Posibilidad de aprovechamiento de residuos textiles para la obtención de etanol

Zurima Menéndez–Ramírez, Azam Jeihanipour,* Mohammad Taherzadeh* y Lourdes Zumalacárregui–de Cárdenas.

Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría", Facultad de Ingeniería Química, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: zmenendez@quimica.cujae.edu.cu. *School of Engineering, University of Borås, Borås, Sweden.

Recibido: 3 de noviembre de 2009. Aceptado: 29 de marzo de 2010.

Palabras clave: bioetanol, enzima, sacarificación y fermentación simultáneas, residuos, textiles.
Key words: bioethanol, enzyme, simultaneous saccharification and fermentation, textile, wastes.

RESUMEN. El uso del bioetanol como combustible es una alternativa para minimizar los efectos negativos al medioambiente, ya que reduce el efecto invernadero. En este trabajo se estudian residuos textiles como candidatos para la producción de etanol. Los residuos textiles pretratados con NaOH 12 % (p/v) 0 °C, 3 h (TEP) y sin pretratar (TESP y TDSP), fueron sometidos a procesos simultáneos de sacarificación y fermentación (37 °C, 145 r/min, pH 4,8 a 5). Durante la sacarificación y fermentación, la velocidad de transformación de glucosa a etanol, por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 53310, fue mayor en todos los casos, a la velocidad de transformación de la celulosa en glucosa por las enzimas. Para el sustrato TEP, la concentración de etanol en 48 h fue de 10,38 g/L, mientras que para los sustratos TESP y TDSP en 120 h fue de 5,23 y 4,32 g/L respectivamente. El rendimiento se mantuvo prácticamente constante a partir de 12 h para los tres casos, por lo que un tiempo de operación mayor de 72 h no sería aconsejable. Los rendimientos obtenidos en 72 h fueron 36,08 % para el residuo textil TEP, 15,36 % para el sustrato TESP y 17,25 % para el sustrato TDSP. Las concentraciones y rendimientos de etanol para el residuo textil TEP fueron superiores. Se demostró la posibilidad de obtención de etanol a partir de residuos textiles, lo que contribuiría a reducir la contaminación ambiental si se utiliza como combustible.

ABSTRACT. The use of bioethanol as a fuel is an alternative to minimize the negative consequences on environment, due to its contributes to the reduction of the greenhouse effect. Textile wastes are studied as alternative for ethanol production. Textile wastes, pre-treated [NaOH 12 % (w/v), 0 °C, 3 h] (TEP) and un-pretreated (TESP and TDSP), were subjected to simultaneous saccharification and fermentation processes (SSF) (37 °C, 145 r/min, pH 4.8-5). For this process, the transformation rate of glucose to ethanol, using *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 53310, was higher than the transformation rate of cellulose to glucose using enzymes. Maximum ethanol concentration was 10.38 g/L at 48 h for the pretreated material meanwhile for the untreated materials (TESP and TDSP) ethanol concentration was 5.23 and 4.32 g/L at 120 h, respectively. It was observed that at 12 h the yield practically stayed constant for all materials; therefore an operation time above 72 h would not be advisable. The yields obtained at 72 h were 36.08 % for the pretreated material, and 15.36 and 17.25 %, for the untreated materials respectively. Ethanol concentrations and yields were higher for the pretreated textile waste. Possibilities for ethanol production from textile wastes were shown. The use of this ethanol as a fuel may contribute to reduce environmental pollution.

