

Sacarificación y fermentación simultánea de olote pretratado

Sacarificação simultâneas e fermentação de sabugo de milho pré-tratada

Patricia García Villanueva

Universidad Autónoma de Coahuila

pagavi1@hotmail.com

Yolanda Garza García

Universidad Autónoma de Coahuila

ygarza@uadec.edu.mx

Resumen

El bioetanol puede ser producido a partir de una amplia variedad de materias primas. Estas se clasifican en tres categorías de materias primas agrícolas: los azúcares simples, almidón y lignocelulosa. El olote de maíz (residuo agronómico), utilizado en este estudio, se compone de 37.85 % de celulosa, 42.3 % de hemicelulosa y 7.01 % de lignina. Después del pretratamiento alcalino (NaOH al 1 %, 120°C, 60 min), el contenido de celulosa en el residuo de olote se incrementó de 37 % a 64 % con una disminución de 30 % y 88 % de hemicelulosa y lignina respectivamente. 59g.L⁻¹ de la glucosa se obtuvo a partir de material pretratado por la sacarificación enzimática (45 °C, pH 5,5, 120 h) usando Celluclast® 1.5 L. Se evaluaron los efectos de la temperatura, el pH y la concentración de la enzima. Se buscó la condición más favorable en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con el uso de *Zymomonas mobilis*. Las condiciones óptimas fueron, 38 ° C; pH 4,7; concentración de la enzima 20 FPU.g-1. Se obtuvo un rendimiento de etanol del 90 %, basado en el valor de rendimiento teórico para una concentración de 27g.L⁻¹ a las 96 horas.

Palabras clave: bioetanol, lignocelulosa, Sacarificación y Fermentación Simultánea.

Abstract

O etanol pode ser produzido a partir de uma ampla variedade de matérias-primas. Estes são classificados em três categorias de matérias-primas agrícolas: simples, amido e açúcares lignocelulose. sabugo de milho (agronomicamente resíduo), utilizada neste estudo, 37,85% consiste de celulose, hemicelulose e 42,3% 7,01% de lignina. Após o pré-tratamento alcalino (NaOH a 1%, 120 ° C, 60 min), o teor de celulose no resíduo olote aumentou de 37% para 64% com uma diminuição de 30% e 88% de hemicelulose e lenhina, respectivamente. 59g.L-1 de glicose foi obtido a partir de material pré-tratado por sacarificação enzimática (45 ° C, pH 5,5, 120 h) utilizando Celluclast® 1,5 L. Os efeitos da temperatura foram avaliadas, e o pH concentração de enzima. a condição mais favorável procurado no processo de sacarificação simultâneas e fermentação (SFS) com a utilização de *Zymomonas mobilis*. As condições ótimas foram, 38 ° C; pH 4,7; concentração de enzima 20 FPU.g-1. Obteve-se um rendimento de 90% de etanol, com base no valor de rendimento teórico para uma concentração de 27g.L-1 a 96 horas.

Palavras-chave: bioetanol, sacarificação simultânea lignocelulose e fermentação.

Fecha Recepción: Febrero 2016

Fecha Aceptación: Abril 2016

Introdução

Muitos benefícios potenciais mostra a produção de etanol a partir da fermentação de biomassa lignocelulósica de subprodutos agrícolas e resíduos florestais (segunda geração de bioetanol), em comparação com amido (primeira geração de bioetanol) derivado ou sacarose tanto energeticamente e ambientalmente (Farrell et al, 2006;. Olofsson, 2008). Além disso, este fornece uma matéria-prima muito biomassa para alta disponibilidade, como mencionado Gnansounou et al. (2005). hidrólise enzimática de lenhocelulose sem pré-tratamento normalmente não é tão eficaz devido à elevada estabilidade dos materiais a enzima ataques como indicado Taherzadeh et ai. (2008). O objectivo principal destes pré-tratamentos é a de solubilizar a fracção de lenhina e modificar a estrutura das cadeias de celulose, de modo que eles são facilmente atacados por

enzimas. Para um pré-tratamento é eficiente, ele deve atender, entre outras características, baixo consumo de energia, baixo custo de investimento e manutenção, uso de reagentes baratos e prontamente recuperáveis, além da possibilidade de aplicação em vários substratos (Almenares et al., 2008) .

