

CAPÍTULO

4



Obtención de glucosa a partir de cáscaras de frutas

por medio
de microorganismos
celulolíticos para la generación
de etanol

POR

Ana Rosa Alexandra **MONROY ARAGÓN**

Enma Janina **LÓPEZ BÁEZ**

Maritza de los Ángeles **MIER QUIROZ**

Introducción

El aprovechamiento de los residuos celulolíticos es una de las principales reservas energéticas de la población actual y ha tenido un gran impacto mundial, siendo la base de diferentes investigaciones en las cuales se aplican diferentes tecnologías y convirtiendo los residuos antes mencionados en materia prima para generar biotecnología o productos derivados. La falta de interés que se evidencia por la materia prima mencionada se debe a que los procesos químicos de transformación resultan muy costosos y contaminantes (Marquina, 1992).

Por otro lado, una porción significativa de los residuos que se generan diariamente provienen de las frutas y representan aproximadamente el 20% de los residuos orgánicos domésticos, además constituyen uno de los alimentos mayormente consumidos por la población en la actualidad, siendo estos residuos ricos en celulosa de fácil degradación (Losada, Bohórquez & Cueto, 2012).

Una forma de abordar el problema del aprovechamiento de los residuos celulolíticos es mediante tratamientos enzimáticos, cuyos procesos son mucho más económicos pero poco planteados porque la fisiología de los microorganismos capaces de degradar la celulosa es muy extensa y poco conocida (Marquina, 1992).

En esta investigación se abordó el problema con microorganismos celulolíticos que ayudaron a descomponer la celulosa de las cáscaras de frutas en glucosa, proceso que resulta mucho más económico y no genera ningún tipo de contaminación, produciendo de esta forma el monosacárido a partir de los residuos ya mencionados. Se investigó la cantidad de celulosa que contienen estos y se utilizaron microorganismos celulolíticos capaces de transformar la celulosa en glucosa, seguidamente se evaluó la glucosa obtenida convirtiéndola en bioetanol y haciendo la fermentación con kéfir de agua (tibico) para lograr una alternativa que puede ser aplicada en el futuro y a su vez es la base de otras investigaciones.

Materiales y métodos

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 2 tratamientos y 1 testigo, con 4 repeticiones, dándonos un total de 12 unidades experimentales para nuestro ensayo.

La aplicación de los tratamientos se distribuyó de la siguiente manera:

TABLA 1. Descripción de microorganismos utilizados en el ensayo

Microorganismos	Descripción
Microorganismo 1	<i>Penicillium pinophilum</i>
Microorganismo 2	<i>Trichoderma sp</i>

Fuente: Elaboración propia

TABLA 2. Descripción del testigo

Tiempos	Descripción
Testigo	Residuos de frutas + Agua destilada

Fuente: Elaboración propia

Durante el desarrollo del ensayo se evaluó las siguientes variables dependientes y variables de control:

TABLA 3. Variables a investigar durante el ensayo

Variables Dependientes	Unidades
° Brix	%
Grados de alcohol	%
Cantidad de alcohol	ml
Variables De Control	Unidades
pH de la fermentación	
Densidad del alcohol	gr.cm ³

Fuente: Elaboración propia

Manejo del ensayo

Inoculación de las muestras de *Penicillium pinophilum* y *Trichoderma sp*

Se pusieron 125 ml de agua destilada en un Frasco Boeco de 250 ml, se pesó 1g de nutriente (Nutrient Broth Acumedico®), se agitó suavemente y se tapó parcialmente. Se llevó a autoclavar en un autoclave vertical NB-1080 BIOTEK® a 120 °C por un espacio de 30 minutos y se pusieron 100 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Posteriormente se pesaron 0,76 g de Agar LB Miller Acumedico®, se tapó con un algodón recubierto de gasa y se llevó a autoclavar en un autoclave vertical NB-1080 BIOTEK® a 120 °C durante 30 min. Luego, se repitió el mismo proceso anterior para el número de unidades experimentales en estudio. Se tomaron las cajas petri y se procedió a envolverlas en papel para autoclavarlas en el autoclave a 120 °C durante 30 min, y se dejaron enfriar los materiales.