INTRODUCCIÓN

La generación de residuos, así como el consumo de energía aumenta regularmente con el crecimiento de la población y el desarrollo industrial. El agotamiento de los recursos energéticos convencionales existentes es visible frente al crecimiento de su demanda. Por tanto, es de gran interés la exploración de recursos energéticos alternativos para mantener el desarrollo sostenible de la sociedad.[1] El etanol ha sido un objetivo de interés constante debido a su aplicación multifacética como combustible, bebida y precursor para un número grande de productos químicos. El uso del etanol como combustible constituye una alternativa atractiva, ya que la mayor parte del CO_2 emitido se genera por los medios de transporte.[2] Además, se reducen las emisiones de CO y de los hidrocarburos no quemados por el tubo de escape lo cual disminuye la formación de niebla tóxica.[3] Su combustión no implica una adición neta de CO_2 a la atmósfera y por lo tanto, no contribuye al efecto invernadero.[4] Entre las materias primas utilizadas para la obtención de bioetanol se encuentran todas aquellas que contengan azúcares fermentables fácilmente accesibles

Correspondencia:
Dra. Lourdes Zumalacárregui de Cárdenas
Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría"(CUJAE), Facultad de Ingeniería Química, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: lourdes@quimica.cujae.edu.cu

para los microorganismos encargados de la fermentación, o que puedan ser obtenidos luego de una etapa previa de transformación. La fuente principal de sustrato para la obtención de alcohol en Cuba es la miel de caña de azúcar.[5] El uso de otro tipo de sustrato, como bagazo de caña y residuos agrícolas, está siendo investigado aún a escala de laboratorio.[6,7] Existe una amplia variedad de sustratos que pueden ser utilizados con este fin y los residuos textiles constituyen uno de ellos, pues en su mayoría están compuestos por algodón, el que posee un elevado contenido de celulosa.[8] La conversión a etanol de un residuo textil incluye tres etapas fundamentales: el pretratamiento, la sacarificación y la fermentación. La gran cristalinidad de la celulosa afecta el rendimiento de la hidrólisis enzimática y la velocidad de reacción,[9] por lo que es importante un pretratamiento previo a la sacarificación. El tratamiento alcalino ha sido ampliamente utilizado para este fin.[10] Un factor importante a considerar en la transformación de materiales a bioetanol es el costo. Se sugiere la utilización de tecnologías alternativas con el objetivo de aumentar los rendimientos de etanol.[11,12] El proceso de sacarificación y fermentación simultáneas es una alternativa, ya que puede remover la inhibición de productos finales y elimina la necesidad de usar reactores separados, reduciendo así su número y costo de inversión.[12,13] El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la potencialidad de dos residuos textiles para su transformación a bioetanol, mediante los procesos simultáneos de sacarificación y fermentación, lo que permitiría transformar un residuo en un recurso energético que, utilizado como combustible contribuiría a reducir las emisiones de CO_2 a la atmósfera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustrato y enzimas

Se utilizó algodón como sustrato en la comparación de la efectividad del pretratamiento y dos residuos textiles en el estudio de convertibilidad a etanol. La composición del primer residuo textil, (TD) fue 76 % viscosa – 24 % poliéster. Para el segundo (TE) la composición fue 50 % algodón y 50 % modal. Todos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta ser pretratados. El contenido de humedad fue determinado mediante el secado de una pequeña muestra a 110 °C durante 12 h y el contenido de celulosa, según un método estándar.[14] El contenido de celulosa fue de 70,44 y 94,46 % para los residuos textiles TD y TE, respectivamente y de 99 % para el algodón. Se utilizaron dos enzimas comerciales, celulasa (celluloclast 1,5 L) de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 suministrada por Novozymes (Dinamarca) y β-glucosidasa de almendras (Fluka 49290, Reino Unido). La actividad de la celulasa se determinó según un método estándar y fue 64 UPF/mL .[15] La actividad reportada por el proveedor de la β-glucosidasa utilizada, fue de 8,92 UI/mg de sólido.

