

Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables

Usage of the common mango agroindustrial waste (*mangifera indica* L.) in the destruction of fermentables sugars

L. F. Mejía Giraldo¹, H. A. Martínez Correa²,
J. E. Betancourt Gutiérrez³ y C. E. Castrillón Castaño⁴

Recepción: 14-feb-2007/Modificación: 16-jul-2007/Aceptación: 25-jul-2007

Se aceptan comentarios y/o discusiones al artículo

Resumen

El residuo del mango común (*Mangifera indica* L.) es un material vegetal que contiene gran cantidad de tejido lignocelulósico, el cual puede ser aprovechado para la obtención de metabolitos fermentables y productos de la fermentación. En este trabajo se aplicaron tratamientos de hidrólisis al residuo del mango común con el fin de hacer la conversión de sus polisacáridos a unidades de azúcares fermentables. Se aplicó hidrólisis ácida a tres concentraciones diferentes de ácido sulfúrico diluido. También, se aplicó hidrólisis enzimática con

¹ Especialista Ciencia y Tecnología de Alimentos, lfmejia@usb.edu.co, profesor, Universidad de San Buenaventura, Santiago de Cali–Colombia.

² MSc Ingeniería Química, hamarinez@palmira.unal.edu.co, profesor, Universidad Nacional de Colombia, Palmira–Colombia.

³ Ingeniero agroindustrial, jbetancourtgu@palmira.unal.edu.co, egresado, Univesidad Nacional de Colombia, Palmira–Colombia.

⁴ Ingeniero Agroindustrial, cecastrillonc@palmira.unal.edu.co, egresado, Univesidad Nacional de Colombia, Palmira–Colombia.

dos tipos de enzimas comerciales a diferentes concentraciones en las condiciones de trabajo estándar. De igual manera se aplicó hidrólisis térmica a dos temperaturas diferentes. A cada tratamiento aplicado se le efectuaron pruebas de concentración de azúcares totales, concentración de azúcares reductores, porcentaje de celulosa y hemicelulosa residual, datos con los cuales se determinaron los mejores tratamientos y se procedió a efectuar combinaciones de los mejores tratamientos de hidrólisis. El tratamiento más significativo de las pruebas individuales fue el de hidrólisis ácida a 0,50 % v/v de ácido sulfúrico a 80°C por una hora. En los tratamientos combinados el resultado más significativo fue el tratamiento en el que se combinaron la hidrólisis enzimática (como pretratamiento) más una hidrólisis térmica e hidrólisis ácida. Por razones de seguridad en el uso de reactivos, así como eliminación de efectos colaterales adversos para la fermentación alcohólica posterior, se seleccionó el procedimiento que involucra la hidrólisis térmica como pretratamiento y la hidrólisis enzimática como tratamiento principal, como el tratamiento de mejor aplicación en la producción de metabolitos fermentables a partir de residuos de mango común con finalidad producción de alcohol posteriormente.

Estudios posteriores han permitido abordar la hidrólisis por vía microbiana con *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*, así como la fermentación alcohólica postratamiento hidrolítico usando los estudios previos. La hidrólisis y fermentación alcohólica simultáneas, y más recientemente y en ejecución la simultaneidad de los procesos adicionando una levadura recombinante que tiene capacidad de fermentar azúcares de cinco carbonos.

Palabras claves: residuo de mango común o mango hilacha, azúcares, celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, hidrólisis térmica, fermentación alcohólica.

Abstract

The common mango waste (*Mangifera indica* L.) is a vegetable material containing a high level of lignocelluloses tissue which can be used to obtain fermentable metabolites and fermentation products. In this study hydrolysis treatments were applied to the common mango in order to make the conversion of its polysaccharides to fermentable sugar units. Acid hydrolysis was applied to three different concentrations of dilute sulphuric acid. An enzymatic hydrolysis with two types of commercial enzymes to different concentrations in standard work conditions, was also applied. In addition, a thermic hydrolysis was applied at two different temperatures. At each treatment, the following tests were applied: total sugar concentration, reduced sugar concentration, and percentage of cellulose and hemicellulose residuals. Based on the data obtained from the tests, the best treatments were identified and so the best combinations of the best hydrolysis treatments were carried out. The most significant treatment for individual tests was acid hydrolysis at 0,50% v/v sulphuric acid at 80°C for one hour. In the combined treatments the most

relevant result was the treatment that combined the enzymatic hydrolysis (as pretreatment) plus a thermic hydrolysis and acid hydrolysis. For security reasons in the reagents use, as well as in the elimination of collateral adverse effects for further alcoholic fermentation, a procedure involving thermic hydrolysis as pretreatment and enzymatic hydrolysis, was chosen as the main treatment with the most appropriate application in the fermentable metabolites production from common mango waste in order to produce alcohol.

Further studies have allowed approaching the hydrolysis via microbial with *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*, as well as the alcoholic fermentation post-treatment hydrolytic using previous studies. The simultaneous hydrolysis and alcoholic fermentation, and recently performing the simultaneity of the processes, adding a recombining yeast that has the capacity to ferment sugars from five carbons.

Key words: mangos waste, sugars, cellulose, hemicellulose, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, thermic hydrolysis, alcoholic fermentation.

1 Introducción

El estudio presentado es un preámbulo del proyecto “Aprovechamiento de los residuos agroindustriales en la producción de metabolitos de alto valor agregado”, el cual puede ser un gran elemento de partida para la mejor utilización de los recursos y la disminución de la contaminación ambiental generada por la industria colombiana, y en particular por la agroindustria de pulpas y jugos. Los resultados mencionados corresponden al estudio continuo que se inició en el año 2002 y que continúa en desarrollo, presentándose los avances logrados hasta el 2005.

La utilización de materiales lignocelulósicos viene siendo investigada intensamente, debido a que estos representan el mayor componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, y constituyen una fuente abundante y segura de recursos renovables y energía. Sin embargo, actualmente en Colombia estos residuos están siendo subutilizados en la mayoría de los casos causando serios problemas de contaminación ambiental por la deficiencia en 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 y alcoholes, entre otros.