Luego, se puso el nutriente (Nutrient Broth Acumedico®) en las cajas petri autoclavadas previamente hasta tres cuartos del total de su capacidad. Se dejó reposar hasta que se solidificara el nutriente y se procedió a encender el mechero y mantener estéril la zona donde se hizo la siembra.

Se tomó una muestra de las cepas de *Penicillium pinophilum* y *Trichoderma sp*. con un asa microbiológica de platino, se frotó suavemente el asa en forma de zigzag y se pro-

cedió a sellar con parafilm, luego, se desinfectó el asa y se tomó otra muestra de las cepas de *Penicillium pinophilum* y *Trichoderma sp.* Se introdujo el asa en el matraz Erlenmeyer y se agitó suavemente repitiendo el mismo procedimiento en los 7 matraces que se usaron en todo el ensayo. Se pusieron los tapones en los matraces y se llevó a la incubadora de agitación a 30 °C y a 100 rpm durante 7 días.

Transcurrido este tiempo se procedió al conteo en la cámara de Neubauer para controlar la multiplicación de las cepas obteniéndose así una concentración de los hongos en promedio de 10^6 cel.ml⁻¹.

Preparación de la biomasa en estudio

Se recolectaron los residuos frescos de las frutas en estudio, banano (*Musa paradisiaca*), piña (*Ananas comosus*), guayaba (*Psidium guajava*) y chirimoya (*Annona cherimola*) y se cortaron en finos trozos los residuos obtenidos triturándose en el molino de cuchillas GRINDOMIX GM 200 RETSCH®. Se echaron los residuos en una solución de hipoclorito al 10 % durante 30 segundos y luego se lavó con agua destilada. Se pesaron 250 g de cáscaras de banano (*Musa paradisiaca*), 250 g de cáscaras de piña (*Ananas comosus*), 250 g de guayaba (*Psidium guajava*) y 250 g de cáscaras de chirimoya (*Annona cherimola*) y se introdujeron en el termo previamente limpio y desinfectado. Se procedió después a añadir al termo, juntamente con los residuos 100 ml de agua destilada y los 100 ml de la solución de los hongos propagados anteriormente. Se etiquetó y selló todo con parafilm y, por último, se pusieron de dos a tres sorbetes en la parte superior para que las muestras pudieran ser aireadas sin contaminación.

Control de los grados Brix

Se destaparon los termos y se agitó suavemente la muestra, se tomó 1 ml de la muestra para analizar la cantidad de grados Brix en el refractómetro de mano DR 301-95 Kruss®. Una vez leídos se anotaron los resultados y se procedió a sellar nuevamente el termo. **Nota:** Este procedimiento se realizó cada 24 horas durante los 22 días que dura la producción de glucosa.

Filtrado de la muestra

Se destaparon los termos, se pasó la muestra por un tamiz y se pesó la parte sólida obtenida. Se pasaron las muestras por papel de semifiltro y se filtraron dos veces más a través de papel filtro 640d-125mm Macherey Nagen®. Posteriormente se pusieron las muestras en frascos Boeco de 500 ml, se etiquetaron y se refrigeraron.

Análisis de la glucosa obtenida

El análisis de la cantidad de glucosa obtenida se hizo en el laboratorio SODERAL y en un equipo 930 Compact IC Flex Oven/Deg, Metrohm®. En la calibración del equipo se usó glucosa estándar (material puro) en agua TraceSELECT®. Con edulcorante usando en la cromatografía de exclusión iónica se usó la detección amperométrica pulsada después

de la postcolumna adicionando hidróxido de sodio, para lo cual se disolvió 1 g de muestra en 20 ml de agua ultra pura y se inyectó en una disolución de 1: 1000.

1. La técnica usada es (Metrohm, s.f):

- Columna: 6.1005.200 Metrosep Organic Acids, Metrohm®.
- Eluyente: 20 mmol / L de ácido sulfúrico
- Reactivo PCA: hidróxido sódico 200mmol / L (Flujo: 0,32 ml / min)
- Voltaje: 50 mV
- Temperatura: 30 °C
- Flujo: 0,8 ml / min
- Volumen de inyección: 20 µl
- Tiempo recorrido: 10min
- Presión: 11,54 MPa

2. El tiempo de retención para la glucosa es de 4 min.

Reproducción previa de los microorganismos tibicos (kéfir de agua)

Se tomó una cantidad pequeña de tibicos y se pusieron en agua con panela y se cambió el agua con panela cada 3 o 4 días para acelerar así su reproducción.