Z. mobilis, uma bactéria Gram-negativas, bactérias anaeróbias facultativas podem fermentar a glicose em etanol e CO₂ através do Entner-Doudoroff, que gera mais etanol devido à menor produção de biomassa bacteriana em comparação com o Embden -Meyerhof em *S. cerevisiae* (Bai et al., 2008). Além disso, *Z. mobilis* pode tolerar concentrações muito mais elevadas do que outras bactérias etanol e produto de biomassa é geralmente reconhecido como seguro (Geralmente Reconhecido como Seguro, GRAS) pelo FDA (Food and Drug Administration) para o alimento animal, de modo que este tipo é adequado para a fermentação das pentoses metabólica capacidade de engenharia, também relatado por Zhao et al. (2012).

Uma opção atraente para a bioconversão de materiais pré-tratada é o processo de sacarificação simultâneas e fermentação (SFS), em que as enzimas hidrolíticas e microrganismos fermentativos estão no mesmo reactor, reduzindo os custos de investimento (Olofsson et ai., 2008). Além disso, o processo SSF tem limitações, tais como a temperatura óptima diferentes enzimas hidrolíticas e microorganismos da fermentação. Muitos relatórios têm indicado que a temperatura óptima para hidrólise enzimática é de 40-50 ° C, enquanto que os microrganismos com boa produtividade e rendimento de etanol geralmente não toleram esta temperatura elevada (Karimi et al., 2006).

Este trabalho enfoca o uso de sabugo de milho como matéria-prima para a produção de etanol em um processo SSF por hidrólise com celulase (Celluclast® 1,5 L) e fermentação com *Z. mobilis*. factores temperatura, pH e concentração de enzima, a fim de encontrar as mais favoráveis para a hidrólise e bactérias bom rendimento de etanol foram avaliados condição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima sabugo

A espiga foi fornecido pelo Departamento de Melhoramento de Plantas da Universidade Autónoma Agrária Antonio Narro, Saltillo, México. O resíduo foi triturado para o tamanho de 1 mm e seco a 65 ° C durante 24 h, foi hermeticamente armazenadas em recipientes de vidro à temperatura ambiente.

Pré-tratamento alcalino

A espiga resíduo foi pré-tratada com NaOH a 1% a 121 ° C / 15 psi durante 60 min. 100 ml de uma amostra de 10 g foi adicionado. Após pré-tratamento o resíduo foi filtrado sob vácuo, o resíduo foi neutralizado até pH 7 com água destilada, secou-se a 65 ° C durante 24 h, e armazenada para utilização como um substrato no processo SSF.

Inóculo

Z. mobilis foi cultivada em meio líquido WL, compreendendo (g/L-1): extracto de levedura a 4,0, 5,0 triptona e glucose 50,0, fosfato monopotássico 0,55, cloreto de potássio 0,425, 0,125 cloreto de cálcio, de magnésio 0,125 sulfato, cloreto férrico 0,0025 0,0025 sulfato de manganês e. A cepa foi fornecido pelo Departamento de Biotecnologia da Universidade de Coahuila (Saltillo, México). 100 ml de meio foram adicionados a 250 ml de frascos e inoculados com *Z. mobilis*. Os frascos foram incubados a 37 ° C durante 24 horas.

Enzima

Complexo de compras de celulose, Celluclast®1.5L, (EC 3.2.1.4, celulasas *Trichoderma reesei* ATCC 26921; Novozymes, Dinamarca) foi usada nos experimentos. A actividade celulolítica do complexo foi de 71 UFP / ml.

Hidrólise enzimática

A hidrólise foi levada a cabo em frascos de 250 ml a 45 ° C, com uma concentração de 15 celulose FPU / (g de substrato) de Celluclast® 1,5 L, velocidade de agitação de 130 rpm, pH 5,5 e concentração de substrato foi de 10% (w / v) durante 120 h. As amostras foram colhidas às 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 120 h, a mistura de reacção durante a incubação, e fervida durante 10 minutos para terminar a reacção da enzima foram armazenadas a -20 ° C durante quantificação de glucose.