En el departamento del Valle del Cauca se procesan aproximadamente 351,5 toneladas/semana de mango común por parte de la agroindustria de pulpas y jugos, generando un problema serio 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 fibra [1]; este rubro ha aumentado en un 30 %, valores revisados a septiembre de 2006.

Este proyecto genera las condiciones adecuadas para el aprovechamiento de residuos en la producción de residuos fermentables con el fin de producir insumos con mayor valor agregado como es el caso del etanol. La obtención de combustibles líquidos a partir de biomasa agrícola ha despertado gran interés en los últimos años. La necesidad de encontrar carburantes para motores de explosión que no dependan del petróleo es evidente, además de ser una alternativa importante para disminuir la contaminación ambiental. La utilización de diversos residuos agrícolas es una propuesta lo suficientemente importante para producir biocombustibles y así reducir la dependencia exclusiva en este sentido de la caña de azúcar, generando con ello valor agregado, permitiendo el desarrollo social de las comunidades comprometidas con el uso racional de materias primas y los residuos.

Estos residuos son materiales constituidos en su mayor parte por tejidos lignocelulósicos, los cuales se deben someter previamente a diferentes tipos de tratamientos hidrolíticos para poder aprovecharlos favorablemente en la producción de compuestos susceptibles de fermentación (glucosa, fructosa, manosa, xilosa, entre otros) elementos esenciales para la producción de diferentes compuestos de alto valor agregado.

2 Metodología

El material utilizado en la realización del trabajo fue el residuo del mango común (*Mangifera indica* L.) proveniente de la industria despulpadora de frutas, que comprende la cáscara o pericarpio y residuos de fibra y pulpa. La materia prima se sometió a secado con el fin de remover el agua para conservación del material y aplicar tratamientos de hidrólisis sobre el material rehidratado. El secado del material se prolongó hasta extraer aproximada-

mente el 70% de la humedad. El proceso de secado se realizó en un secador de bandejas con aire caliente a una temperatura de 45°C.

A la materia prima seca, se le realizaron pruebas como: azúcares totales (Método de Antrona), azúcares reductores (Método DNS), contenido de fibra, con el fin de obtener datos iniciales (testigo) para comparar con los datos que se obtuvieron del proceso hidrolítico, además de un análisis proximal para caracterizar el residuo de mango. El material seco fue molido en molino de discos y tamizado para obtener un tamaño de partícula a través de tamiz N. 60, el cual diluye sin problemas en el agua y facilita la hidrólisis por la ampliación del área de contacto [2].

Para determinar la proporción de hidratación del material seco para tratamientos de hidrólisis, se realizaron ensayos con soluciones de 2,5; 5; 10 y 20% p/v de materia seca, se decidió que la mejor condición de la muestra para la hidrólisis es la solución al 2,5% p/v, con la cual se trabajaron las pruebas experimentales del proyecto.

2.1 Análisis Proximal

En el análisis proximal se determinaron los porcentajes de proteína bruta, cenizas totales, grasa bruta, extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) y agua.

- **Determinación del contenido en materia seca (AOAC 1990. 934,01) [3]**
- **Determinación del contenido de cenizas (AOAC 1990. 942,05) [3]**
- **Determinación del contenido en grasa (método soxhlet, AOAC 1990. 920,39) [3]**
- **Determinación del contenido en proteína bruta (método de Kjeldahl)**
- **Determinación del contenido de fibra (método Ankom)**

- **Determinación de azúcares totales (método de antrona - Dubois, 1956) [4].** Fundamento: la reacción de antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexourónicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul-verdosa muestra la absorción máxima a 625 nm. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de tipo UV-1603 SHIMADZU.
- **Determinación de azúcares reductores (método DNS - Miller, 1959) [5].** Fundamento: el ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de calor reduce el ácido 3-amino-5 nitrosalicílico por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un color amarillo café el cual es estable hasta por 24 horas. La lectura se realiza a 575 nm. Este método permite medir las unidades reductoras presentes en los azúcares. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de tipo UV-1603 SHIMADZU.

2.1.1 Hidrólisis ácida. La hidrólisis ácida se llevó a cabo con ácido sulfúrico diluido, adicionado a la solución 2,5 % p/v de materia prima a temperatura de 80°C y por un tiempo de una hora. En el proceso de hidrólisis ácida se realizaron pruebas preliminares, debido a que se tenían diferentes concentraciones de ácido (0,25; 0,50; 0,75; 1; 2; 3; 4 y 5 %), y se determinaron las tres concentraciones más eficientes en la hidrólisis, en cuanto a producción de azúcares reductores se refiere.

2.1.2 Hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática se efectuó con dos tipos de enzimas comerciales: Celluclast 1,5 L y Pectinex ultra SPL (Novo Nordisk Ferment). La primera enzima es una celulasa que actúa sobre la celulosa y la hidroliza, y la segunda es una pectinasa-celulasa que desdobra los complejos de pectina y celulosa. Las concentraciones de las enzimas (Celluclast y Pectinex ultra SPL) se determinaron con base en las especificaciones y parámetros de la ficha técnica de cada enzima comercial las cuales contienen información acerca de la actividad, rangos de temperatura y pH, concentración y tiempo, en la cual la enzima presenta condiciones óptimas de actividad en un sustrato determinado. En el caso de Pectinex Ultra SPL, la enzima no tenía un rango de concentración para la utilización definido, razón por la cual se decidió hacer pruebas con concentraciones tales como: 200, 400 y 600

ppm; con base en experiencias previas de hidrólisis en maceración de jugos de frutas pulposas [6]. Para la enzima comercial Celluclast 1,5 L, se tenía un rango específico de 400 a 1000 ppm de concentración, según la ficha técnica. Por tal razón, se realizaron pruebas a concentraciones diferentes de enzima: 400, 600 y 800 ppm en la solución de mango común.