Obtención de bioetanol

Se midió el volumen de las muestras obtenidas luego de la filtración y se hizo la relación de 200 g de tibicos en un litro de muestra para saber la cantidad de ellos a ser colocada en cada unidad experimental. Se tomaron los tibicos previamente reproducidos y pasados por un tamiz y se pusieron en papel absorbente para eliminar toda el agua. Se pesó la cantidad necesaria de tibicos para cada unidad experimental y se pusieron en el frasco Boeco junto con las muestras filtradas, que no se habían cerrado completamente. El proceso duró 4 días y cada 24 horas se midieron el pH y los grados Brix.

Destilación del bioetanol

Se tomaron los frascos Boeco con la mezcla de la muestra filtrada y los tibicos y se filtraron las muestras por un tamiz. Se armó el equipo de destilación simple y se destiló el alcohol a 85 °C. Se midió el volumen destilado y el grado alcohólico con el densitómetro 30PX Mettler Toledo®. Se puso el alcohol obtenido mediante destilación simple y se trasladó a un frasco ámbar. Posteriormente se armó el equipo de destilación fraccionada y se destiló la muestra obtenida a 85 °C. Se midió el volumen destilado, el grado alcohólico y la densidad el alcohol con el densitómetro 30PX Mettler Toledo®.

Resultados y discusión

Variación de los Grados Brix durante los 21 días de producción de la glucosa

TABLA 4. Análisis ADEVA grados Brix en la producción de glucosa, día 21

FV	GL	SC	CM	Fo	F _{0,05}
Total	11	158.70			
Tratamientos	3	158.35	52.78	1172.96	**
Error experimental	8	0.36	0.05		
CV	2.12				

Fuente: Elaboración propia

TABLA 5. Variación de grados Brix durante la producción de glucosa

Microorganismos	Producción de glucosa a los 21 días			
	Grados Brix			
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<i>Penicillium pinophilum</i>	3.65	6.65	8.68	12.15
<i>Trichoderma sp.</i>	3,65	6.45	8.48	11.80
Testigo	3.65	3.75	4.28	4.28

Fuente: Elaboración propia

El aumento de los °Brix es evidente, desde el día 1 hasta el 22, un promedio de 8 °Brix, como se indica en la tabla 5, siendo de esta forma el tratamiento al *Penicillium pinophilum* el mejor alcanzando un total de 12.15 °Brix. Seguidamente, el tratamiento de *Trichoderma sp.* alcanzó un promedio de 11.8 °Brix, dándose una ligera diferencia entre los tratamientos propuestos. Comparándolo con el testigo tuvo un aumento mínimo desde el día 1 al 22 un total de 0,63 °Brix conociendo que este no poseía ninguna cepa de microorganismos, como se ve en la **FIGURA 1**.

El control de esta variable al conocer lo mencionado en el estudio de Santiago, Mendoza & Borrego (1998) nos dice que la cantidad de grados Brix es el indicativo de la cantidad de azúcar presente en los frutos y mostrando una buena calidad ellos. Por lo antes mencionado, el control de esta variable es importante, ya que nos permite conocer la cantidad de glucosa generada.

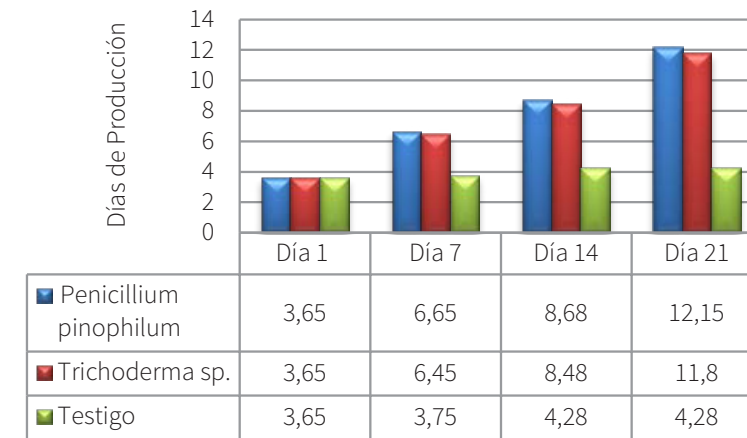


FIGURA 1 Variación de grados Brix durante la producción de glucosa. Fuente: Elaboración propia

