

# Evaluación de Cepas Fermentativas en la Hidrólisis y Fermentación Simultáneas (SSF) de Cascarilla de Arroz para la Producción de Bioetanol

**Resumen:** La disminución en las reservas de petróleo a nivel mundial y los problemas medioambientales ocasionados por su utilización, propician la búsqueda de nuevas alternativas renovables y menos contaminantes.

En este trabajo se estudió el comportamiento de enzimas celulasas y celobiosas, junto con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyri*, *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii* en el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) conducido a 35°C para la producción de bioetanol, a partir de los carbohidratos presentes en cascarilla de arroz. Este proceso busca hidrolizar la celulosa y aprovechar de inmediato los azúcares fermentables, atravesando la dificultad de la diferencia entre la temperatura óptima para el desempeño de enzimas (50°C) y la de levaduras (25°C a 35°C). La cascarilla fue pretratada con una secuencia ácido-alcalina para la separación de los carbohidratos.

Los mayores % de bioetanol se obtuvieron con *Saccharomyces cerevisiae* (68%) y *Candida kefyri* (75%).

**Palabras Claves:** Bioetanol; cascarilla de arroz; Hidrólisis y fermentación simultáneas; Enzimas-

**Abstract:** The decrease in oil reserves worldwide and environmental problems caused by its use, lead to finding new renewable and less polluting alternatives.

This work presents the study of the behavior of both celobiosas and cellulase enzymes, together with strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyri*, *Candida tropicalis* and *Candida guilliermondii*, specifically in the process of simultaneous hydrolysis and fermentation (SSF) conducted at 35 °C to produce bioethanol from the carbohydrates of rice husks.

This process seeks hydrolyze the cellulose and immediately utilize of fermentable sugars, overcoming the difficulty of the difference between the optimum temperature for the performance of enzyme (50°C) and yeast (25°C to 35°C). Rice husk was pretreated with an acid-alkaline sequence to achieve the separation of carbohydrates.

The best yields to bioethanol were obtained with *Saccharomyces cerevisiae* (68%) and *Candida kefyri* (75%).

**Keywords:** Bioethanol; Rice husk; Simultaneous Sacharification and Fermentation (SSF); Enzymes.

Ana M. Arismendy<sup>(1,2)</sup>, Mariano J. Sequeira<sup>(1)</sup>, Fernando E. Felissia<sup>(3)</sup>, María C. Area<sup>(1,3)</sup>, Ester R. Chamorro<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica, Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica (UTN-CONICET), French 414, Resistencia, Argentina.

<sup>(2)</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, (CONICET), Av. Rivadavia 1917, Capital Federal, Argentina.

<sup>(3)</sup>Programa de Celulosa y Papel, Instituto de Materiales de Misiones, IMAM (UNAM-CONICET), Félix de Azara 1552, Misiones, Argentina.

Mail: anaarismendy25@gmail.com

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La disminución en las reservas mundiales de petróleo hace evidente la necesidad de diversificar la matriz energética, siendo una de las alternativas más exploradas el uso de biocombustibles. Los residuos lignocelulósicos son una fuente de materia prima muy abundante de celulosa para la obtención de bioetanol. Entre ellos la cascarilla de arroz, residuo de la industria arroceras, constituye una fuente de carbohidratos con mucho potencial para la producción de bioetanol una vez que es convenientemente pretratada (Dagnino et al. (2013)).

El proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos consiste básicamente en las etapas de pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y separación (Baherjee et al. (2009); Binod et al. (2009); Cotana et al. (2010); Saha y Cotta (2007)). El pretratamiento puede llevarse a cabo por diferentes métodos dependiendo del tipo de material a tratar. Luego, la hidrólisis enzimática de la celulosa para la producción de glucosa se lleva a cabo utilizando enzimas, catalizadores altamente específicos. La hidrólisis se realiza bajo condiciones suaves (generalmente a pH 4,5-5,0 y temperaturas entre 40°C y 50°C) y presenta ventajas frente a la hidrólisis química, entre las cuales pueden mencionarse que no genera corrosión, el consumo de enzima es bajo y los hidrolizados son de baja toxicidad (Taherzadeh y Karimi (2007)). Seguido a este paso, se realiza una fermentación cuyo desarrollo óptimo se suele dar entre los 25°C y 35°C dependiendo de las cepas fermentativas empleadas.