2.1.3 Hidrólisis térmica. Se efectuaron con autoclavado (mezcla líquido-vapor) y a temperatura de ebullición a presión atmosférica durante una hora. Este procedimiento se efectuó teniendo en cuenta dos temperaturas de prueba ($T_1 = 98^\circ\text{C}$, presión atmosférica y $T_2 = 125^\circ\text{C}$, 1,4 bar). Después de cada tratamiento se efectuaron pruebas de concentración de azúcares reductores, concentración de azúcares totales y determinación de fibra (celulosa y hemicelulosa) en porcentaje. Cada experimento se realizó por triplicado, los datos obtenidos en el diseño experimental se les aplicó un análisis de varianza (GLM-ANOVA) a través del programa SAS, adicionalmente se realizó una prueba de significancia posterior al análisis de varianza denominada Prueba de DUNCAN con el fin de verificar las diferencias de los tratamientos aplicados al material. En el análisis de varianza, para deducir la incidencia de un tratamiento en las variables de respuesta el factor $Pr > F$ debe ser menor de 0,05, este valor indica la significancia de los datos. En la prueba de significancia para medias de DUNCAN la categorización de los tratamientos deben poseer letras distintas para demostrar las diferencias significativas entre tratamientos, o letras iguales para indicar la similitud de los datos de un tratamiento a otro.

3 Resultados

Caracterización del residuo de mango común (*Mangifera indica* L.)

El análisis proximal se presenta en la tabla 1. Se puede apreciar que el contenido de carbohidratos es alto, lo cual lo hace un material de excelentes condiciones para la obtención de metabolitos fermentables, en la medida que estos están constituidos principalmente por celulosa.

Tabla 1: caracterización del residuo de mango común (*Mangifera indica* L.)

Composición	Porcentaje (%)
Materia Seca	31,45
Humedad	68,55
Proteína	7,03
Extracto Etéreo	5,5
Cenizas	3,48
Carbohidratos	15,44
Celulosa	14,21
Hemicelulosa	4,88
pH	4,2

3.1 Pruebas preliminares

3.1.1 Pruebas preliminares para hidrólisis ácida. En la figura 1 se puede observar que las tres concentraciones en las cuales se obtiene mayor cantidad de azúcares reductores son a 0,25; 0,50 y 0,75 %, razón por la cual se eligieron para practicar el tratamiento de hidrólisis ácida y compararlos con los resultados de los demás tratamientos.

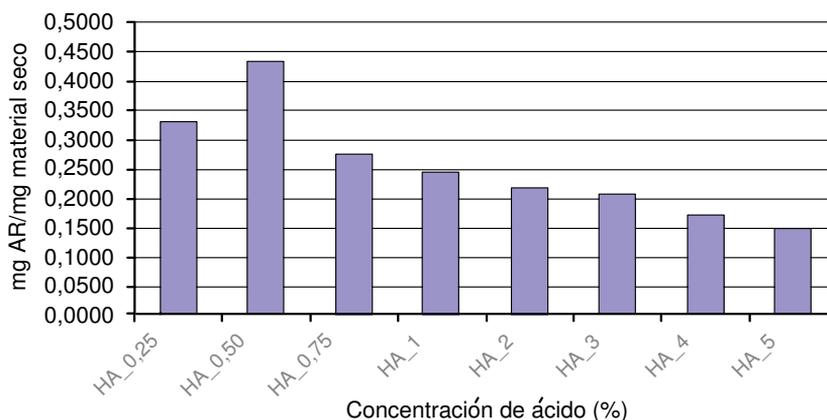


Figura 1: concentración de azúcares reductores vs. concentración de ácido sulfúrico

3.1.2 Pruebas preliminares para hidrólisis enzimática. La concentración de enzima de mayor rendimiento en producción de azúcares reductores (figura 2) es 600 ppm, pero con respecto a la concentración de 200 ppm y 400 ppm, no se presenta una alta diferencia. Esta cercanía en el valor de los datos de azúcares reductores, y el alto costo de las enzimas son razones suficientes para decidirse por la concentración de 200 ppm, ya que la producción de azúcares reductores es muy similar en los tres tratamientos. El mayor contenido de azúcares reductores se obtiene con 800 ppm de la enzima, pero las otras dos concentraciones de enzima tienen producción similar de azúcares reductores, por lo cual no existen diferencias marcadas entre los tres tratamientos. Por esta razón y debido al alto costo del tratamiento con enzimas, se decidió utilizar la menor concentración de enzima, es decir, 400 ppm para la comparación con otros tratamientos (figura 3).

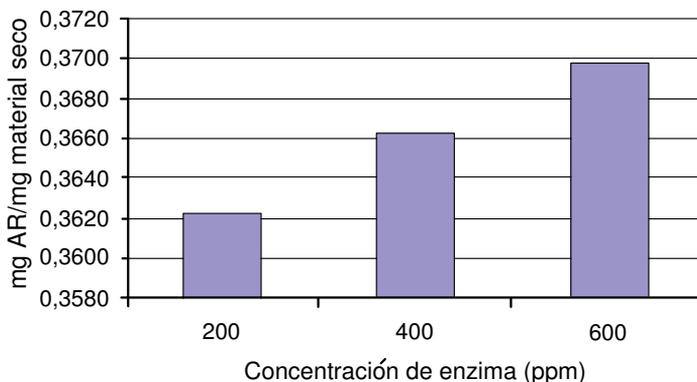


Figura 2: concentración de azúcares reductores versus Concentración de enzima Pectinex Ultra SPL

3.1.3 Pruebas preliminares para hidrólisis térmica. No se practicaron pruebas preliminares al método de hidrólisis térmica y se realizaron las pruebas definitivas con las variables propuestas inicialmente ($T_1 = 98^\circ\text{C}$ y $T_2 = 125^\circ\text{C}$).