Concentración de glucosa

TABLA 6. Análisis ADEVA de la concentración de glucosa

FV	GL	SC	CM	Fo	F _{0,05}
Total	11	72.32			
Tratamientos	3	71.25	35.63	271.47	**
Error experimental	8	1.05	0.13		
CV	5.70				

Fuente: Elaboración propia

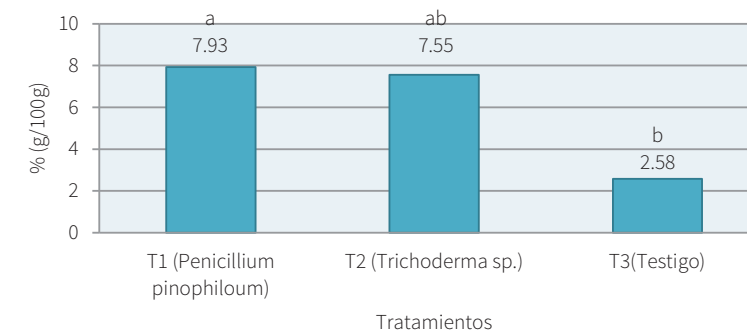


FIGURA 2 Promedios de concentración de glucosa. Fuente: Elaboración propia

La concentración de glucosa está relacionada con la cantidad de grados Brix que posee la muestra (/así nos indica Santiago, Mendoza y Borrego, 1998). En esta variable, la muestra de *Penicillium pinophilum* es la que posee mayor concentración de glucosa con 7.93 % (g/100g) seguida de *Trichoderma sp.*, que tiene un promedio de 7.55 % (g/100g), a diferencia del testigo, en el que hubo 2.58 % (g/100g) de concentración de glucosa, siendo directamente proporcional a la cantidad de grados Brix que se mantuvieron en el mismo orden de proporcionalidad.

Por otra parte, Wood & McCrase (1986) y Bohórquez, D.M. & Pérez, L. I. (2007) manifiestan que los tiempos de reacción de *Penicillium pinophilum* son mayores que los de la familia de *Trichoderma*, además de que poseen patrones de degradación más complejos, por lo que degradan con mayor facilidad la celulosa; también añaden que hace falta investigar más para establecer la forma de adsorción y los mecanismos que se involucran en este proceso.

pH del alcohol obtenido

TABLA 7. Análisis ADEVA del pH del alcohol obtenido

FV	GL	SC	CM	Fo	F _{0,05}
Total	11	0.011			
Tratamientos	3	0.004	0.00	1.33	Ns
Error experimental	8	0.008	0.00		
CV	0,37				

Fuente: Elaboración propia

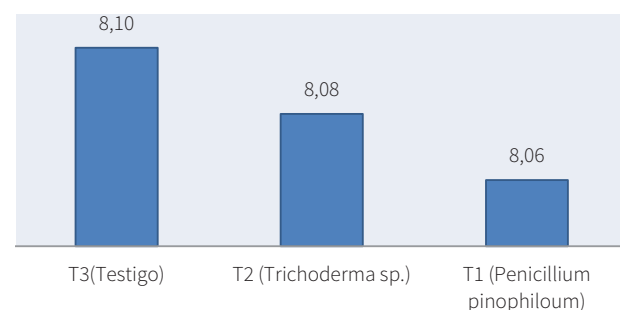


FIGURA 3 Promedios del pH del alcohol obtenido. Fuente: Elaboración propia

El pH del alcohol obtenido es muy importante, y según afirma Lechón (2014) a menor pH hay mayor producción de alcohol, además, el pH bajo proporciona mejores condiciones para los microorganismos que llevan a cabo la fermentación alcohólica.