Pretratamiento alcalino y químico

El pretratamiento se llevó a cabo en vasos de precipitados de 500 mL . El sustrato fue cortado en tiras de 2 a 5 mm de longitud y puesto en contacto con una disolución de hidróxido de sodio al 12 % (p/v) durante 3 h con una relación sólido : líquido de 1 : 20. Luego del pretratamiento, el sustrato fue lavado, neutralizado (pH = 5 - 6), envuelto en papel metálico y almacenado en un cuarto frío a 6 °C hasta ser usado en el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Durante el pretratamiento el medio fue agitado cada 20 min para garantizar una mezcla adecuada. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a una concentración de enzimas celulasas de 30 UPF/g celulosa y β-glucosidasa de 30 UI/g celulosa. La temperatura de trabajo y la velocidad de agitación fueron controladas en 45 °C y 145 r/min respectivamente. La concentración de sustrato fue de un 3 % (p/v) en una disolución reguladora de citrato para establecer un pH inicial de 4,8. El proceso se realizó durante 24 h . Los experimentos fueron ejecutados por duplicado y los resultados reportados son los promedios. Los experimentos se efectuaron en condiciones estériles. Las relaciones de sólido : líquido, concentraciones y cantidades fueron expresadas en base seca.

Preparación del inóculo de levadura

Para este estudio se utilizó una levadura de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 53310 (cultivo colección de la Universidad de Gotemburgo, Suecia). Las cepas se mantuvieron en platos de agar constituidos por 10 g/L de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de agar con 20 g/L de D-glucosa como un recurso de carbono adicional. La transferencia se realizó a erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio (80 mL formado por 15 g $(NH_4)_2SO_4$, 7 g KH_2PO_4, 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g de extracto de levadura en 1 600 mL de agua y 20 mL formado por 100 g de glucosa, 2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ en 400 mL de agua).[16] El crecimiento se llevó a cabo a 32 °C, con una velocidad de agitación de 145 r/min durante 24 h en condiciones aeróbicas, para una producción de biomasa de 0,225 6 g, la cual fue añadida a los procesos simultáneos de fermentación y sacarificación.

Sacarificación y fermentación simultáneas

Este proceso se realizó en reactores de 500 mL en condiciones anaerobias. La concentración de sustrato respondió a una relación de 3 % (p/v) incluyendo cantidades de enzimas, biomasa y medio nutritivo. La temperatura y velocidad de agitación fueron controladas en 37 °C y 145 r/min respectivamente. El pH inicial fue de 4,8-5 logrado mediante la adición de una disolución reguladora formada por $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ y NaOH (0,05 mol/L). Las concentraciones de las enzimas fueron las mismas declaradas para el proceso de hidrólisis enzimática. Las muestras fueron tomadas regularmente en condiciones estériles y almacenadas a –16 °C hasta ser analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación del contenido de etanol, glucosa y otros metabolitos. El rendimiento de etanol fue calculado teniendo en cuenta el contenido de glucosa inicial.

Métodos analíticos

Las concentraciones de celulosa, glucosa, etanol, glicerol, ácido succínico y ácido acético fueron determinadas en una columna de intercambio Aminex HPX-87H (Boi-Rad, USA) a 60 °C usando 5 mmol/L de H_2SO_4 a un flujo de 0,6 mL/min . Se utilizaron en serie un detector de índice de refracción (RI) (Waters 2414, Milipore, Milford, USA) y un detector de absorbancia ultravioleta (UV) a 210 nm (Waters 2487). Las concentraciones de ácido succínico y ácido acético se cuantificaron mediante detección por UV y el resto mediante espectroscopia IR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hidrólisis enzimática

El resultado del recobrado luego del pretratamiento alcalino arrojó para el residuo TD un 41 % mientras que para el residuo TE un 78 %. Por lo anterior, los experimentos de hidrólisis enzimática de materiales pretratados solo se continuaron con el residuo de elevado recobrado

(TE). Los materiales textiles pretratados alcalinamente (TEP) y sin pretratar (TESP y TDSP) fueron sometidos a un proceso de hidrólisis enzimática durante 24 h, previo al proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Este proceso de hidrólisis enzimática se realizó para prevenir problemas de transferencia de masa y calor, pues se ha demostrado que este período previo de hidrólisis disminuye la viscosidad inicial del medio al comenzar la fermentación.[12] Esta etapa también permitió llevar a cabo parte de la sacarificación a la temperatura óptima, hasta obtener una concentración de glucosa mayor que si se hubiese llevado a cabo conjuntamente en la sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). En estos procesos, la temperatura de operación fue menor y por ende, el rendimiento de la sacarificación, lo que constituye una desventaja de este modo de operación.[17] El rendimiento de dicho proceso alcanzado para el material TEP, comparado con los materiales TESP y TDSP, fue mayor (Tabla 1). Dicho comportamiento ha sido demostrado para otros materiales y otras condiciones de tratamiento, en otros estudios.[10] De esta manera, se demuestra el efecto positivo que asegura el pretratamiento, al aumentar la accesibilidad de las enzimas a la degradación de la celulosa. Comparando los rendimientos obtenidos para TESP y TDSP se pudo concluir que no hay diferencias significativas entre ellos.