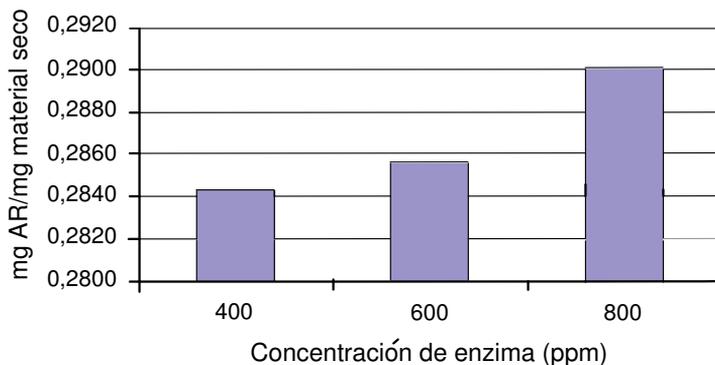


Figura 3: concentración de azúcares reductores versus Concentración de enzima Celluclast 1,5 L

3.2 Análisis estadístico

Respecto a los datos obtenidos experimentalmente para las variables de respuesta (azúcares reductores, azúcares totales, % celulosa y % hemicelulosa), tabla 2, se presenta un nivel de confiabilidad por encima del 99 %, es decir, son altamente significativos con respecto a cada tratamiento practicado. Se escogieron los mejores tratamientos preliminares en cada caso para su análisis. Los datos de valor medio (media estadística) con la misma letra no presentan diferencias significativas.

Tabla 2: análisis Duncan para hidrólisis ácida, enzimática y térmica

Tratamiento	Valor medio (mg Az. Reductores/mg materia seca)	Valor medio (mg Az. totales/mg materia seca)	Valor medio % de Celulosa	Valor medio % de Hemicelulosa
Sin tratamiento	0,23347 E	0,67367 A	14,2167 A	4,8867 A
H ₂ SO ₄ 0, 25 %	0,34850 B, C	0,44577 C, D	6,3833 D	4,5300 A, B
H ₂ SO ₄ 0, 50 %	0,46053 A	0,51127 B	3,1733 E	1,9700 C
H ₂ SO ₄ 0, 75 %	0,29890 D	0,49590 B, C	1,9833 E	1,8367 C
Pectinex 200 ppm	0,37743 B	0,41653 D	11,1500 B, C	3,6533 B
Celluclast 400 ppm	0,28853 D	0,42367 D	10,1767 C	2,3533 C
98°C	0,31120 D	0,51807 B	12,3467 B	2,0800 C
125°C	0,31913 C, D	0,48260 B, C	11,1900 B, C	2,0233 C

Entre las variables de respuesta, las de mayor relevancia son los azúcares reductores y la celulosa, ya que son los mejores indicadores de la degradación y conversión de tejido lignocelulósico en azúcares fermentables y cantidad de celulosa residual, figuras 4 y 5.

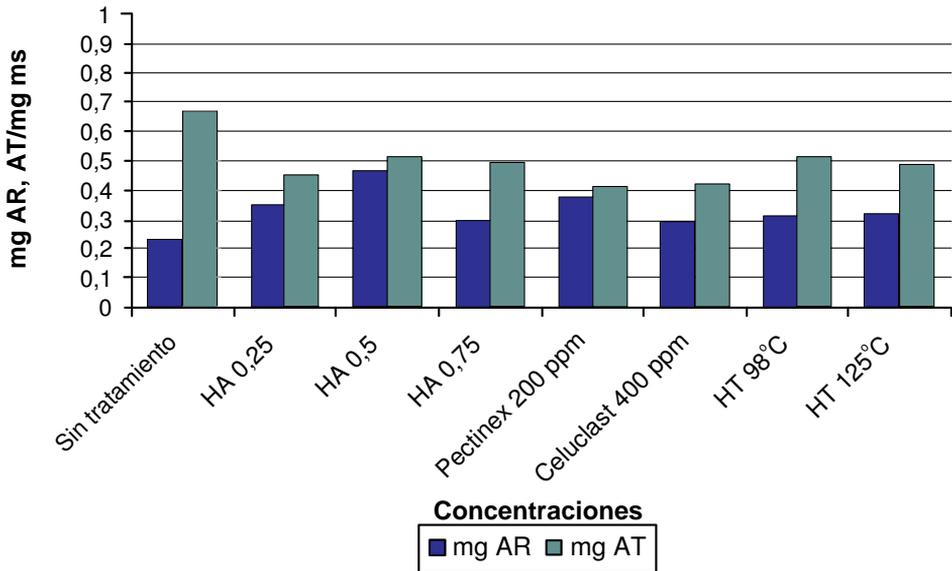


Figura 4: concentración de azúcares en los tratamientos

3.2.1 Hidrólisis ácida. En la hidrólisis ácida, específicamente a concentración de 0,50 %, se presenta la mayor producción de azúcares reductores, lo cual la hace la de mayor eficiencia en cuanto a producción de metabolitos fermentables se refiere. Los azúcares reductores tienden a reducir su concentración por encima de la concentración de ácido sulfúrico al 0,50 %, debido a que el ácido en mayor concentración degrada los azúcares fermentables.

Los azúcares totales tienden a reducirse cuando aumenta la concentración de ácido, formando compuestos diferentes derivados de la degradación de azúcares del material. Estos compuestos (ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, entre otros) pueden tener una alta incidencia sobre procesos fermentativos que se lleven a cabo en el material hidrolizado, provocando inhi-