La obtención de alcohol se produjo en 96 horas (4 días), en la cual el pH se mantuvo constante, siendo en promedio el mayor *Trichoderma sp.* con 8.151 y el menor *Penicillium pinophilum* 8.086, manteniendo una ligera diferencia el testigo, que en el tiempo de fermentación se mantuvo en 8.110 durante los cuatro días de fermentación alcohólica a la que fueron sometidos los tratamientos.

Monsalve, Medina & Ruiz (2006) obtuvieron alcohol de cáscaras de banano y almidón de yuca alcanzando resultados de un pH de 8.003, al igual que en el ensayo propuesto, en el que se obtuvo para *Penicillium pinophilum* 8.06, para *Trichoderma sp.* 8.08 y para el testigo 8.06, considerándose un alcohol medianamente bueno, ya que a menor pH, mayor es la calidad del alcohol, tal como manifiestan Gutiérrez, Elizondo & Díaz (2002); además indican que el pH de la cerveza artesanal y la cerveza industrial es 4, el cual es considerado un buen alcohol en todo el mundo.

Densidad del alcohol obtenido

TABLA 8. Análisis ADEVA de la densidad del alcohol obtenido

FV	GL	SC	CM	Fo	F _{0,05}
Total	11	0.028			
Tratamientos	3	0.028	0.01	8797.25	**
Error experimental	8	0.000	0.00		
CV	0.10				

Fuente: Elaboración propia

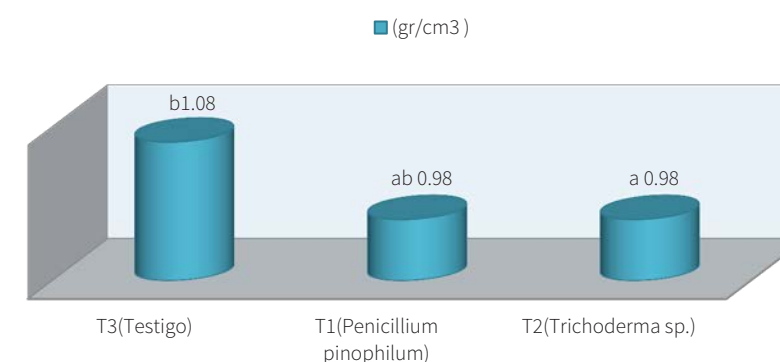


FIGURA 4 Promedios de la densidad del alcohol obtenido. Fuente: Elaboración propia

Respecto a la densidad del alcohol en los tratamientos propuestos tenemos a *Trichoderma sp.* con una densidad de 0.98 gr/cm³, de igual forma, *Penicillium pinophilum* alcanzó 0.98 gr/cm³ en contraste con el testigo, que fue el que tuvo una densidad más alta de 1.08 gr/cm³ y no presentó ningún microorganismo, en comparación con la investigación de Lechón (2014), la cual nos dice que la presencia de tibus hace menos denso el alcohol, dando la relación de que cuanto mayor sea la cantidad de tibus, más afecta la densidad disminuyéndola.

Medina (1994) indica que es importante la densidad de un alcohol, ya que nos indica todas las características que este posee, como acidez y grado alcohólico, entre otros. Añade que si la densidad de un vino es alta se supone la presencia de azúcar; y si es baja la presencia de mayor cantidad de alcohol. Así, nuestra investigación indica que el testigo aún posee residuos de azúcar; sin embargo, los tratamientos de *Trichoderma sp.* y *Penicillium pinophilum* indican la presencia de mayor cantidad de alcohol que en el testigo.

Porcentaje del alcohol final

TABLA 9. Análisis ADEVA del porcentaje de alcohol obtenido en la d. simple

FV	GL	SC	CM	Fo	F _{0,05}
Total	11	11.35			
Tratamientos	3	11.07	3.69	105.43	**
Error experimental	8	0.28	0.04		
CV	5.01				

Fuente: Elaboración propia

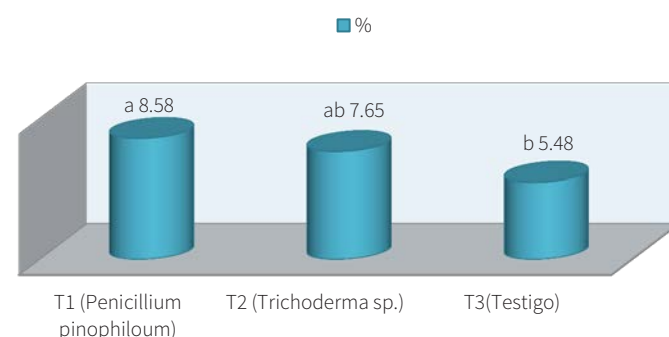


FIGURA 5

Promedios del porcentaje de alcohol en la destilación. Fraccionada en rangos. Fuente: Elaboración propia

Mosquera, Cumbal Moreira (2008) afirman que un incremento en la pureza del alcohol disminuye su volumen y este se alcanza en la segunda destilación, que es la fraccionada.

