

Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L*) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* spp y cepa recombinante RH 218*

Hydrolysis and simultaneous alcoholic fermentation (HFS) of the agroindustrial residue of common mango (*Mangifera indica L*) by using *Saccharomyces cerevisiae* spp and recombinant strain RH 218

Luis Fernando Mejía, Diana Carolina Albán, Natalia Murcia, Raúl Cuervo, Jorge Durán

Resumen

Se evaluó la producción de etanol a partir de hidrólisis y fermentación simultánea (HFS) de residuos generados en el procesamiento de mango común (*Mangifera indica*) utilizando dos cepas

de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* recombinante RH 218.

Mediante tratamientos preliminares de hidrólisis y fermentación se seleccionaron las siguientes condiciones de

• Fecha de recepción del artículo: 15 de abril de 2009 • Fecha de aceptación: 4 de agosto de 2009.

Luis Fernando Mejía. Ingeniero agroindustrial de la Universidad Gran Colombia. Doctorado en Ciencias de la Universidad de Valencia, España (c). Docente - investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de San Buenaventura Cali, Colombia. lfmejia@usbcali.edu.co. **Diana Carolina Albán.** Ingeniera Agroindustrial, USB Cali, Colombia. dica_alban@yahoo.com **Natalia Murcia.** Ingeniera Agroindustrial, USB Cali, Colombia. nati8272@hotmail.com. **Raúl Cuervo.** Biólogo genético y Magíster en Ciencias Biológicas. Doctorado en Ciencias Biológicas (c) de la Universidad del Valle. Docente - investigador y director del grupo de investigación Biotecnológica de la USB Cali, Colombia. racuervo@usbcali.edu.co. **Jorge Durán.** Químico. Magíster en Educación y Desarrollo Humano de la USB Cali. Docente - investigador del programa de Ingeniería Agroindustrial de la USB Cali, Colombia. jaduran@usbcali.edu.co.

* Este artículo es un producto del proyecto de investigación: Evaluación comparada de la hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L*) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y cepa recombinante RH 218.

trabajo: hidrólisis térmica a 98°C por una hora, hidrólisis enzimática mediante la aplicación de Celluclast^{MR} 1.5 L; aplicación de 3% de levadura y tiempo de fermentación de cinco días, monitoreando las variables pH, °Brix, fibra residual, biomasa, azúcares reductores y etanol. La levadura comercial marca A, presentó el menor contenido de etano (0,58%) y el más alto contenido de azúcares reductores (1,93 mg de azúcar/g de materia seca) y la levadura recombinante RH 218 presentó un contenido de alcohol de 0,76% y azúcares reductores de 1,38 mg de azúcar/g de materia seca.

Palabras clave: Residuos de Mango común. Hidrólisis y fermentación simultánea, bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae* spp, cepa recombinante RH 218.

Abstract

We evaluated the production of ethanol from hydrolysis and simultaneous fermentation (HFS) of the residues generated in the processing of common mango (*Mangifera indica*) by using two strains of commercial *Saccharomyces cerevisiae* recombinant yeast RH 218.

Through preliminary treatment of hydrolysis and fermentation, the following working conditions were selected: thermal hydrolysis at 98°C for one hour, enzymatic hydrolysis through the application of Celluclast MR 1.5 L; application of 3% of yeast and fermentation time of five days, monitoring pH variables, °Brix, residual fiber, biomass, reducing sugars and ethanol. The commercial yeast brand A had the lowest content of ethane (0,58%) and the highest content of reducing sugar (1.93 mg sugar/g of dry matter) and the recombinant yeast HR 218 presented a content of alcohol of 0,76% and reducing sugars of 1,38 mg sugar/g of dry matter.

Keywords: Residue of common mango. Hydrolysis and simultaneous fermentation, bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae* spp, recombinant strain RH 218.

Introducción

Los residuos agroindustriales producidos por las industrias de jugos y pulpas son en su mayoría materias primas ricas en carbohidratos de bajo costo, y fuente abundante de azúcares fermentables. Actualmente en Colombia los residuos lignocelulósicos están siendo subutilizados, lo cual causa serios problemas de contaminación ambiental por su deficiente disposición final, a pesar de que son potencialmente buenos para ser utilizados como materia prima en la producción de azúcares, alimento para animales, biomasa microbiana, producción de ácidos orgánicos, entre otros.¹

Los residuos lignocelulósicos pueden ser hidrolizados por enzimas hemicelulolíticas y celulolíticas, las cuales no son suficientes para la degradación total de los carbohidratos poliméricos, por tanto se requiere también de tratamientos preliminares efectivos para la utilización de dichos residuos en la producción de alcohol etílico. El proceso para la obtención de etanol a partir de un desecho agrícola requiere de etapas de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa para la obtención de etanol por vía fermentativa.

Las investigaciones en búsqueda de mayor productividad en la producción de alcohol carburante a partir de materias primas consideradas desechos agroindustriales se convierte en una necesidad para suplir satisfactoriamente la demanda de otras fuentes de energía de manera sostenible.