Sacarificação simultânea e fermentação (SFS)

O processo de fermentação foi conduzida sob as seguintes condições, a espiga de pré-tratado foi adicionado ao meio de WL, esterilizado em autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, sob condições estéreis e o complexo enzima inoculo *Zymomonas mobilis* adicionado a concentração 10% (v / v), que foi agitada a 130 rpm. Amostras de 1 ml em 120 h foram tomadas e centrifugado a 12000 rpm durante 10 min. A concentração de etanol e os restantes monossugars foram determinados tal como descrito abaixo. PH, temperatura e concentração de enzima variáveis foram testados de acordo com o desenho experimental.

Método analítico

O conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina espiga foram determinados pela Van Soest (1963) método. O teor de glucose foi quantificada por HPLC (Agilent series 1200 tecnologia quaternário). Todas as amostras foram filtradas através de um filtro descartável de 0,45 mm, antes de equipamento de injeção. As amostras foram analisadas numa coluna Rezex RCM-marca de Phenomenex monossacárido. A temperatura era de 80 ° C e Millipore água foi utilizada como fase móvel, a um caudal de 0,6 ml / min. O etanol foi analisada por cromatografia em fase gasosa (GC Agilent 7820 Sistema A), que tem detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável (3,0 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno).

Microscopia eletrônica de varredura (SEM) análise de resíduos olote

A morfologia da superfície e características do cob alcalino-tratados e não tratados foi estudada usando um microscópio eletrônico de varredura (Philips XL30ESEM).

Delineamento estatístico de experimentos

Este trabalho estudou principalmente os efeitos da temperatura de reação, concentração de enzima e pH na SFS por um design fatorial completo. Os factores e os seus níveis são apresentados na Tabela I.

Tabla I

Fatores e níveis de design fatorial completo 3³

Nivel	Temperatura/°C	Concentración de enzima FPU.g ⁻¹	pH
1	37	10	4.5
2	41	15	5.5
3	45	20	6.5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO OLOTE E EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁLCALI

A composição química da amostra de carolo de milho tratados e não tratados mostrado na Tabela II. Os resultados sugerem que o pré-tratamento alcalino sob o conjunto de condições foi capaz de remover parcialmente certas fracções da composição do sabugo, produzir um material de celulose enriquecidos, reduzir o teor de lignina até 88%, com uma recuperação de celulose praticamente completa, confirmando a eficácia do pré-tratamento para remover lignina e, conseqüentemente, torná-lo mais fácil de hidrólise enzimática, concordando com citadas por diferentes autores como Mesa et al. (2010), Chen et al. (2008), Kumar et al. (2009) y Taherzadeh et al. (2008).

Tabla II

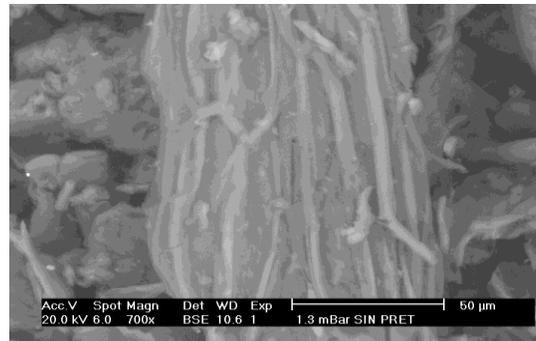
Olote química antes e depois do pré-tratamento e desempenho do produto após pré-tratamento (peso seco%)

Componentes	Sin tratar	Pretratado	Rendimiento del producto ^b
Celulosa	37.85	64.20	98.8
Hemicelulosa	42.30	29.55	46.95
Lignina	7.01	0.824	7.84
Otros ^a	12.84	5.426	28.34

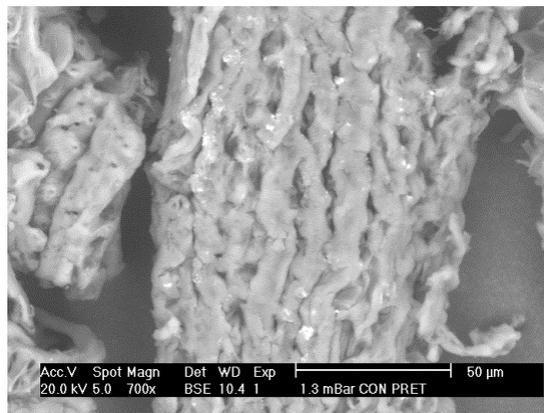
^a Otros componentes incluyen, cinzas, e extractos de proteínas. ^b Porcentagem de cada fração recuperada após pré-tratamento.