El porcentaje de alcohol obtenido aumenta en *Penicillium pinophilum* de 4.20% a 8.58%, para *Trichoderma sp.* aumenta de 4.18% a 7.65%, y en el caso del testigo aumenta de 2.15% a 5.48%, confirmando lo antes mencionado, que en la destilación fraccionada se obtiene un alcohol más puro pero su volumen es menor.

Conclusiones

En los tratamientos aplicados tanto de *Penicillium pinophilum* como de *Trichoderma sp.* en la cantidad de glucosa obtenida, el resultado fue similar, siendo en promedio 7.93% (g/100g) y 7.55% (g/100 g) respectivamente; sin embargo, al comparar los tratamientos con el testigo hay una diferencia estadística altamente significativa entre los datos, ya que el testigo logró producir 2.58% (g/100g).

Los grados Brix fueron un indicativo en la producción de glucosa, pues durante los 21 días de producción se alcanzó en promedio para *Trichoderma sp.* 11.80% de grados Brix y *Penicillium pinophilum* alcanzó 12.15% de grados Brix, siendo los dos microorganismos celulolíticos buenos productores de glucosa. Por el contrario, el testigo alcanzó 4.28% de grados Brix.

En la producción de etanol, el kéfir de agua (tibicos) logró que las muestras perdieran grados Brix en el proceso de fermentación alcohólica, así, *Penicillium pinophilum* logró perder 1.88 grados Brix, seguida de *Trichoderma sp.*, que perdió 1,55 grados Brix, y finalmente lo comparamos con el testigo, que tan solo perdió 0,73 grados Brix.

El porcentaje del etanol obtenido fue de un 8.58% para *Penicillium pinophilum* y de 7.65% para *Trichoderma sp.*, y comparándolo con el testigo, este alcanzó un porcentaje de 5,48% de alcohol.

Referencias

- Bohórquez, D.M.,; Pérez, L.I. (2007) *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (dendranthema grandiflora)*. Bogotá.
- Gutiérrez, A.; Elizondo, A., & Días, A. (2002) *Cervezas artesanales: características fisicoquímicas y microbiológicas-comparación con cervezas industriales*. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Argentina: Industrialización de Alimentos. 4º Jornadas de desarrollo e Innovación.
- Lechón, G. (2014) *Evaluación del kéfir de agua (tibicos) utilizado en diferentes dosis, en sustratos de melaza y panela para la producción de etanol*. Ibarra: Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra.
- Losada, L.; Bohórquez, L.; Cueto, M. (2012) *Estudio de la actividad enzimática celulolítica en la etapa termófila de una fermentación en estado sólido realizada a partir de residuos generados en el procesamiento industrial de papa*. Chía: Universidad Politécnica de Valencia.
- Marquina, D. (1992) *Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid-Facultad de Biología.
- Medina, G. (1994) *Análisis fisicoquímico de alimentos*. Santa Fé de Bogotá.
- Monsalve, J.; Medina, V.; Ruiz, A. (2006) *Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca*. Medellín: Grupo de bioprocesos-Grupo de Combustibles alternativos, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Mosquera, M.; Cumbal, L.; Moreira, P. (2008) *Obtención de etanol anhidro a partir de materiales feculentos de producción nacional: maíz (zea maiz) y yuca (Manihot esculenta crantz)*. Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Santiago, J.; Mendoza, M.; Borrego, F. (1998) *Evaluación de tomate (Lycopersicon esculentum, Mill) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos*. Agronomía mesoamericana.
- Wood, T.; McCrase, S. (1986) *The cellulase of Penicillium pinophilum. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases*. Biochemical Journal.