En el Valle del Cauca se procesan aproximadamente 351.5 toneladas/semana de mango común para la agroin-

1. Calvache, Mabel; Perea Leidy; Torres Carmen; Evaluación de la Fermentación Alcohólica del Residuo Agroindustria del Mango Común (*Mangifera indica* L.) Mediante Tratamientos Hidrolíticos Previos e Hidrólisis y Fermentación Simultánea, UNAL 2005.

dustria de pulpas y jugos de mango, lo cual crea un problema de contaminación ambiental con los residuos obtenidos. Solamente en el despulpado de mango se generan cerca de 50%-55% de residuos, es decir, aproximadamente 193.32 toneladas/semana, representados en cáscara, semillas, restos de pulpa y fibra². Este residuo comprende tres componentes: cáscara o pericarpio, bagazo y semilla. Esta es una materia prima rica en carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, y lignina) que al ser hidrolizados producen azúcares fermentables útiles para la obtención de productos de alto valor agregado, como el bioetanol.

En los procesos de hidrólisis y fermentación simultánea (HFS), las etapas son las mismas que en los sistemas de fermentación e hidrólisis por separado, excepto que ambos se desarrollan en el mismo reactor. La levadura junto con la enzima celulolítica reduce la acumulación de azúcares en el reactor, incrementa la tasa de hidrólisis y por ende el rendimiento con respecto a la fermentación e hidrólisis por separado.³

Los procesos de HFS requieren condiciones similares de pH, T° y concentración óptima de sustrato, tanto para la hidrólisis como para la fermentación. Uno de los problemas asociados a la HFS es la diferencia de temperatura óptima para cada proceso; sin embargo, para disminuir este problema en los procesos HFS se están empleando levaduras termotolerantes, como la *Kluyveromyces fragilis*, para aumentar aun más el rendimiento con respecto a la levadura convencional⁴; esta última fue utilizada en el estudio sin modificar y modificada genéticamente.

La tasa de sacarificación en el proceso de hidrólisis y fermentación por separado se ve fuertemente afectada por la inhibición del producto final. En la HFS la inhibición disminuye debido a que la glucosa es consumida por el



Dónde se cuenta lo que le sucedió a Don Quijote, yendo a ver su señora Dulcinea del Toboso.

organismo fermentativo tan pronto como este se desarrolla. Otras ventajas de la HFS es que disminuye los costos del proceso debido a la eliminación de una etapa, y presenta menor riesgo de contaminación, ya que la concentración de glucosa es reducida.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea del residuo agroindustrial mango común, *Mangifera indica*, en la producción de etanol mediante dos cepas de levadura comercial de *Saccharomyces cerevisiae* spp y una cepa recombinante RH 218.

Materiales y métodos

Microorganismos

Se utilizaron tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, dos comerciales y una modificada genéticamente (RH 218). Las levaduras comerciales se designaron como *Saccharomyces cerevisiae* spp marca A y *Saccharomyces cerevisiae* spp marca B.

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* RH 218 fueron obtenidas tras la

2. Ordóñez S., Luis Eduardo. Proyecto Estudio generación de residuos vegetales en el Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 2002.

3. Betancourt y col., 2003, Buitrago y col., 2004, López y col., 2005 UNAL

4. Nellaiah, H., Karunakaran, T and Gunasekaran, P., J. *Ferment. Technol.*, 1988.

transformación genética de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC con el plásmido pBR322 de *E. coli*, el cual actúa como un *shuttle vector* con marcadores de ampicilina y tetraciclina, origen de replicación de 122Bp proveniente de *E. coli*, y un inserto de 178Bp correspondiente al gen que actúa en la fermentación alcohólica. Este procedimiento de transformación genética se realizó según el protocolo *Bihrhoim and Dolly*, (1979). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa RH 218 (genotipo: *trp1 gal2 SUC2 ma1 CUP1*), con el plásmido recombinante pHBs-1, se modificó siguiendo el protocolo clásico para transformación de levaduras con acetato de litio.

La levadura recombinante se creció en un medio ideal *yeast peptone dextrose* (YPD) y en *yeast peptone dextrose agar* (YPDA), donde el plásmido recombinante fue expresado al aumentar la eficiencia de la fermentación alcohólica de la levadura mediante la hidrólisis de pentosas.⁵ Esta levadura se denominó levadura recombinante RH 218 y se almacenó a -20°C en glicerol al 10%.

La propagación de las levaduras se realizó en cámara de flujo laminar a pH 5.0, temperatura de 30°C y período de incubación de 3 días. Una vez transcurrido este tiempo se sometieron a centrifugación y filtración. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante se dispuso para inoculación directa, al igual que las dos levaduras comerciales.

Sustrato

Se utilizó como sustrato de fermentación residuos del despulpado de mango común (cáscaras y bagazo), los cuales se obtuvieron de la empresa Indupulpas Ltda. de la ciudad de Cali.

La cáscara, el bagazo y mezcla de fibra y pulpa se deshidrataron *en un* secador de bandejas a una temperatura de 45°C, con el fin de remover el agua

y evitar modificaciones en el material. Por estudios previos se tiene que en el proceso de secado se logra retirar el 80% de humedad, es decir, que el material queda con un contenido de materia seca del 20%. Esta operación se debe realizar por un período de 72 horas,⁵ con lo cual se evitará el deterioro del residuo, y se empaquetará al vacío en bolsas plásticas calibre 5.

La molienda del material deshidratado se realizó en un molino de cuchillas y posteriormente se tamizó en una cascada de tamices (mallas 16, 30, 60, 80).