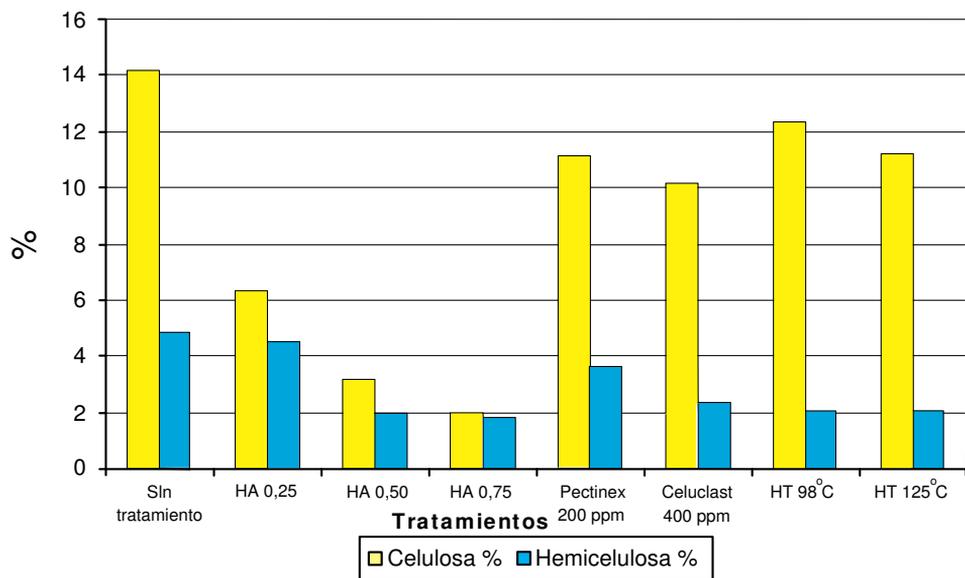


Figura 5: porcentaje de celulosa y hemicelulosa en los tratamientos

bición e inactividad de los microorganismos [7]. Según el análisis estadístico (GLM-ANOVA), se presentan diferencias significativas entre los tres tratamientos de hidrólisis ácida, con mayor significancia para la hidrólisis a 0,50 % de concentración de ácido sulfúrico, tabla 2.

El contenido de hemicelulosa en el material desciende a medida que se eleva la concentración de ácido sulfúrico, ya que a mayor concentración de ácido el tratamiento tiende a ser más agresivo degradando mayor cantidad de hemicelulosa. De igual manera se representa la dinámica de reducción de contenido de celulosa, la cual alcanza su mayor degradación a una concentración de 0,75 % de ácido sulfúrico, pero los azúcares reductores a esta concentración son menores. Esta variación muestra que el ácido sulfúrico a mayor concentración degrada mayor cantidad de celulosa y no necesariamente convirtiéndolos a azúcares, sino que los transforma en otro tipo de compuestos tales como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural y compuestos aromáticos derivados de la lignina que pueden inhibir un eventual proceso de fermentación posterior [8]. Según el análisis estadístico (GLM-ANOVA), se presentaron diferencias

significativas en la reducción de celulosa y hemicelulosa en los tratamientos con hidrólisis ácida a 0,25 y 0,50 %, y no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos de 0,50 y 0,75 % en cuanto a reducción de celulosa y hemicelulosa, tabla 2.

3.2.2 Hidrólisis enzimática. Desde el punto de vista de la hidrólisis enzimática, la mayor producción de azúcares reductores la tuvo la enzima Pectinex Ultra SPL a 200 ppm, debido a la hidrólisis de la pectina presente en el residuo del mango común, como en todas las demás frutas. En el proceso de hidrólisis enzimática, las dos enzimas tuvieron una concentración similar de azúcares totales. La conversión de pectina a ácido galacturónicos se reporta como azúcares totales según la técnica de detección utilizada, lo cual no es del todo cierto considerarlos como azúcares fermentables [6]. Según el análisis estadístico (GLM-ANOVA) se presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos enzimáticos, en cuanto a azúcares reductores, obteniendo mayor significancia el tratamiento con Pectinex Ultra SPL, tabla 2. El porcentaje de degradación de celulosa fue menor en el tratamiento con Pectinex, ya que la enzima ataca prioritariamente la pectina y en menor medida la celulosa.

La enzima Celluclast 1,5 L, actuó selectivamente sobre la celulosa obteniendo rendimientos superiores a la enzima Pectinex en la hidrólisis de esta molécula. La celulosa que se degradó, en su mayoría, se convirtió en azúcares reductores, ya que la celulosa es una enzima de alta selectividad que garantiza la conversión o despolimerización de la celulosa y la hemicelulosa, en su mayoría, a unidades fermentables de glucosa [9]. La enzima Celluclast, tuvo mayor selectividad en el momento de actuar sobre la hemicelulosa, ya que esta enzima es específica para la degradación de celulosa y complejos de celulosa y hemicelulosa [10]. Según el análisis estadístico (GLM-ANOVA), no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos enzimáticos, en cuanto a celulosa se refiere, pero en cuanto a hemicelulosa, si hubo mayor significancia en el tratamiento con Celluclast 1,5 L, tabla 2.

3.2.3 Hidrólisis térmica. El tratamiento térmico presentó una producción de azúcares reductores aún mayor que el tratamiento con la enzima Celluclast. El tratamiento con alta temperatura (125°C) y presión (1,4 bar) tuvo el mayor rendimiento en cuanto a azúcares reductores con respecto al trata-

miento a 98°C y presión atmosférica. Se aprecia que la reducción de azúcares totales es menor, lo cual indica que el tratamiento no es tan severo en cuanto a degradación de azúcares se refiere, es decir, no se produce alta cantidad de compuestos diferentes a los azúcares, sobre todo en la hidrólisis a 98°C. Según el análisis estadístico (GLM-ANOVA) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de hidrólisis, en cuanto a azúcares reductores, razón por la cual se sugiere trabajar el tratamiento a 98°C por razones de ahorro energético, tabla 2.

Este tratamiento térmico, generalmente, es utilizado como pretratamiento para aplicar posteriormente la hidrólisis enzimática, debido a que separa el complejo celulosa-hemicelulosa facilitando la acción de las enzimas sobre cada molécula [10].

El tratamiento térmico no es tan severo, sobre todo, en la hidrólisis a 98°C. Por esta razón se nota que en los tratamientos térmicos la celulosa no resulta tan afectada por la temperatura, lo contrario sucede con la hemicelulosa que si resulta degradada o hidrolizada por el tratamiento térmico, es decir, el tratamiento de hidrólisis térmica tiene efectos más notables sobre la hemicelulosa y en menor medida sobre la celulosa, tablas 2 y 3.

