varianza para la concentración de etanol, utilizando el software STATGRAPHIC v.4.0 observando que las dos variables independientes así como la interacción entre ellas resultaron significativas. Ver Tabla 3.

Tabla 3. ANOVA para la concentración de etanol, g/L

Variables	F-ratio	p-value
X ₁ : Temperatura	436.36	0.0002
X ₂ : Tipo de azúcar	981.82	0.0001
X ₁ X ₂	436.36	0.0002
R ² , %	99.71	

También se observa que la variable independiente de mayor significación es la correspondiente al tipo de azúcar. Con este estudio se obtiene que la levadura *Pachysolen tannophilus*, en un período de 24 horas no puede fermentar a etanol la xilosa contenida en el medio. Ver Figura 2.

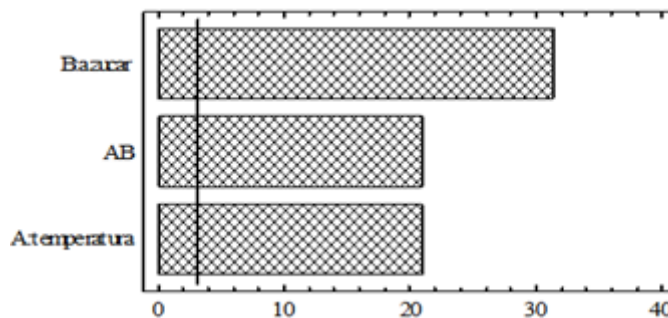


Figura 2. Gráfico de Pareto para la concentración de etanol, g/L

La representación matemática del análisis estadístico que relaciona las variables temperatura y tipo de azúcar queda expresada mediante la Ecuación 1.

$$\text{Concentración de etanol } \left(\frac{g}{l}\right) = 1.5 - X_1 + 1.5X_2 - X_1X_2$$

Ecuación 1.

Se puede observar en la Ecuación 1, que el signo del coeficiente de la variable X₁ (temperatura) es negativo, viéndose favorecida la concentración de etanol al emplear la temperatura a 30°C, lo cual coincide con los reportes de la literatura, ver [7].

3.2 Resultados de las mezclas de fermentaciones
Con el empleo de las mezclas de azúcares glucosa y xilosa, la levadura *Pachysolen tannophilus* es capaz de fermentar la xilosa. El mejor resultado obtenido en cuanto a utilización de la xilosa como sustrato es la mezcla de 50% de xilosa/50% de glucosa, consumiendo el microorganismo toda la xilosa presente en el medio, luego de terminarse la glucosa también. Ver Tabla 4.

Tabla 4. Resultado de las fermentaciones de la mezcla de azúcares

Mezclas	Concentración azúcares, g/L a 2h		Concentración de etanol, g/L a 2h	Concentración azúcares, g/L a 48h		Concentración de etanol, g/L a 48h
	Glucosa	Xilosa		Glucosa	Xilosa	
25x/75g	13	6	0.5	0	2.61	4.6
50x/50g	8	7.4	1.3	0	0	4.5
75x/25g	1	8	0.73	0	7.3	2.8

Alcanzando una concentración de 4.5 g/L de etanol a las 48 de muestreo. No quedando trazas en las muestras analizadas de ninguna azúcar utilizado como sustrato.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en la práctica experimental podemos concluir que al utilizar la xilosa como única fuente de azúcares la levadura *Pachysolen tannophilus* no es capaz de fermentarla a etanol, para las condiciones ensayadas. Mientras que en mezclas de glucosa y xilosa de diferentes proporciones, luego de consumir la glucosa la levadura comienza a utilizar la xilosa como fuente de carbono para su metabolismo, logrando concentraciones de 4.5 g/L a las 48 horas de muestreo, en especial en la mezcla de 50% de xilosa/ 50% de glucosa.

Referencias Bibliográficas

1. Mustafa Balat, H.B., Cahide Oz (2008) *Progress in bioethanol processing*. Progress in Energy and Combustion Science, 23.
2. S. Prasad, A.S., H.C. Joshi (2006) *Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues*. Resources, Conservation and Recycling, 1–39.
3. Mesa, L., *Estrategia investigativa para la tecnología de obtención de etanol y coproductos del bagazo de la caña de azúcar*, in *Centro de Análisis de Procesos*. 2010, Universidad Central de Las Villas: Santa Clara. p. 135.
4. Agbogbo Frank K., C.-K.G., Torry-Smith. Mads, Wenger. Kevin S., *Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia Stipitis*. Process Biochemistry, 2006. 41: p. 3.
5. Skotnicki M. L, W.R.G., Goodman A. E, Lee K. J, Rogers P.L (1982) *High-productivity alcohol fermentations using Zymomonas mobilis*. Biochem Soc Symp, 53–86.
6. Sonali Patle, B.L., *Investigation of the potencial of agro-industrial material as low cost substrate*

for ethanol production by using Candida tropicalis and Zymomonas mobilis. Biomass and Bioenergy, 2008. 32: p. 6.

7. Ke-Ke Cheng, J.-P.G, Jian-An Zhang, Hong-Zhi Ling, Yu-Jie Zhou, Ming-De Yang, Jing-Ming Xu, *Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by Pachysolen tannophilus*. Biotechnol Lett, 2007: p. 5.

8. S. Sánchez, V.B., A.J Moya, E. Castro, F. Camacho, *Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by Pachysolen tannophilus to produce ethanol and xylitol*. Process Biochemistry, 2004. 39: p. 6.

9. Miranda, J.C.S., *Kinetic, intracellular atp growth and maintenance studies, and modeling of metabolically engineered Zymomonas Mobilis fermenting glucose and xylose mixtures*. 2006, University of Puerto Rico at Mayagüez: Mayagüez. p. 180.