Efeito do pré-tratamento sobre a superfície da estrutura de carolo de milho

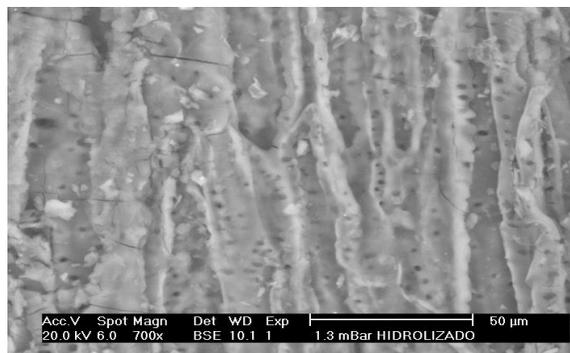
A estrutura da superfície, sem pré-tratamento olote foi limpo, liso, inteira (completa, intacta), é firme, regular e homogênea (Figura 1a). Por outro lado, a superfície do sabugo de milho pré-tratado com NaOH exibido, aberto, irregular (variável), triturado e continha algumas microporos (Figura 1b), isto pode ser devido à remoção parcial da lignina e hemicelulose, tornando viável ataque enzimático. A superfície pré-tratada amostra hidrolisada enzimaticamente é percebido rachada e os poros abertos (Figura 1c) mais expostos e, resultados semelhantes aos relatados em trabalhar com resíduos de trigo Han et al. (2012).



(a)



(b)



(c)

Fig.1 SEM de (a) não tratado de milho, (b) de carolo de milho pré-tratamento alcalino, (c) o pré-tratamento alcalino olote, seguido por hidrólise enzimática.

Hidrólise enzimática de sabugo de milho pré-tratada

Tabela III teor de açúcares obtidos durante a hidrólise enzimática é mostrado, a eficiência do mesmo corresponde a cerca de 80%. Uma vez que é difícil saber a eficiência de sacarificação durante SFS (sendo simultânea) esta quantidade foi usada para calcular o rendimento de etanol. Olofsson et ai. (2012) relataram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho em açúcares palha de milho, então podemos considerar a espiga como um resíduo adequado para a conversão de açúcares em produção de etanol.

Tabla III

Resultados teor de açúcar durante a hidrólise enzimática (g.L⁻¹)

	Contenido de Glucosa	Contenido de Arabinosa	Contenido de Xilosa	Contenido de Manosa
Olote pretratado	59.04	4.74	21.28	N.D*

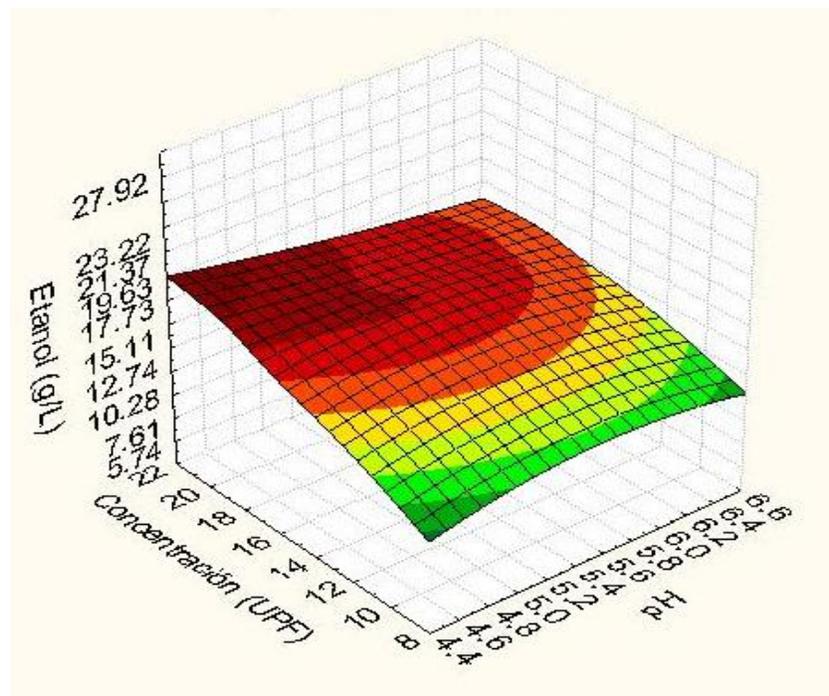
N.D.* Bajo las condiciones del análisis no fue posible detectar >10ppm