Tabla 3: resultados estadísticos entre los mejores tratamientos de hidrólisis

Tratamiento	mg AR/ mg ms	mg AT/ mg ms	% Celulosa	% Hemi- celulosa
H.A_0,50 %	0,46053 A	0,51127 B	3,1733 A	1,9700 A
H.E_Pectinex 200 ppm	0,37743 B	0,41653 C	11,1500 B	3,6533 B
H.T_98°C	0,31320 C	0,51807 B	12,3467 B	2,0800 A

Con base en los datos obtenidos se seleccionaron los tres mejores tratamientos, en los cuales se nota una mayor producción de metabolitos fermentables (azúcares reductores) y mayor hidrólisis de celulosa y hemicelulosa; en el tratamiento de hidrólisis ácida corresponde a la concentración de 0,50 % de ácido sulfúrico, en el tratamiento enzimático a la enzima Pectinex Ultra SPL que obtuvo altos niveles de producción de azúcares reductores y en el tratamiento térmico una temperatura de 98°C tuvo una buena respuesta, razón por la cual puede ser utilizado como pretratamiento para hidrólisis posteriores. En la hidrólisis térmica la diferencia entre los dos tratamientos no tuvo

una alta significancia, por lo cual se seleccionó como mejor tratamiento aquel que demande menor consumo de energía y equipamiento especial.

Con los tratamientos seleccionados se realizaron una serie de combinaciones para determinar cual presentaba mejores resultados en producción de metabolitos fermentables.

3.2.4 Tratamientos Combinados. La combinación de los tratamientos fue la siguiente:

Tratamiento 1. Hidrólisis enzimática + (Hidrólisis ácida + Hidrólisis térmica)

1. Pectinex Ultra SPL 200 ppm, pH 4,5 y $T = 40^{\circ}\text{C}$, $t = 20$ minutos.
2. H_2SO_4 0,50 % v/v + $T = 98^{\circ}\text{C}$, $t = 1$ hora.

Tratamiento 2. Hidrólisis ácida + Hidrólisis térmica

1. H_2SO_4 0,50 % v/v + $T = 98^{\circ}\text{C}$, 1 hora.

Tratamiento 3. Hidrólisis térmica + Hidrólisis enzimática

1. $T = 98^{\circ}\text{C}$, $t = 1$ hora
2. Pectinex Ultra SPL 200 ppm, pH 4,5, $T = 40^{\circ}\text{C}$, $t = 20$ minutos.

La aplicación de tratamientos combinados es una alternativa viable para lograr mayor producción de azúcares reductores, ya que se mejoran las condiciones de hidrólisis por la acción de pretratamiento, mejorando los efectos de la hidrólisis principal, tabla 4.

Tabla 4: datos experimentales para tratamientos combinados

Tratamiento	mg AR/ mg ms	mg AT/ mg ms	% Celulosa	% Hemicelulosa
T1	0,5464 A	0,5704 C	2,85 C	2,09 B
T2	0,4697 C	0,4977 D	3,14 C	2,06 B
T3	0,5338 B	0,5876 B	9,8 B	1,99 B

En el caso del tratamiento que combina enzima y ácido (tratamiento 1), el efecto sinérgico se refleja en la alta concentración de azúcares reductores al final del procedimiento. La enzima actúa sobre la pectina y el complejo celulosa-hemicelulosa facilitando la acción hidrolítica del ácido directamente sobre la molécula de celulosa, figuras 6 y 7. Este procedimiento conlleva a que el ácido adicionado degrade alguna parte de los azúcares reductores formados en la hidrólisis enzimática, lo cual reduce las expectativas potenciales de esta combinación. De manera similar que en el procedimiento individual de hidrólisis ácida al 0,50 %, gran parte de los azúcares totales son degradados, por la acción del ácido, a compuestos diferentes que pueden resultar inhibidores de la fermentación.

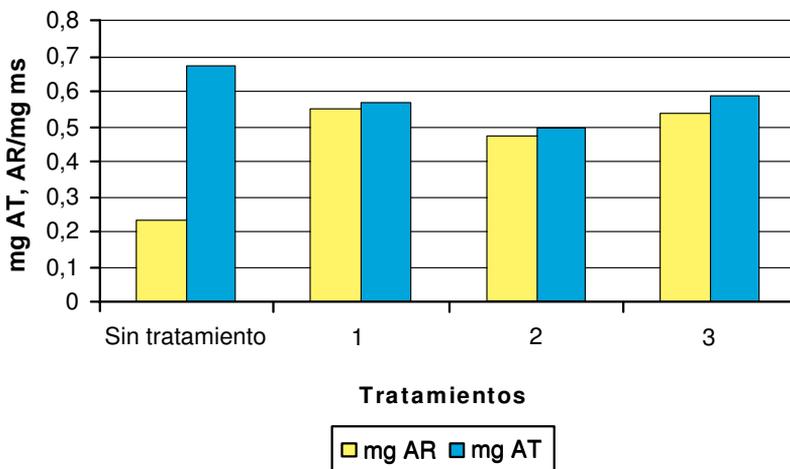


Figura 6: concentración de azúcares totales y reductores para los tratamientos combinados

Para el tratamiento que combina adición de ácido y temperatura de 98°C (tratamiento 2) no se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento con ácido al 0,50 % y temperatura de 80°C, ya que las diferencias en la temperatura no variaron en gran medida los resultados. Para lograr una diferencia, se debe hacer un tratamiento con temperaturas demasiado elevadas (> 150°C) y menores tiempos de exposición, lo cual trae consigo altos rendimientos en cuanto a azúcares reductores se refiere [10].