Enzimas

Adicionalmente se realizaron pruebas con el fin de evidenciar la actividad de la enzima, y se evaluó su desempeño en un medio rico en celulosa, papel filtro y carboximetilcelulosa. Se evaluó el desempeño de la enzima monitoreando el cambio en los °Brix diariamente por 4 días. (T0 = día de inicio, T1 = día 1, T2 = día 2, T3 = día 3, T4 = día 4). Las pruebas que se realizaron fueron:

Prueba 1 (P1)

En caja de petri estéril, se adicionó 0.9851g de papel filtro (110 mm), agua destilada estéril (pH 4.0) y enzima (24 μ l), y se incubó a 36°C.

Prueba 2 (P2)

En caja de petri estéril, se adicionó 0.9851g de papel filtro (110 mm), agua destilada estéril (pH 5.0) y enzima (24 μ l), y se incubó a 36°C.

Prueba 3 (P3)

En caja de petri se adicionó carboximetilcelulosa al 1%, agua destilada estéril (pH 5.0) y enzima (24 μ l), y se incubó a 50°C.

5. Cuervo, Raúl; Cerón, Flavio; Gómez, Romel; García, Sandra; Niño, Ricardo; Osorio, Esteban. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Bogotá 1999.

Hidrólisis del sustrato

Se efectuaron ensayos preliminares, acondicionamiento del inóculo y preparación del sustrato (caldo) para la fermentación. El material deshidratado fue previamente re-hidratado en agua.

Las muestras se pre-trataron térmicamente, seguido de un tratamiento enzimático. El medio preparado de residuo de mango compuesto por bagazo y cáscara y agua se sometió a una temperatura de 98°C por una hora. Posterior al tratamiento térmico se enfrió el medio hasta 40°C para adicionar la enzima Celluclast^{MR} (1.5 L). La reacción se llevó a cabo por 30 minutos con agitación lenta.

La levadura obtenida en la propagación se inoculó al 3% (con base en la unidad de fermentación de 250 ml).

La formulación del medio se realizó teniendo en cuenta el contenido de nutrientes (en base seca) disponibles en el residuo, así: proteína, 7.03%; grasa, 5.5%; celulosa, 14.92%; hemicelulosa, 3.96%; lignina, 1.33%; cenizas, 3.48%. Para los tratamientos se trabajó a una concentración de materia seca igual o mayor a 2.5% p/v⁵. El acondicionamiento del material para las pruebas preliminares se hizo pesando diferentes cantidades de mango común deshidratado molido tamizado, reconstituido con agua destilada. La unidad de trabajo fue 250 ml de suspensión; el pH se ajustó a 5.0. Se realizó autoclavado del material residual re-hidratado, luego se enfrió el material hasta 40°C para adicionar la enzima Celluclast^{MR} (1.5 L), dejando que la reacción se llevara a cabo por 30 minutos con agitación lenta. Posteriormente se estabilizó la temperatura a 30°C, preparando así el medio para la inoculación con las levaduras en cada caso.

El sustrato estaba compuesto de residuo deshidratado (50% cáscara - 50% bagazo), agua y levadura a evaluar, y se

realizó un choque térmico para inactivar cualquier proceso enzimático. Esta muestra se realizó con el fin de analizar el contenido de fibra inicial del proceso teniendo en cuenta el aporte que realiza la levadura sobre el mismo cuando no hay filtración diferencial. Se trabajó con dos medios simultáneamente, tratamiento y testigo.

Tratamientos preliminares de hidrólisis y fermentación

Se llevaron a cabo cuatro pruebas preliminares de la siguiente manera:

Porcentaje de residuo sólido seco re-hidratado en agua:

1. Sólidos: 2.5%
2. Sólidos: 5%
3. Sólidos: 7.5 %
4. Sólidos: 10%

Las variables evaluadas en este proceso fueron pH (se ajustó al inicio a 5.0 con una solución de NaOH al 45%), °Brix, respiración de la levadura (evidenciada en la presencia de un burbujeo activo del medio durante todo el proceso), y aroma característico a alcohol al final del proceso fermentativo. Estos tratamientos tuvieron una duración total de 96 horas. Cantidad total de muestra, 250 ml; Celluclast, 1.5 L 8 µl/g de sólido de residuo; levadura, 20% p/p. Tiempo del proceso fermentativo: 5 días, así: T0, fase aerobia (1 día) y T1 - T4, fase anaerobia (3 días).

Fermentación y toma de muestras de los tratamientos

Cada fermentador de vidrio con capacidad de 250 ml se colocó sobre un equipo de agitación con calentamiento a una temperatura de 30°C. Para el suministro de aire al sistema se le instaló una

bomba de pecera provista de un filtro de 0.22 micras para evitar la entrada de microorganismos. Se introdujo una manguera en cada fermentador dentro del medio para facilitar la aireación.

La fermentación se inició desde la inoculación (tiempo cero de la fermentación) del sustrato pretratado y re-suspendido al 7.5% p/v. La velocidad de agitación del medio fue de 250 rpm. Cumplidas las 24 horas de iniciado el proceso fermentativo (tiempo uno de la fermentación) se dio por terminada la fase aerobia y se retiraron las mangueras y la bomba de pecera, y se depositaron en cuatro tubos de ensayo (rotulados con los números 1, 2, 3 y 4, correspondientes a los días 1, 2, 3 y 4) muestras de 5 ml que sirvieron para monitorear el proceso fermentativo. Se ajustó el montaje con la ayuda de una bomba de vacío cuya manguera se introdujo hasta el cuello del fermentador con el fin de lograr las condiciones idóneas para la fase anaerobia. La manguera se adaptó en una trampa de agua; se selló la boca del fermentador, para evitar la contaminación del sustrato. Este mismo montaje anaerobio se realizó en los cuatro tubos de ensayo. A partir de este momento se dio inicio al monitoreo del proceso por un período de incubación de cuatro días.