Una de las dificultades más grandes en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos es el pretratamiento de los materiales para mejorar la disponibilidad de la celulosa presente en ellos (Dagnino et al. (2014)). Otros inconvenientes son la generación de productos de inhibición, como es el caso de la celobiosa para la hidrólisis y de etanol para la fermentación,

aunque ellas se realicen bajo condiciones óptimas de temperatura tanto para las enzimas, como para los microorganismos, además de la susceptibilidad del hidrolizado a la contaminación (Area y Vallejos, (2012)).

El proceso de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) combina la hidrólisis con la fermentación en un único reactor, posee ventajas en comparación con el proceso de hidrólisis y fermentación sucesivas, dado que los azúcares producidos durante la hidrólisis son consumidos de inmediato por las levaduras, evitando los problemas de acumulación de azúcares y contaminación bacteriana (Area y Vallejos, (2012)); otras ventajas son la disminución de costos, producida al utilizar un solo fermentador en el proceso y la disminución de tiempo de procesamiento y volumen del reactor (Balat (2011)).

Para la producción de bioetanol, la cepa fermentativa más común es la *Saccharomyces cerevisiae*, pero también se han utilizado cepas de la familia de las *Candida* (Cheng et al. (2009); Guo et al. (2013); Liaw et al. (2008); Ling et al (2011); Rao et al. (2006)). Diversos autores enfocan su atención en la determinación de la máxima temperatura donde existe actividad fermentativa (Wei-Hao et al. (2016)), reportándose temperaturas máximas de trabajo a 40°C.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el desempeño de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida kefir*, *tropicalis* y *guilliermondii* en la hidrólisis y fermentación simultánea de cascarilla de arroz pretratada por una secuencia ácido-alcalina.

## METODOLOGÍA

### Materias Primas e Insumos

La cascarilla de arroz, de la variedad epagri, fue provista por productores locales (Chaco, Argentina).

La cascarilla se sometió inicialmente a un tratamiento mecánico, pasándola por un molinillo para disminuir el tamaño a partículas a menor de 10mm.

Se utilizaron enzimas comerciales provistas por Sigma-Aldrich, celulasas de *Trichoderma reesei* y celobiasas de *Aspergillus niger*. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyi*, *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii* fueron donadas por el cepario de hongos y levaduras del Hospital Malbrán, situado en la ciudad de Buenos Aires, Argentina.

### **Caracterización de Materias Primas y Productos de Reacción**

Las muestras del material pretratado con una secuencia ácido-alcalina se tomaron y prepararon la técnica NREL/TP-510-42620 "Preparación de muestras para análisis de composición", (Hammes et al. (2005)). El contenido de sólidos totales y humedad fue evaluado según NREL/TP-510-42621 (Sluiter et al. (2008)), utilizando el método de horno a convección. La determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa se llevó a cabo según el procedimiento NREL/TP-510-42618 (Sluiter et al. (2008)).

La cuantificación de bioetanol y azúcares producidos en los procesos se realizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (Waters HPLC System), con una columna Aminex-HPX87H (BIO-RAD) con las siguientes condiciones cromatográficas:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4 mM como eluyente, 0,6mL/min, 35°C y detectores de índice de refracción y arreglo de diodos.

Las enzimas fueron caracterizadas mediante la determinación de su actividad enzimática (Unidades de Papel de Filtro) siguiendo el procedimiento detallado por IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), (Ghose (1987)). La enzima se

agregó en proporción de 10:1, es decir se agrega una cantidad diez veces mayor de celulosa que de celobiasa, ya que la celobiasa se agrega en exceso, para evitar la inhibición de la enzima.