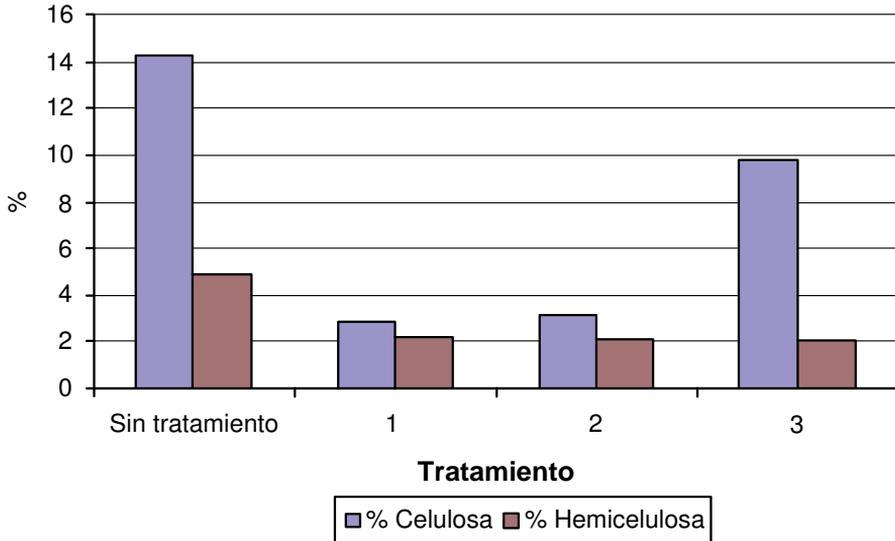


Figura 7: porcentaje de celulosa y hemicelulosa para los tratamientos combinados

El pretratamiento térmico aplicado para efectuar hidrólisis enzimática (tratamiento 3), resultó una excelente estrategia para aumentar la proporción de azúcares reductores formado aplicando enzima. El pretratamiento modificó o hidrolizó la estructura de celulosa–hemicelulosa, liberando unidades de hemicelulosa, las cuales son más susceptibles a la hidrólisis térmica. Este pretratamiento permitió que la enzima adicionada (Pectinex Ultra SPL) actuara con mayor facilidad sobre la celulosa elevando la concentración de azúcares reductores, con respecto a la hidrólisis enzimática sin pretratamiento térmico. La selectividad de la enzima no permite altas degradaciones de azúcares reductores ya obtenidos en el tratamiento térmico y su posible conversión a otro tipo de compuestos diferentes a azúcares.

Entre los tratamientos T1 y T3, según el análisis estadístico (ANOVA), no se presentaron diferencias significativas, en cuanto a producción de hemicelulosa, y se presentaron diferencias significativas importantes en cuanto a la degradación de celulosa, esto debido a la utilización de ácido sulfúrico en el primer tratamiento. Los tratamientos T1 y T3 presentan similitud en la producción de azúcares fermentables. Desde el punto de vista económico, el

tratamiento más favorable es T3 que involucra la utilización de pretratamiento térmico e hidrólisis enzimática, a diferencia de T1 que involucra los mismos tratamientos que el anterior y la adición de ácido sulfúrico. En cuanto a tiempo de hidrólisis los dos tratamientos son equivalentes, ya que ambos necesitan de 80 minutos de reacción (60 minutos para hidrólisis ácida o térmica, y 20 minutos para hidrólisis enzimática).

4 Conclusiones

Para establecer con claridad las conclusiones del presente estudio, es necesario diferenciar los resultados por cada tratamiento practicado y evaluar el objetivo principal de obtener metabolitos fermentables.

El residuo del despulpado del mango común (*Mangifera indica* L.) es un sustrato potencial para la extracción de metabolitos fermentables y posterior fermentación para obtener alcohol (etanol) u otro tipo de productos por vía fermentativa, ya que posee un alto contenido de carbohidratos (15,44 % en base seca), los cuales están representados en celulosa, hemicelulosa, pectina y azúcares reductores y no reductores. Además, su contenido de proteína (7,03 % en base seca) lo hace un material que posee características favorables para ser utilizado en fermentaciones microbianas.

En el proceso de hidrólisis ácida se obtuvieron altas concentraciones de azúcares reductores (azúcares fermentables) en el tratamiento con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 0,50 %, obteniéndose rendimientos con respecto al material sin tratar del 52,75 %. La hidrólisis de celulosa y hemicelulosa fue alta en el tratamiento con ácido, pero se presentó conversión de estos polisacáridos a otro tipo de compuestos indeseables en la solución hidrolizada. Este efecto se refleja en la disminución de azúcares totales y en la alta degradación de celulosa y hemicelulosa con el tratamiento ácido. La principal ventaja del tratamiento con ácido sulfúrico diluido es la baja cantidad de ácido requerido en el proceso, pero la temperatura necesaria para efectuar la hidrólisis generalmente es alta, al igual que el tiempo, provocando corrosión de los equipos utilizados y la degradación de azúcares en otro tipo de compuestos que pueden resultar inhibidores de la fermentación alcohólica. Si en el proceso de hidrólisis ácida se desea obtener mayor producción de azúcares reductores se debe elevar la temperatura, y al operar a altas temperaturas ($> 150^\circ C$), para que el sistema

continué como líquido es necesario aumentar la presión y ello incrementa la inversión en cuanto a tecnología y equipos se refiere.

En el proceso de hidrólisis enzimática se obtuvieron los mejores resultados en el tratamiento que utilizó la enzima comercial Pectinex Ultra SPL (Novo Nordisk Ferment), ya que se obtuvo un rendimiento en azúcares reductores con respecto al material sin tratar del 38,15 %, el cual es un rendimiento significativo que demuestra que el tratamiento enzimático es aplicable al material en particular. El tratamiento enzimático actuó con mayor incidencia sobre la pectina y la hemicelulosa del mango común, y en menor medida sobre la celulosa. La hidrólisis enzimática presenta ventajas en cuanto a la acción selectiva sobre los componentes del material y su baja proporción de azúcares convertidos a otros compuestos (ácidos orgánicos, furfural, HMF, entre otros), según el tratamiento experimental efectuado y el material utilizado. El proceso de sacarificación por hidrólisis enzimática presenta ventajas tecnológicas y de operación en cuanto a que la temperatura (40°C) y el pH (4,5) de la actividad de la enzima no implican dificultades técnicas y costos muy elevados, pero el valor de la enzima comercial representa un gran porcentaje del costo del tratamiento.

En el proceso de hidrólisis térmica se obtuvieron rendimientos bajos con respecto a los tratamientos anteriores. El rendimiento máximo de azúcares reductores obtenido en la hidrólisis térmica se obtuvo a 125°C y fue de 26,85 %, y en el tratamiento a 98°C se obtuvo un rendimiento de 25,47 %, con respecto al material sin tratamiento. Se determinó que las diferencias entre un tratamiento y otro no tuvieron una significancia relevante y por tal razón se optó por el tratamiento que implique la menor inversión energética. Esta hidrólisis térmica es eficiente como pretratamiento, debido a que facilita la separación del complejo celulosa-hemicelulosa e hidrolizando parte de la hemicelulosa, facilitando la acción de un tratamiento hidrolítico posterior.