Al finalizar el proceso fermentativo, es decir, a las 96 horas, se sometió éste a un choque térmico que incrementó la temperatura a 80°C por 15 minutos, lo cual detuvo la actividad enzimática existente en el fermento y el desarrollo metabólico microbiano siguiendo el diseño metodológico (ver Tabla 1).

Las variables de respuesta y los métodos de evaluación en las fermentaciones fueron:

Fibra: Método Van Soest, P.J., Robertson, J.D., Lewis, B.A. 1991.

Azúcares reductores: Método Colorimétrico de fenil sulfúrico.

Biomasa: Método de conteo directo en placa.

Alcohol etílico: cromatografía de gases, patrones etanol y butanol. Tiempo de retención, 1,300 min y 2,950 min respectivamente.

En la Tabla 1 se presentan las variables de estudio, las cuales se analizaron mediante un ANOVA de un solo factor (tipo de levadura utilizada) con tres niveles (*Saccharomyces cerevisiae* RH 218, *Saccharomyces cerevisiae* spp marca comercial A, y *Saccharomyces cerevisiae* spp marca comercial B).

Tabla 1
Diseño metodológico y factores evaluados

Material de estudio n = 1	Variables de tratamiento n = 3	Variables de respuesta n = 4
Residuo de mango común deshidratado tamizado y resuspendido (2.5%p/v)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RH 218	% Fibra % Celulosa % Hemicelulosa % Lignina
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> spp marca comercial A	Azúcares reductores (mg de azúcar/g de materia seca)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> spp marca comercial B	Biomasa (UFC) % Alcohol etílico

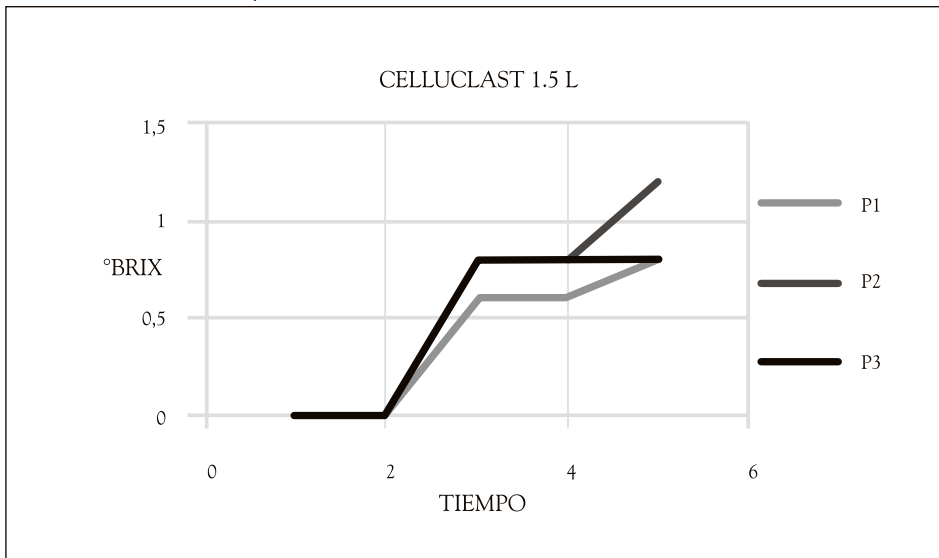
Resultados y discusión

Pruebas de actividad enzimática

De las pruebas utilizadas para evidenciar la actividad de la enzima se seleccionó la prueba P2. Esta prueba mostró un incremento de 1.2 °Brix (Gráfico 1). En la figura se muestra que la enzima cataliza el rompimiento de la celulosa en glucosa de mejor manera que las pruebas 1 y 3.

En la Tabla 2 se especifica el porcentaje de cada uno de los compuestos químicos presentes en el sustrato de fermentación después de la hidrólisis enzimática. Se observa la riqueza de los componentes celulosa, hemicelulosa y lignina. Por ser lignina una posible limitante en la hidrólisis de los contenidos de celulosa y hemicelulosa, por consiguiente reduce la producción de azúcares reductores.

Gráfico 1
°Brix/hidrólisis de la enzima Celluclast 1.5 L sobre muestras de celulosa



P1: enzima, 24 μ l; pH, 4 e incubación a 36°C.

P2: enzima, 24 μ l; pH, 5.0 e incubación a 36°C.

P3: enzima, 24 μ l; pH, 5.0, incubación a 50°C y adición de carboximetilcelulosa al 1%.

Tabla 2

Caracterización química de un sustrato de fermentación basado en residuos de mango (50% cáscara - 50% bagazo de mango)

COMPUESTO QUÍMICO	MANGO MUESTRA 50% CÁSCARA - 50% BAGAZO
% Celulosa	5.20
% Hemicelulosa	3.70
% Lignina	4.73
% Cenizas	3.38
°Brix	4.4
pH	4.08

En la Tabla 3 se observan los estados iniciales y finales de los tratamientos según las levaduras evaluadas. Tanto el pH como los °Brix se inician igual para todos los tratamientos debido a que son condiciones estándares escogidas como las mejores para el proceso. El 7.5% de sólido (tratamiento preliminar 3) fue el mejor resultado, ya que valores superiores generaron un medio muy denso, donde el burbujeo de fermentación se detiene más rápido.