Para verificar el tipo de las levaduras utilizadas se realizaron repiques en medio Chromagar, el cual genera un viraje de color específico para cada tipo de levadura.

### **Tratamientos**

La cascarilla de arroz fue pretratada con solución de ácido sulfúrico diluido según la metodología especificada en trabajos anteriores (Dagnino et al. (2013)) y luego con hidróxido de sodio y antraquinona.

El procedimiento alcalino se realizó con una solución de hidróxido de sodio al 10% en base seca de sólido, catalizado con antraquinona 0,1%, manteniendo una proporción de 10% sólido-licor. La mezcla sólido-licor fue colocada en un reactor construido en acero inoxidable AISI 316 de 180 mL. El mismo fue calentado en un baño de silicona termorresistente hasta una temperatura de 160°C. El tiempo de reacción fue de 60 minutos y alrededor de 25 minutos fueron necesarios para alcanzar la temperatura de operación. Finalizada la reacción, el reactor se colocó en agua fría y se separó la mezcla por filtración. El material sólido fue lavado con agua destilada repetidas veces hasta la eliminación completa del licor.

### **Hidrólisis y Fermentación Simultánea**

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyi*, *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii* fueron transferidas a un medio líquido compuesto por peptona de carne, extracto de levadura, dextrosa,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$  todos en una concentra-

ción de 10 g/L donde fueron cultivadas por 24h a 27°C

Después de transcurridas las 24 horas, el inóculo se transfirió al restante medio de cultivo que compone el proceso simultáneo, el cual se encuentra conformado por 40 mL de buffer ácido cítrico, 48 mL de agua destilada, junto con 533 microlitros de celulasas, 53 microlitros de celobiasas, tween 80 en una concentración de 0,1 g/L, azida de sodio como antibiótico para prevenir la contaminación bacteriana y la cascarilla de arroz pretratada previamente con ácido-álcali (2,65 g).

Seguidamente los erlenmeyers de 250 mL que contenían un volumen de trabajo de 100 mL, se colocaron en un baño termostático a 35°C, en agitación de vaivén, durante 10 días. Se realizó un ensayo por cada levadura y un blanco que contenía solo cascarilla de arroz, con enzimas, tween 80 y azida de sodio. Transcurridos 4 días se tomó una muestra de cada ensayo para realizar un seguimiento del proceso antes de los 10 días y observar el funcionamiento de la hidrólisis y la fermentación.

Para calcular el % de rendimiento a etanol, se cuantificaron por HPLC los gramos de etanol producidos (g de etanol medidos) y se utilizó el valor de la glucosa teórica obtenida de la caracterización de la cascarilla de arroz para calcular los gramos teóricos de alcohol (gramos de etanol teóricos),

$$\% \text{ Rendimiento a etanol} = \frac{\text{g de etanol medidos}}{\text{g de etanol teóricos}} * 100 \quad (1)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de la cascarilla de arroz pretratada con la secuencia ácido-álcalina (22% de sólidos, 78% de humedad) fue: 69% de celulosa, 7,05% de lignina y 23% de inorgánicos.

La actividad enzimática de las enzimas celulasas resultó 75 FPU/mL. La caracterización de las levaduras

en medio Chromagar, arrojó los siguientes resultados: Colonias de color azul para *Candida tropicalis*, colonias rosadas para *Saccharomyces cerevisiae* y colonias de color crema para *Candida guilliermondii* y *Candida kefir* (Odds y Bernaerts (1994)).

En la Tabla 1 se puede observar la cantidad de glucosa y etanol medidas, y los rendimientos de etanol calculados. Los mejores resultados se obtuvieron para *Candida kefir* (75,98%), siendo comparables con los resultados obtenidos por Ballesteros et al. (2003) con un rendimiento de etanol de 71,2% para biomasa de álamo, 62,5% con Eucaliptus y 60,9% con bagazo de sorgo dulce pretratados con explosión de vapor, en un proceso simultáneo, con 15 FPU/g sustrato, utilizando a *Candida kefir* a 42°C. En cuanto a la SSF con *Saccharomyces cerevisiae*, se alcanzó un rendimiento de 68,24% de etanol, algo inferior al obtenido con *C. kefir*; lo que se puede explicar ya que esta última es termotolerante.