Fermentación y sacarificación simultáneas

Para el análisis de la convertibilidad de los residuos textiles a etanol, se evaluó su transformación mediante la comparación de sus procesos de SFS llevados a cabo con los hidrolizados de la hidrólisis enzimática previa a la que fueron sometidos. La temperatura utilizada fue el resultado de un compromiso entre las óptimas de la fermentación y sacarificación por separado.[12] Durante el proceso la transformación de glucosa a etanol y otros metabolitos por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 53310, fue mayor respecto a la velocidad de trasformación de la celulosa a glucosa por las enzimas para ambos materiales (Fig. 1 a, b y c). En la primeras 12 h la cantidad de glucosa existente y producida fueron casi completamente consumidas y luego de las 12 h toda la glucosa formada fue convertida simultáneamente, para todos los sustratos (Fig. 1 a, b y c). Este comportamiento sugiere que el paso lento del proceso global lo constituye la hidrólisis enzimática. Por lo anterior, se puede plantear que es posible utilizar menos concentración de levadura siempre que se mantenga un buen rendimiento de la fermentación.[17] En todas las disoluciones resultantes se detectó la formación de otros metabolitos en menor porcentaje como productos de la fermentación. La concentración de ácido acético se mantuvo baja todo el tiempo, lo cual es favorable, ya que se ha reportado que el ácido acético puede tener efectos inhibidores en la fermentación.[12] El ácido acético es producido durante la fermentación y puede ser también un subproducto de la etapa de pretratamiento. Teniendo en cuenta su baja concentración durante la SFS es posible considerar que su aporte debido al pretratamiento fue prácticamente nulo, ya que no fue determinado experimentalmente en dicha etapa.

Para el material TEP la concentración de etanol alcanzada fue de 10,38 g/L a las 48 h mientras que para los materiales TESP y TDSP fue de 5,23 y 4,32 g/L respectivamente a las 120 h.

Lo anterior indicó que los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas tuvieron mayor productividad de etanol para el material pretratado (Fig. 1 a, b y c). Se pudo observar (Fig. 2), que durante las primeras 12 h el rendimiento de etanol se incrementa continuamente y luego, permanece prácticamente constante con un pequeño incremento a las 72 h para todos los sustratos. Posterior a las 72 h este permanece prácticamente constante por más de 24 h . Por tanto, mantener el proceso

Tabla 1. Rendimiento alcanzado en la hidrólisis enzimática a las 24 h .

Residual	*c(celulasa)* (FPU/g celulosa)	c(β-*glucosidasa*) (IU/g celulosa)	Rendimiento (%)
TEP	30	30	57,64 (s = 5,33)
TESP	30	30	16,71 (s = 1,33)
TDSP	30	30	16,56 (s = 0,32)

s Desviación estándar. Materiales textiles. Pretratados alcalinamente (TEP) y sin pretratar (TESP y TDSP).