En los resultados obtenidos en la Tabla 4 por el método de Van Soest, los tratamientos a tiempo 0 muestran un aumento en celulosa, hemicelulosa y lignina, en comparación con el mango muestra testigo (ver Tabla 2); esto se debe a que para la medición en el tiempo 0 no se removió el microorganismo de inoculación del sustrato de fermentación, y las levaduras aportan glucanos, los cuales son cuantificados por el método de Van Soest como fibra (celulosa), esto es debido a que la hidrólisis ácida que incluye el método

Van Soest hidroliza toda la estructura glicosídica en el material.

La levadura marca A, según los resultados reportados, muestra un comportamiento atípico, lo cual se especula que es por defecto en la preparación del medio o pérdida del volumen durante el tratamiento térmico, el cual en ocasiones se completó mínimamente con agua estéril, entre otras razones posibles como la composición de agua en el material celular comercial.

La Tabla 4 muestra cómo disminuyó el porcentaje de celulosa durante el proceso fermentativo de los diferentes tratamientos evaluados, y el desempeño de cada levadura en los tratamientos, los cuales presentan distintos rendimientos de hidrólisis de celulosa (63% levadura marca A; 67% levadura marca B; 36% levadura cepa recombinada RH 218), a pesar de ser sometidos a los mismos pretratamientos térmicos y enzimáticos, lo cual podría sugerir que las levaduras influyen en el proceso en simultáneo,

Tabla 3

Variación de los componentes químicos durante cuatro horas de fermentación de residuos de mango, utilizando tres tipos de levadura

Determinación	Levadura marca A		Levadura marca B		Levadura cepa RH 218	
	To	T4	To	T4	To	T4
% Cenizas	5.3	5.5	4,8	4,9	3,76	5,6
pH	5	4.17	5	4.1	5	4.3
°Brix	4.6	4.0	4.8	4.0	4.8	4.0

Tabla 4

Análisis de Van Soest del medio fermentado. En el tiempo 0 (inicio de la fermentación) y tiempo 4 (final de la fermentación)

	VAN SOEST								
	Levadura marca A			Levadura marca B			Levadura cepa RH 218		
	To	T4	T0-T4	To	T4	T0-T4	To	T4	T0-T4
CELULOSA	3,5	1,3	2,2	9,3	3,0	6,3	6,9	4,3	2,6
HEMI CELULOSA	2,7	2,7	0,0	6,9	1,4	5,5	4,3	2,5	1,8
LIGNINA	3,7	3	0,7	8,4	4,8	3,6	5,0	1,4	3,6

pero debería estudiarse detenidamente. Presentó un mejor desempeño el tratamiento con levadura B, la cual contribuyó de manera más eficiente al proceso.

Las levaduras comerciales (levadura A y levadura B) tienen en su composición diferentes agentes químicos y biológicos en proporciones desconocidas; por lo tanto la adición del inóculo al fermento (7.5%) no indica que para ambos casos se está adicionando el 100% de levadura pura, ya que contiene otros ingredientes en la fórmula comercial, por lo cual afectará los tratamientos en cada caso. La levadura A presenta un rendimiento de hidrólisis menor que la levadura B; adicionalmente, la primera tiene un mayor deterioro.

Por otro lado, la levadura cepa recombinada RH 218 presenta un bajo rendimiento de hidrólisis de celulosa 37%, debido a que al ser modificada genéticamente ésta mejora ciertas propiedades y otras en cambio las disminuye, como se presume en su capacidad de contribuir en los procesos de hidrólisis de celulosa, e igualmente es una levadura que requiere un período de adaptación mayor (adicionalmente estuvo almacenada a -20 °C por un largo período de tiempo antes de su uso), algo que se puede considerar inconveniente en una levadura cuyo comportamiento no conocemos aún muy bien. Su cultivo es lento en medios clásicos

Se observa que los pretratamientos interfirieron en la estructura de la hemicelulosa, es decir, favorecieron la etapa de hidrólisis del material lignocelulósico e igualmente se evidencia que las levaduras efectivamente influyen en

los procesos de hidrólisis. Sin embargo, se observa un menor rendimiento en la hidrólisis de hemicelulosa en la levadura marca A de 0,2%, lo cual refleja la poca influencia de esta levadura en los procesos de hidrólisis de hemicelulosa. La levadura B presenta el mayor rendimiento de hidrólisis de hemicelulosa con un 79%, y muestra su alta influencia en los procesos de hidrólisis y mayor rendimiento de hidrólisis en este material lignocelulósico (hemicelulosa), el cual comprende polisacáridos de bajo peso molecular (García, 1987). La levadura cepa recombinada RH 218 presenta un rendimiento de hidrólisis de 43%, lo cual indica un desempeño medio en la hidrólisis de la hemicelulosa.

Hay una disminución de lignina durante el proceso fermentativo, que presenta un rendimiento de hidrólisis de 20% donde participa la levadura marca A; 43%, en la levadura marca B y 72%, en la levadura cepa recombinada RH 218, aproximadamente, la cual presenta el mayor rendimiento de hidrólisis de lignina, mostrando con ello una mayor eficiencia en la deslignificación al considerar todo el proceso.