En cuanto a *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*, levaduras más específicas para azúcares de 5 carbono que se encuentran aquí en muy baja proporción, la producción fue muy baja (2,10% y 7,79% respectivamente).

Muestra	Glucosa medida g/100 mL	Etanol medido g/100 mL	Sólidos muestra g	Glucosa teórica g	Etanol teórico g	Rendimiento %
Blanco	0,280	0,000	0,583	0,446	0,00	0,00
<i>Candida guilliermondii</i>	0,270	0,005	0,583	0,446	0,228	2,10
<i>Candida tropicalis</i>	0,250	0,017	0,589	0,452	0,231	7,79
<i>Candida kefir</i>	0,020	0,175	0,587	0,450	0,230	75,98
<i>Saccharomyces</i>	0,000	0,148	0,583	0,446	0,228	64,74

Tabla 1. Cantidad de glucosa medida y glucosa teórica para calcular el rendimiento a etanol (%) después de 10 días.

En la Tabla 2 se observa el rendimiento a etanol obtenido durante los primeros 4 días de realizar la SSF.

Como se puede observar en los resultados (Tabla 2), las *Candida* durante los primeros 4 días de proceso

simultáneo, generaron la misma cantidad de etanol en comparación con el correspondiente a los 10 días de proceso, ya que posiblemente la mayoría de las células se encontraba en fase de lisis celular, mientras que la cantidad de azúcares aumentó, evidenciando un muy buen funcionamiento de las enzimas. Cabe mencionar además que en ambas SSF la producción de azúcares fue algo mayor que en el blanco, como consecuencia de que las levaduras consumieron parte de los azúcares, disminuyendo la inhibición de las enzimas.

En cuanto a *Saccharomyces*, a los 4 días se cuantificó más etanol que a los 10 días, probablemente porque se volatilizó una pequeña parte del mismo.

En el caso de la *Candida kefir*, el aumento de etanol de los 4 a los 10 días del proceso fue de 0,8 g, es decir que esta levadura, en comparación a las anteriores, fermentó durante casi la totalidad de los 10 días, por lo que se puede deducir que existía aún una cantidad representativa de células vivas.

Muestra	Glucosa medido g/100 mL	Etanol medido g/100 mL	Sólidos muestra g	Glucosa teórica g	Etanol teórico g	Rendimiento %
Blanco	0,255	0,000	0,583	0,446	0,000	0,000
<i>Candida guilliermondii</i>	0,214	0,005	0,583	0,446	0,228	2,09
<i>Candida tropicalis</i>	0,000	0,018	0,589	0,452	0,231	7,79
<i>Candida kefir</i>	0,000	0,156	0,587	0,450	0,230	67,73
<i>Saccharomyces</i>	0,000	0,148	0,583	0,446	0,228	68,24

Tabla 2. Cantidad de glucosa medida y glucosa teórica para calcular rendimiento a etanol (%) después de 4 días

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos para la hidrólisis y fermentación simultánea de cascarilla de arroz pretratada, permiten concluir que la mayor producción por parte de las levaduras se originó en los primeros 4 días de proceso.

El blanco de la cascarilla, con las enzimas pero sin levaduras, permitió observar cómo funcionaba el proceso de hidrólisis, y comparar con la producción de azúcares en el proceso simultáneo.

Se observó que las levaduras que mejor funcionaron con respecto a la cantidad de etanol producido a los 35°C fueron *Candida kefir* y *Saccharomyces*, especialmente la primera, que demostró soportar temperaturas cercanas a 40°C.

En el caso de las *Candidas* quedó glucosa disponible, es decir que hubo baja producción de etanol, mientras que las enzimas continuaron su proceso de hidrólisis.