Efeito das condições de operação do processo de fermentação e sacarificação simultâneas com carolo de milho pré-tratado com alcali

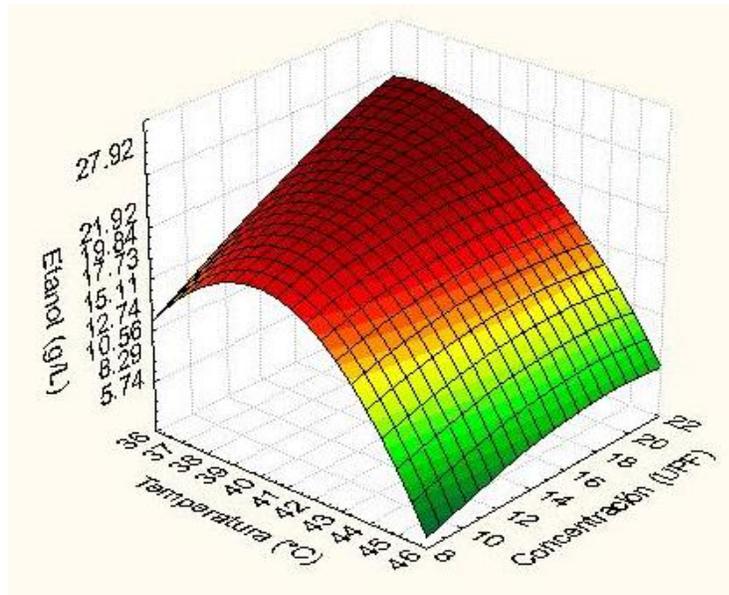
Para encontrar o efeito do pH na concentração de etanol (Figura 2a), foram utilizados os valores de 4,5, 5,5 e 6,5 nos meios de fermentação. A diferença na concentração de etanol com um factor de pH não foi estatisticamente significativa ($P > 0,5$), indicando que o pH no processo não tem efeito significativo sobre a produção de etanol, no entanto, para a obtenção de valores óptimos em si foi considerada. A condição mais importante com um factor de pH é a estabilidade da

membrana citoplasmática de bacterias na enzima é manter os laços dentro da molécula para evitar variações na disposição da enzima e realizar a formação do complexo enzima / substrato e evitar a desnaturação como aludem Madigan et ai. (2004), e Hans et ai. (1997), de modo que pode ser assumido que não existe um envolvimento para a produção de etanol neste processo para este estudo nesta gama de pH.

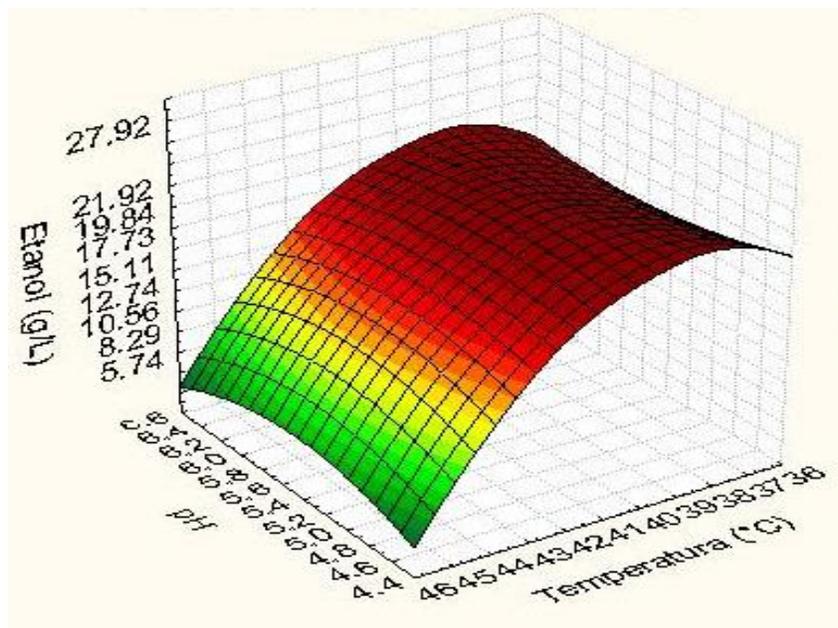
Os níveis de temperatura testadas neste experimento foram 37, 41 e 45 ° C. Na temperatura da concentração e da temperatura do pH (figuras 2b e 2c), a interacção é conseguida ver uma influência acentuada da temperatura uma vez que o aumento reduz drasticamente a produção de etanol por 60%, isto é devido ao aumento da temperatura reacção provoca um decréscimo na sobrevivência de bacterias, levando a que algumas bacterias para desactivação tendência que corresponde também designado por Luo et al. (2008).