Los resultados de los tratamientos de HFS de las diferentes levaduras presentan una diferencia alta con respecto a la concentración de azúcares reductores (AR). En la Tabla 5, en el tratamiento con la levadura marca A se hidrolizó celulosa y en menor proporción hemicelulosa. A su vez, se observa que los azúcares reductores finales son altos, lo cual indica que en este tratamiento no se consumió la mayor parte de los azúcares que se encontraban a disposi-

Tabla 5

Contenido de AR residual en el T4 (final de la fermentación) con diferentes levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

	Levadura marca A T4	Levadura marca B T4	Levadura cepa RH 218 T4
AZÚCARES REDUCTORES RESIDUALES mg azúcar/g de materia seca	1.93	1,81	1.38

ción; en cambio, en el tratamiento con levadura marca B, donde se hidrolizaron las mayores cantidades de celulosa y hemicelulosa, se consume activamente el sustrato y deja un resultado menor en comparación con la levadura A. Finalmente, la levadura cepa recombinada RH 218, cuyo tratamiento no fue el mayor en hidrólisis de celulosa y hemicelulosa pero tampoco el menor de todos en la hidrólisis, muestra un comportamiento uniforme en relación con levaduras comerciales convencionales.

El crecimiento y reproducción de las colonias los efectúa en mayor cantidad la levadura comercial marca B, siguiéndola la levadura comercial marca A y por último la levadura cepa recombinada RH 218; por lo tanto, se espera

que el tratamiento con la levadura B, que posee mayor cantidad de colonias, consuma más sustrato que las otras levaduras evaluadas (ver Gráfico 2).

El contenido de alcohol etílico de los tratamientos fermentativos con diferentes levaduras *Saccharomyces cerevisiae* muestra que la modificación genética de la levadura cepa recombinada RH 218 influye en el contenido porcentual de alcohol etílico, lo cual destaca la importancia del microorganismo fermentativo, ya que su presencia es esencial para el proceso de fermentación sobre la base de su capacidad de fermentar pentosas además de hexosas; también se puede notar que la levadura marca B presenta un mejor contenido de alcohol frente a la levadura marca A (ver Gráfico 3).

Gráfico 2

Unidades formadoras de colonias de las diferentes levaduras *Saccharomyces cerevisiae* evaluadas para su comparación

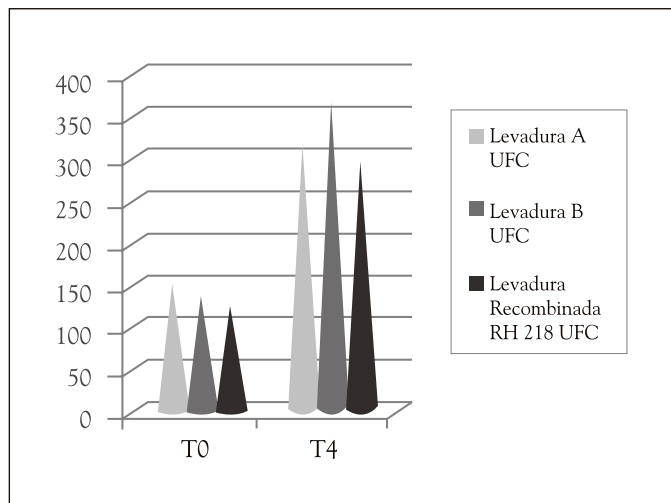
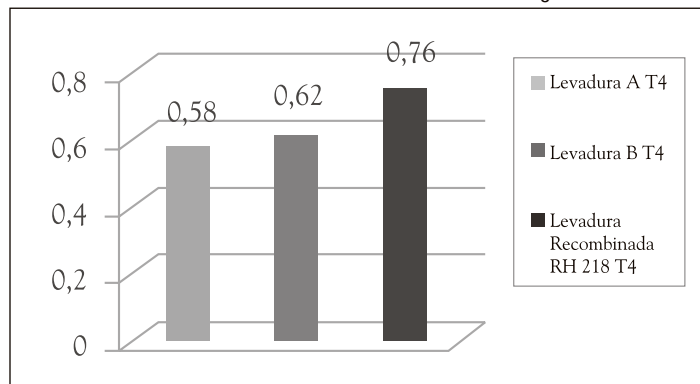


Gráfico 3

Contenido de alcohol etílico del residuo fermentado de mango común



En el Gráfico 4 se muestran los porcentajes de material lignocelulósico hidrolizado, y se puede observar que la levadura marca B presenta el mayor porcentaje de celulosa (6,3% y 5,5% hemicelulosa hidrolizada, respectivamente) con respecto al tiempo 0, lo que demuestra que la levadura contribuye de forma más significativa en el proceso. Sin embargo, en el gráfico se evidencia que la levadura marca B al final del proceso presenta un alto contenido de azúcares reductores, lo que indica que la levadura no consumió la cantidad suficiente de estos para transformarlos en alcohol.