En función de lo expuesto se puede concluir que el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea a 35°C, es factible utilizando las levaduras *Candida kefir* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca doctoral en Argentina de la Ing. Ana María Arismendy, a la arrocera Meichtry por la materia prima y a la UTN (Universidad Tecnológica Nacional) y a la UNaM (Universidad Nacional de Misiones) por los fondos.

## REFERENCIAS

- Area, M.C., Vallejos, M. E. (2012). *Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor. Saarbrücken. Editorial Académica Española.*
- Balat, M. (2011). *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management, 52, 858-875.*
- Banerjee, S., Sen, R., Pandey, R., Chakrabarti, T., Satpute, D., Giri, B., Mudliar, S. (2009). *Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. Biomass and Bioenergy, 33, 12, 1680-1686.*
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J, Manzanares, P, Ballesteros, I. (2004). *Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875. Process Biochemistry, 39, 1843-1848.*
- Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.; Pandey, A. (2010). *Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresource Technology, 101, 13, 4767-4774.*
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Nicolini, A., Coccia, V. y Petrozzia, A. (2014). *Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips. Energy Procedia, 45, 42-51.*
- Cheng, K.K., Zhang, J.A., Ling, H.Z., Ping, W.X., Huang, W., Ge, J.P., Xu, J.M. (2009). *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy. China: Springer.*
- Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Felissia, F.E., Area, M.C. (2014). *Obtención de bioetanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo avances en energías renovables y medio ambiente. Avances en energías renovables y medio ambiente, 18, 01-07.*
- Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Felissia, F.E., Area, M.C. (2013). *Optimization of the pretreatment of Prosopis nigra sawdust for the production of fermentable sugars. Bioresource Technology, 8, 499-514.*

- Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Felissia, F.E., Area, M.C. (2013). Optimization of the acid pretreatment step of rice hulls for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 42, 363-368.
- Gadde, B., Bonnet, S., Menke, C., Garivait, S. (2009). Air pollutant emissions from rice straw open field burning in India, Thailand and the Philippines. *Environmental Pollution*, 157, 1554-1558
- Guo, X., Zhang, R., Li, Z., Dai, D., Li, C., Zhou, X. (2013). A novel pathway construction in *Candida tropicalis* for direct xylitol conversion from corncob xylan. *Biore-source Technology*. 128, 547-552.
- Ghose, T. K. (1987). *Measurement of Cellulase Activities*. International Union of Pure and Applied Chemistry. Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi.
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J. Y., Templeton, D. (2005). Preparation of Samples for compositional Analysis. *Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42620*.
- Liaw, W.C., Chen, C.S., Chang, W.S., Chen, K.P. (2008). Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolyzate by polyacrylic hydrogel thin films with immobilized *Candida subtropicalis* WF79. *J. Bioscience and Bioengineering*, 105, 97-105.
- Ling, H., Cheng, K., Ge, J., Ping, W. (2011). Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolyzate by *Candida tropicalis* HDY-02. *New Biotechnology*, 28, 673-678.
- Odds, F. C., Bernaerts, R. (1994). CHROMagar *Candida*, a New differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 8, 1923-1929
- Ranjan, A., Moholkar, V.S. (2013). Competitive study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. *Fuel*, 112, 567-571.
- Reeta, R.S., Reetu, S., Mukund, A., Jitendra, K.S., Anshu, M., Deepak, T. (2015). An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 102, 45-48.
- Rao, R.S., Jyothi, C.P., Prakasham, R.S., Sarma, P.N., Rao, L.V. (2006). Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Biore-source Technology*, 97, 1974-1978.
- Saha, B.C., Cotta, M.A. (2007). Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 4, 528-532.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Biore-source Technology*, 2, 4, 707-738.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2008) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory NREL/LP-510-42618*.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J. (2008). Determination of Total Solids in biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. *Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621*.
- Wei-Hao, W., Wei-Chun, H., Kai-Yin, L., Yen-Hui, C., Hou-Peng, W., Kuan-Chen, C. (2016). Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. *Biore-source Technology*, 201, 27-32.