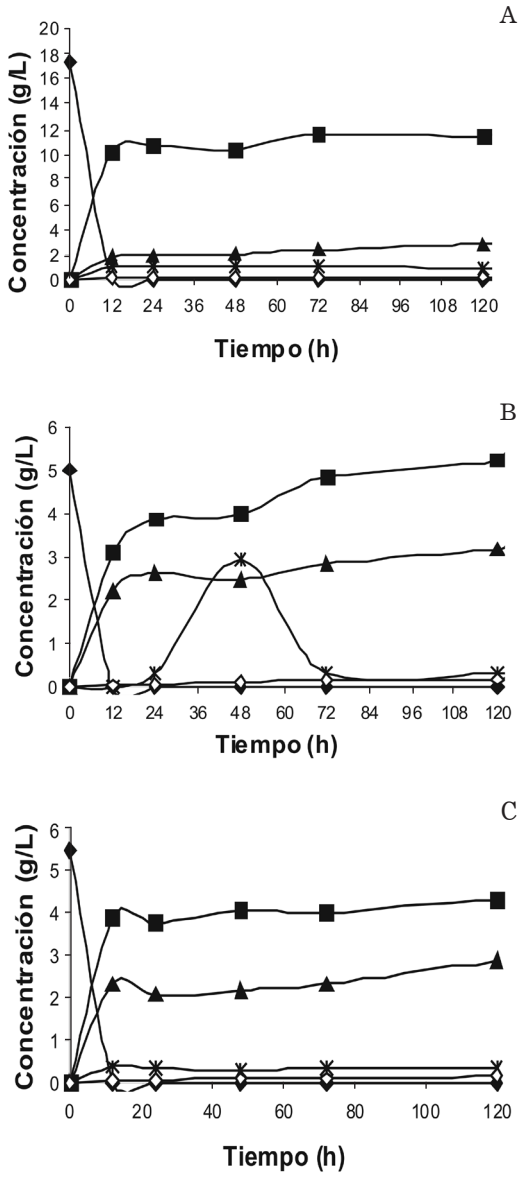

Fig. 1. *Comportamiento en el tiempo de las concentraciones de etanol, glucosa, glicerol, ácido acético y ácido succínico en los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas para A) TEP, B) TESP, C) TDSP como sustratos. (▲) Ácido succínico (■) Etanol (◊) Ácido acético (ж) Glicerol (♦) Glucosa.*

por un tiempo mayor de 72 h pudiera ser no adecuado. El rendimiento alcanzado en este tiempo para TEP, TESP y TDSP fue de 36,08; 15,36 y 17,25 % respectivamente. El valor para el material tratado es el doble que para el material sin tratar, lo cual significa que el pretratamiento previo a la SFS fue favorable.

Evaluación de la efectividad del pretratamiento alcalino

Para este análisis, se sometieron al tratamiento alcalino dos sustratos, algodón y el residuo textil TEP, bajo las mismas condiciones (Tabla 2), ya que la composición de ambos materiales es similar con elevado contenido de celulosa pura. Una vía para determinar su efectividad la constituye la evaluación de la hidrólisis enzimática de dichos sustratos a partir de la determinación de la convertibilidad a glucosa. Comparando los resultados, se comprobó que el rendimiento alcanzado para el algodón a las 24 h fue mayor que para el residuo textil. De esta manera, se aprecia que el pretratamiento alcalino fue más efectivo en el primero.

CONCLUSIONES

Del estudio de los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas de materiales textiles pretratados alcalinamente y sin pretratar se puede concluir que las concentraciones de etanol y el rendimiento de etanol resultan mayores para el caso del material pretratado. Para el sustrato TEP, la concentración de etanol en 48 h fue de 10,38 g/L, mientras que para los sustratos textiles TESP y TDSP en 120 h fue de 5,23 y 4,32 g/L respectivamente. Lo anterior demuestra la efectividad del pretratamiento alcalino en la disminución de la cristalinidad de la celulosa, la cual afecta la accesibilidad de las enzimas. Los rendimientos de etanol obtenidos a las 72 h para TEP, TESP y TDSP fueron de 36,08; 15,36 y 17,25 % respectivamente. Las condiciones del pretratamiento alcalino fueron más efectivas sobre el algodón, dado que el rendimiento alcanzado en la hidrólisis enzimática para este sustrato fue un 20,35 % mayor que para TEP. Teniendo en cuenta los resultados anteriores deben ser evaluados algunos cambios con el fin de mejorar los rendimientos, lo cual incidiría favorablemente desde el punto de vista económico. Tales cambios son: La concentración de β-glucosidasa puede ser reducida teniendo en cuenta que con SFS se disminuyen los productos inhibidores,[12] el modo de operación puede cambiarse a discontinuo alimentado con el que se logra mayor disminución de inhibidores presentes y problemas de mezcla y transferencia de calor, lo que permitiría aumentar el contenido de sólidos en el medio,[12] un cultivo previo de la levadura en el hidrolizado sería beneficioso para aumentar su productividad de etanol, ya que se adelantaría la etapa de adaptación al medio.[12]