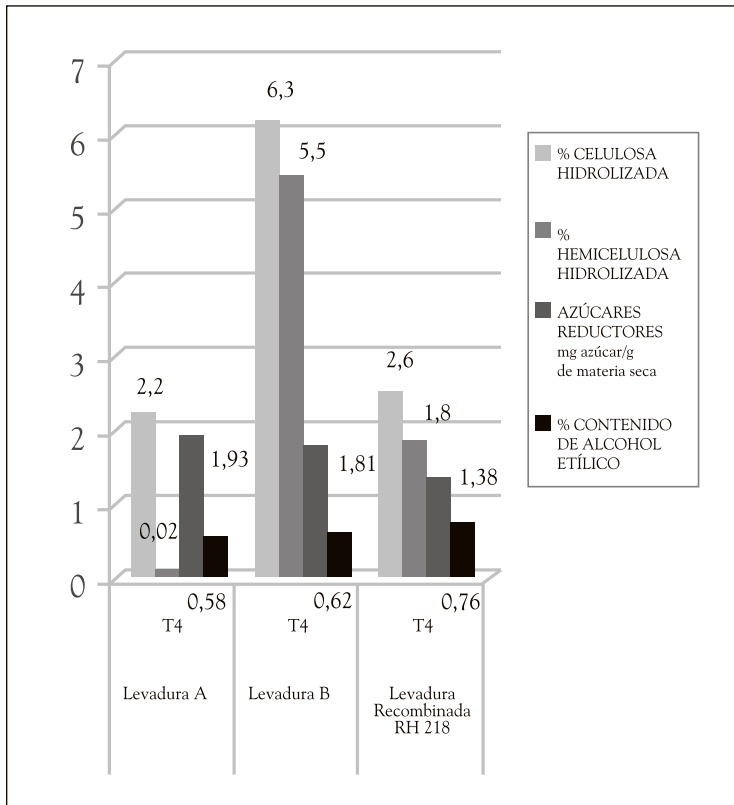
El tratamiento con levadura marca A presenta la menor cantidad de material lignocelulósico hidrolizado: sólo el 2,2% de celulosa y el 0,02% de hemicelulosa hidrolizada; además, presenta el más alto contenido de AR, lo cual muestra que esta levadura no transformó la

suficiente cantidad de AR en alcohol etílico. Ello demuestra que la levadura marca B y la levadura marca A, ambas comerciales, presentan diferentes proporciones de otros agentes, lo que las diferencia en sus procesos.

El tratamiento con levadura cepa recombinada RH 218 presenta un porcentaje de hidrólisis 2,6% de celulosa y 1,8% de hemicelulosa hidrolizada, no tan alto como el de la levadura marca B (6,2% celulosa y 5,5% hemicelulosa hidrolizada); sin embargo, su proceso es mejor que el tratamiento con la levadura marca A (2,2% celulosa y 0,02% hemicelulosa hidrolizada), lo que demuestra que a pesar de ser una levadura modificada por lo cual pierde ciertas propiedades, su comportamiento en los procesos de hidrólisis es bueno. Sin embargo, cabe anotar que la levadura cepa recombinada RH 218 arroja los mejores resultados en cuanto contenido de AR

Gráfico 4

Contenido de celulosa y hemicelulosa hidrolizados, azúcares reductores vs. contenido de alcohol etílico



y alcohol etílico y presentado un mayor aprovechamiento de los azúcares reductores (1,38% AR) y mayor porcentaje de alcohol etílico (0,76%), lo que destaca la importancia de este microorganismo en la fermentación, es decir, que tiene mejor capacidad de transformar AR en alcohol etílico, lo cual quizá se deba a su modificación genética que le permite aumentar la eficiencia en la fermentación alcohólica mediante la hidrólisis de pentosas obtenidas tras la hidrólisis de hemicelulosa.

Conclusiones

Las altas concentraciones de fibra cruda en el residuo del despulpado de mango común (*Mangifera indica* L) son fuente importante de material lignocelulósico (5.20% celulosa, 3.70% hemicelulosa y 4.73% lignina), que transformado en azúcares reductores puede ser convertido posteriormente en etanol, ácidos orgánicos y otros.

Los tejidos que componen la fibra cruda como pectina, lignina, hemicelulosa y celulosa forman una estructura celulolítica la cual es hidrolizada con la ayuda de tratamientos térmicos a 98°C por una hora y enzimáticos Celluclast 1.5 L. Para lograr los mejores efectos de estos tratamientos es importante realizar pretratamientos que favorecen la preparación de los materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol al reducir el tamaño de la partícula de la materia prima a 245 μm . De esta forma se deja a disposición el material al microorganismo encargado de la fermentación alcohólica en condiciones controladas de pH 5.0, temperatura 30°C y tiempo de 4 días.

En este estudio el tratamiento con levadura marca A presentó la menor cantidad de material lignocelulósico hidrolizado (2,2% celulosa, 0,02% de hemicelulosa) además, registró el más alto contenido de AR (1.93 mg

azúcar/g de materia seca) debido a que la levadura no transformó la cantidad suficiente de AR en alcohol etílico (contenido de alcohol etílico, 0,58%), lo que muestra poca eficiencia en el proceso fermentativo.

La levadura marca B presenta el mayor porcentaje de material lignocelulósico hidrolizado (6,3% celulosa, 5,5% hemicelulosa), lo que muestra que la levadura contribuye mayormente en el proceso de hidrólisis; sin embargo, la levadura B al final del proceso presenta un alto contenido de azúcares reductores (1,81 mg azúcar/g de materia seca), lo que indica que no consumió la cantidad suficiente de AR para transformarlos en alcohol: muestra un contenido de alcohol etílico de 0,62%.

Las levaduras A y B, siendo ambas comerciales y sometidas a bajos los mismos pretratamientos térmicos y enzimáticos, presentaron diferentes comportamientos y resultados, con lo cual se concluye que cada una contiene en su composición diferentes agentes químicos y biológicos (microorganismos) en diferentes proporciones, que se refleja durante todo el proceso fermentativo.