La celulosa y hemicelulosa contenida en el mango común, fue degradada, en su mayor parte, por los tratamientos con ácido sulfúrico debido a la agresividad de este ácido al entrar en contacto con material lignocelulósico. Sin embargo, el hecho de que haya habido mayor degradación celulósica y hemicelulósica con ácido, no implica que todo el material hidrolizado haya sido convertido en azúcares reductores (azúcares fermentables), gran cantidad del material lignocelulósico hidrolizado se convirtió en otro tipo de compuestos

no deseados en la solución hidrolizada tales como: ácidos orgánicos (acético, fórmico y levulínico), compuestos aromáticos, furfural e hidroximetilfurfural, entre otros, que son potenciales inhibidores de microorganismos en el caso de una fermentación alcohólica. El tratamiento enzimático, presentó mayor degradación sobre la pectina presente en el material, la hemicelulosa asociada a la celulosa y de fácil degradación, y sobre la celulosa, en menor proporción. A pesar de su selectividad en la acción sobre los componentes del material, las enzimas utilizadas, Pectinex Ultra SPL y Celluclast 1,5 L (Novo Nordisk Ferment), presentó degradación de compuestos lignocelulósicos a otro tipo de compuestos diferentes de azúcares (ácidos galacturónicos, entre otros), aunque en muy baja proporción. Esta reacción se pudo apreciar en la reducción de azúcares totales posterior al tratamiento enzimático, sin embargo, es preciso afirmar que esta reducción en la concentración de azúcares totales, pudo ser provocada por errores de lectura en el procedimiento de determinación de azúcares totales (método de Antrona), ya que es un método colorimétrico que puede presentar errores o desviaciones atribuidas a calibración de equipos de lectura (espectrofotómetro) o a los reactivos utilizados en el procedimiento. La hidrólisis térmica no afectó de manera considerable la celulosa contenida en el material ya que el tratamiento térmico no es tan fuerte o selectivo como el tratamiento ácido o enzimático, respectivamente. La hidrólisis térmica tuvo mayor consecuencia sobre la hemicelulosa contenida en el mango común, es decir, se presentó mayor degradación en la hemicelulosa que sobre la celulosa. Esta reacción se debe a que la hemicelulosa asociada con celulosa se desprende y el calor aplicado al sistema hidroliza la hemicelulosa que es una molécula de fácil degradación, produciendo azúcares fermentables. Este procedimiento es recomendado, según datos bibliográficos, como pretratamiento para la aplicación posterior de otros métodos de hidrólisis.

Los tratamientos en los cuales se obtuvieron mejores resultados fueron:

- Hidrólisis ácida: ácido sulfúrico 0,50 %, 80°C, 1 hora.
- Hidrólisis enzimática: Pectinex Ultra SPL 200 ppm, pH 4,5, 20 minutos, 40°C.
- Hidrólisis térmica: 98°C, 1 hora, presión atmosférica.

En los tratamientos combinados, el tratamiento que presentó los mejores

resultados en cuanto a producción de metabolitos fermentables fue la combinación de enzima, temperatura y ácido sulfúrico, con la enzima como pretratamiento. Con este tratamiento combinado se obtuvo un rendimiento en azúcares reductores de 57,28 % con respecto al material sin tratamiento, es decir, se presentó un rendimiento mayor que en el mejor tratamiento individual (ácido sulfúrico 0,50 %, 80°C). Sin embargo, el procedimiento implica elevada inversión en cuanto a enzima, ácido y temperatura utilizada. En cuanto a la conversión de celulosa y hemicelulosa, la combinación de tratamientos aumenta la degradación de material lignocelulósico, sobre todo en el proceso con ácido. De manera similar que en el proceso individual con ácido, la concentración de compuestos diferentes formados por degradación de carbohidratos puede resultar un factor de inhibición para microorganismos fermentativos.

Por las razones antes expuestas, se selecciona el tratamiento 3: hidrólisis térmica (98°C, 1 hora, presión atmosférica) + hidrólisis enzimática (Pectinex Ultra SPL a 200 ppm, pH 4,5, 40°C, 20 minutos), como el que mejor combina la producción de azúcares fermentables y condiciones de tratamiento suaves.

Referencias

- [1] Luis Eduardo Ordoñez Santos. *Proyecto Estudio Generación de Residuos Vegetales en el Valle del Cauca*. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, 2002. Referenciado en 44
- [2] Óscar Monroy H. y Gustavo Viniegra. *Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos*, ISBN-10 968463000X. México: AGT. 1990. Referenciado en 45
- [3] AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, ISBN 0-935584-42-0, 15th Edition. Arlington, Virginia, USA, 1990. Referenciado en 45
- [4] M. Dubois et al. *Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances*. Analytical Chemistry, ISSN: 0003-2700, **28**(3), 350-356 (1956). Referenciado en 46
- [5] Gail Lorenz Miller. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry, ISSN 0003-2700, **31**(3), 426-428 (1959). Referenciado en 46

- [6] Luis Fernando Mejía G. y Elizabeth López. *Empleo de enzimas comerciales en la obtención de jugo clarificado de feijoa sellowiana*. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Tesis Especialización, 1996. Referenciado en 47, 53
- [7] Carlos O. Martín Medina. *Estudio de la Inhibición de la Fermentación de Hidrolizados de Bagazo de Caña de Azúcar para la Producción de Etanol*. Universidad de Matanzas, Cuba. Tesis de Doctorado, 2002. Referenciado en 52
- [8] Mercedes Ballesteros Perdices. *Biocombustibles Líquidos*. Disponible en <http://www.ciemat.es/proyectos/pderbiocombus.html>. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas–CIEMAT, España, Citado en Abril de 2004, 2003. Referenciado en 52
- [9] Ignacio Ballesteros P. *Biomasa Vector Energético. Biocombustibles Líquidos*. Curso de Formación del Profesorado en el Área de Energías Renovables. CIEMAT, España, 2001. Referenciado en 53
- [10] J. B. Neilands y Paul Stumpf. *Principios de Enzimología*, ISBN 84-03-20179-6. Aguilar, Madrid, España, 1967. Referenciado en 53, 54, 56