(a)



(b)



(c)

Figura 2 .Gráficas de superficie de resposta (a) mostra o efeito da interacção de pH concentração de enzima na concentração de etanol (b) Efeito da concentração de enzima concentração de etanol à temperatura (C) e o efeito de pH -Temperatura na concentração de etanol de milho pré-tratada alcalino.

Cargas enzima testada neste processo foram de 10, 15 e 20 UPF encontrar uma influência marcante desta variável. O aumento da concentração foi diretamente proporcional à concentração de etanol, atingindo até 27 g / L com uma carga de 20 UPF. Os resultados do delineamento experimental indicam que as condições óptimas para SPS são 38 ° C, a enzima carregamento 20UPF g / substrato e a pH 4,7, obtendo-se uma concentração máxima de 27 g / L de etanol, o que equivale a um rendimento de 90% . Este valor foi calculado como uma percentagem com base no rendimento teórico máximo é de etanol 0,51 g de etanol por grama de glicose. Os resultados das condições óptimas foram testadas a fim de tentar reduzir o tempo de processamento, o que deu resultados positivos através da redução do tempo de 120 h até 96 h, sendo esta viável em termos de custos e produtividade do processo.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o pré-tratamento favorecido disponibilidade celulose alcalina na espiga, que aumentou em 64,2%, fazendo com que o resíduo olote favorável para alternativa de produção de etanol. As condições de operação óptimas SFS foram pré-tratados espiga 38 ° C, pH 4,7 e 20 FPU.g-1 enzima de carga, o tempo de processamento foi reduzida para 120 h 96 h sob estas condições.

Obtiveram-se 27g.L-1 de etanol, a percentagem do rendimento máximo teórico era elevada, o que faz com que as bactérias *Zymomonas mobilis* uma possível neste processo.

Bibliografía

- Bai F.W, Anderson W.A, Moo-Young M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv*, 26, 89–105.
- Chen H, Han Y, Xu J. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*, 43, 1462-1466.
- Farrell A.E, Plevin R.J, Turner B.T, Jones AD, O'Hare M, Kammen D.M. (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 311, 506–508.
- Gnansounou E, Bedniaguine D, Dauriat A. (2005). Promoting bioethanol production through clean development mechanism: findings and lessons learnt from ASIATIC project. In: *Proceedings of the 7th IAEE European energy conference*, Norway.
- Han L, Feng J, Zhang S, Ma Z, Wang Y, Zhang X. (2012). Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Braz J Microbiol*, 43, 53-61.
- Hans G. Scheleng (1997). *Microbiología general* (386-388). Barcelona: Omega S.A.
- Almenares V.J.F., Serrat D.M. (2008). Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de biomasa lignocelulósica. *Tecnología Química*, 28, 3.
- Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh M.J, Karimi K. (2006). Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 40, 138-144.
- Kumar P, Barrett D.M, Delwiche M.J, Stroeve P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res*, 48, 3713-3729.
- Luo P, Liu Z, Yang C, Wang G. (2008). Study of simultaneous saccharification and fermentation for steam exploded wheat straw to ethanol. *Front Chem Eng China*, 2, 4, 447-451.
- Madigan M.T, Martinko J.M, Parker J. (2004). *Brock, Biología de los microorganismos*: Pearson Education, 155-158.
- Mesa L, González E, Cara C, Ruiz E, Castro E, Mussatto S.I. (2010). An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. *J Chem Technol Biotechnol*, 85, 1092-1098.

- Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*, 1, 7.
- Taherzadeh M.J, Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int J Mol Sci*, 9, 1621-1651.
- Van Soest P.J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J Assoc Anal Chem*, 46, 829-835.
- Zhao X, Zi L, Bai F, Lin H, Hao X, Yue G, Ho N.W.Y. (2012). Bioethanol from lignocellulosic biomass, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 128, 25-51.