El tratamiento con levadura cepa recombinada RH 218 presenta un porcentaje de hidrólisis (2,6% celulosa hidrolizada; 1,8% hemicelulosa hidrolizada) no tan alto como el de la levadura marca B; sin embargo, es mejor que el tratamiento con la levadura marca A, lo que demuestra que su influencia en los procesos de hidrólisis es buena. En cuanto al contenido de AR y alcohol etílico, la levadura cepa recombinada RH 218 presenta el mayor aprovechamiento de los azúcares reductores (1,38 mg azúcar/g de materia seca) y mayor porcentaje de alcohol etílico (0,76%), lo que destaca la importancia de este microorganismo en la fermentación alcohólica mediante la hidrólisis de pentosas. También fue el microorganismo

con mayor rendimiento en la hidrólisis de lignina.

El contenido de celulosa en comparación con hemicelulosa, alcohol etílico y contenido de azúcares reductores de las muestras en el tiempo 4 analizadas, permite afirmar que los compuestos lignocelulósicos podrían ser degradados no sólo en azúcares reductores, sino también en otros compuestos, que pueden afectar o inhibir la fermentación alcohólica, situación evidenciada por Martín y col. (2002), en tratamiento de bagazo de caña de azúcar, que es un referente no particular ya que no se trata de una fruta, respecto a lo cual que no se tienen estudios respecto a material lignocelulósico sino a materiales amiláceos.



*Donde se cuenta lo
que en él se verá.*

Bibliografía

- ARIAS, B. (1995). *Tesis de Maestría*. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Valle.
- BALLESTEROS PERDICES, M. (2003). Biocombustibles líquidos. CIEMAT. España. Citado en abril de 2004. Disponible en Internet URL: <http://www.ciemat.es/proyectos/pderbiocombus.html>.
- BENÍTEZ, C.N. (2002). *Manual de laboratorio de microbiología*. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- BETANCOURT y col., (2003), Buitrago y col., (2004), López y col., (2005), UNAL (2004).
- CALVACHE, Mabel y col. (2005). Trabajo de grado: *Evaluación de la fermentación alcohólica del residuo agroindustria del mango común* (Mangifera indica L.) *Mediante tratamientos hidrolíticos previos e hidrólisis y fermentación simultánea*, UNAL Palmira.
- CARTAGENA, J.R.; VEGA, D. (1992). *Fruticultura colombiana: El mango*. ICA. Promedio. Bogotá, Colombia.
- Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México. (2002). Citado en junio de 2003. Disponible en Internet.
- Corporación para el Desarrollo Industrial de la Biotecnología Limpia Disponible en Internet.
- CUERVO, R.; Cerón, F.; Gómez, R.; García, S.; Niño, R.; Osorio, E. (1999). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. Bogotá, Colombia.
- CRUGER, W. (1993). *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*. USA.
- GARCÍA B., F.J. y PRIMO, E. (1987). *Alcohol de biomasa*. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*. pp. 304-315.
- GLAZER, A. N y NIKAIDO, H. (1998). *Microbial Biotechnology*.

- Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: Freeman and company editorials.
- ICA. (1988). Palmira, Valle del Cauca, Colombia.
 - INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. Colombia (1985).
 - INDULPULPAS LTDA. (2007). Industria Colombiana de Pulpas de Fruta.
 - LETTERME, Pascal. (2001). *Nutrición animal, notas de laboratorio*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
 - LINDEN, Guy. (1994). *Bioquímica agroindustrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola*. Acibia. Zaragoza, España: Manual de equipo, Novatech.
 - MADIGAN, T.M; MARTINKO, J. M y PARKER, J. (2000). *Biología de los microorganismos*. 8ª edición. Madrid, España: Prentice may.
 - MARTÍN MEDINA, Carlos O. (2002). *Estudio de la inhibición de la fermentación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol*. Tesis de Doctorado. Cuba: Universidad de Matanzas.
 - MEDLICOTT, Andy. (1996). *Manual de tecnología postcosecha de mango*. Armenia, Colombia: Sena, Regional. Quindío.
 - MEJÍA G., L.F.; LÓPEZ, F. (1996). *Empleo de enzimas comerciales en la obtención de jugo clarificado de Feijoa sellowiana berg*. Tesis especialización. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
 - MONROY H., VINIEGRA, G. (1990). *Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos*. AGT. México.
 - NELLAIAH, H., KARUNAKARAN, T and GUNASEKARAN, P. (1988). *J. Ferment. Technol.*
 - NOVOZYMES, Ficha técnica Celluclast, Alimentos/ 2002-21744 - 01.pdf
 - ORDÓÑEZ SANTOS, L.E. (2002). *Proyecto estudio generación de residuos vegetales en el Valle del Cauca*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
 - QUINTERO R. *Fundamentos de ingeniería bioquímica*. 179. Trillas. México.
 - SALAZAR CASTRO, R. (1991). *Cultivo de mango*. Cursos Nacionales de Frutales.
 - SALAZAR M, H. (1995). *Producción de etanol vía hidrólisis de celulosa*. I Simposio Colombiano sobre Alcohol Carburante. CIAT.
 - Simposio Internacional Sipal 07, (2007). Bio combustible, Bogotá.
 - VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.D.; LEWIS, B.A. (1991). *Methods for dietary fibre, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition*. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
 - WARD OWEN, (1989). *Biotecnología de Fermentación; Principios, Procesos y productos*. Zaragoza, España: Acriba.