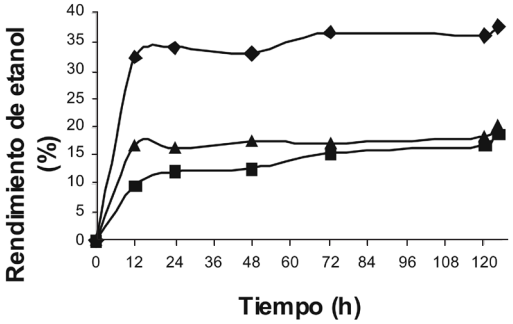

Fig. 2. *Comportamiento en el tiempo del rendimiento de etanol en los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas para el material textil en las diferentes condiciones. (▲) TDSP, (■) TESP, (♦) TEP.*

Tabla 2. Rendimiento alcanzado en la hidrólisis enzimática a las 24 h para el algodón y el residuo textil TEP.

Sustrato	c(*celulasa*) (FPU/g celulosa)	c(β-*glucosidasa*) (IU/g celulosa)	R (%)
TEP	30	30	57,64
Algodón	30	30	77,99

R Rendimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campbell CJ, Laherrere JH. The end of cheap oil. Scientific American. 1998;(3):78-83.
2. Kádár Zs, Szengyel Zs, Réczey K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol, industrial crops and products. Ind Crop Prod. 2004;20:103-110.
3. Wyman CE. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Washington DC: Taylor and Francis: 1996.
4. Macedo ID. Greenhouse gas emissions and energy balances in bioethanol production and utilization in Brazil. Biomass and Bioenergy. 1998;14(1):77-81.
5. Herryman MM, Blanco CG, Cordovés HM. Etanol carburante consideraciones ambientales, problemática internacional y posibilidades económicas en Cuba. Ciudad de La Habana, Cuba: Editorial ICIDCA: 2001.
6. Martín C, Klinke HB, Thomsen AB. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. Enzyme and Microbial Technology. 2007;40:426-432.
7. Martín C, López Y, Plasencia Y, Hernández E. Characterisation of Agricultural and Agro-Industrial Residues as Raw Materials for Ethanol Production. Chem Biochem Eng Quarterly. 2006;20(4):443-447.
8. Jeihanipour A. Taherzadeh MJ. Ethanol production from cotton-based waste textiles. Consultado: 23 de marzo de 2009. Bioresour. Technol. 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com doi:10.1016/j.biortech.2008.07.020
9. Al-Zuhair S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology. 2008;99:4078-4085.
10. Taherzadeh MJ, Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocelulosic materials: a review. BioResources. 2007;(2):472-499
11. Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. BioResources. 2007;2(4):707-738
12. Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF- an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology for Biofuels. 2008;1(7).
13. Vlasenko EY, Ding H, Labavith JM, Shoemaker SP. Evaluation of the cellobiose-fermenting yeasts in the simultaneous saccharification and fermentation of dilute acidpretreated rice straw. The 22th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Chicago, USA; 2000.
14. Ruiz R, Ehrman T. Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography. Laboratory Analytical Procedure (LAP-002); 1996.
15. Bill A. Baker J. Measurement of Cellulase Activities, Laboratory Analytical Procedure (LAP-006); 1996.
16. Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with Mucor indicus, Rhizopus oryzae, and S. cerevisiae. Enzyme Microb Technol. 2006;40:138-144.
17. Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, Lid´en G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. Enzyme and Microbial Technology. 2005;37:195-204.