

Evaluación de la producción de azúcares fermentables usando residuos de hojas de brócoli

Mariela Paola Vargas Rico^{1,3}, Ana Gabriela Díaz Rodríguez^{1,3}, Aranza Nalleli Manríquez Zúñiga^{2,3}, Francisco Gabriel Martínez Iñiguez^{1,3}, Arturo de la Cruz Bosques^{1,3}, Christian Arenas Grimaldo^{1,3}, Carlos Eduardo Molina Guerrero^{1,3*}

¹Universidad de Guanajuato, División de Ciencias e Ingenierías. Lomas del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, 37150, Guanajuato, México.

²División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Avenida Juárez No.77. Col. Centro. C.P 36000, Guanajuato, México

³Bioprocess and Bioeconomy Research Group, División de Ciencias e Ingenierías. Lomas del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, 37150, Guanajuato, México.
ce.molina@ugto.mx

Resumen

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) es una hortaliza que se comercializa en diversas regiones del mundo con una alta producción, sin embargo, los residuos que se generan representan 2/3 más respecto a lo reportado en las estadísticas, donde solamente se contabilizar la flor. Este proyecto presenta los resultados preliminares de pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación de hoja de brócoli abundantes en el estado de Guanajuato. La hoja de brócoli fue obtenida de un proceso previo de extracción de polifenoles. La hoja fue expuesta a pretratamientos ácidos con concentraciones de 0.5, 0.75 y 1 % (v/v) de ácido sulfúrico. Posteriormente, el sustrato fue expuesto al ataque enzimático a diferentes concentraciones de carga de sólido (1, 3 y 5 % w/v). Los resultados obtenidos mostraron que el pretratamiento ácido con 0.5% v/v mostró el mejor rendimiento con 0.5 mg de azúcares reductores por mL. De acuerdo con los resultados, la carga de sólidos fue de 1%. Como perspectiva futura, se realizará la optimización de cada una de estas etapas con miras a escalar el proceso. Nuestro trabajo promueve la bioeconomía circular en la región.

Palabras clave: Azúcares fermentables, Brócoli; Bioeconomía Circular.

Introducción

El aprovechamiento de residuos de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) supone un gran impacto en la región, ya que en 2020 Guanajuato fue el mayor productor de dicha hortaliza en México, con una producción de más de 500, 000 ton/año, siguiendo Puebla, Jalisco y Sonora con producciones de entre 20,000 y 50,000 ton/año [1]. Del total del brócoli, solamente el 18%, que constituye a la floreta, es aprovechado para su consumo. El 82% restante se compone de tallo 25% y hoja 57%, el cual, en el mejor de los casos es reincorporado al suelo o utilizado como alimento para ganado. Sin embargo, una gran cantidad queda en los suelos sin uso aparente. Como es sabido, el brócoli contiene moléculas de alto interés nutricional. Entre las moléculas de interés se encuentran los polifenoles los cuales poseen capacidades antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas, antivirales, neuroprotectoras, entre otras. Estas moléculas podrían ser aprovechadas en procesos farmacéuticos o alimenticios. Por otro lado, la biomasa residual del brócoli también podría ser aprovechada para la utilización de la celulosa y su posterior transformación en glucosa y otros productos de interés. Este proceso puede realizarse mediante pretratamientos termo químicos y biológicos. En materiales lignocelulósicos se emplean enzimas presentes en hongos *celulíticos*. Una enzima comúnmente empleada para este fin es de la especie *Trichoderma reesei* [2]. Según lo mostrado por Tejeda et al (2011) [3], la especie *Trichoderma reesei* realiza trabajo de modificación genética para la sobreexpresión de celulasas, entre otros factores que la hacen una enzima viable para la extracción de azúcares fermentables.

En este trabajo de investigación se planteó la utilización de *residuos de brócoli* con el fin de encontrar parámetros que nos permitan generar rutas de producción de azúcares reductores con altos rendimientos para, en un futuro, llevar el proceso a una escala mayor.

Metodología

Los reactivos utilizados en esta investigación son los siguientes: Cellic CTec2® y ácido dinitrosalicílico (DNS), ambos obtenidos de Sigma-Aldrich®, ácido cítrico anhidro, citrato de sodio y dextrosa fueron obtenidos de Jalmex®. Ácido sulfúrico concentrado, hidróxido de sodio, y tartrato de sodio-potasio. Todos los reactivos utilizados son de grado reactivo.

Preparación de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Se pesó 1g de DNS, 30 g de tartrato de Na-K y 1.6 g de hidróxido de sodio. Se colocan 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 100 mL con calentamiento y agitación. Se adiciona el tartrato de Na-K hasta disolver, posteriormente se agrega el hidróxido de sodio (reacción exotérmica) hasta disolver completamente. Una vez disuelta la solución se comienza a añadir lentamente el DNS y se mantiene en agitación hasta observar que está completamente disuelto. Se afora a 100 mL de solución [4].

Muestra

La muestra utilizada en esta investigación fue hoja de brócoli proveniente de un proceso de extracción de polifenoles desarrollada en nuestro laboratorio. Brevemente, la muestra fresca fue expuesta a una extracción etanol:agua y posteriormente fue secada. Esta última fue la muestra utilizada para los experimentos posteriores.

Pruebas de absorción de agua

Previo al pretratamiento, se realizaron pruebas de absorción de agua, para lo cual se midieron 0.5 g de biomasa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 500 mL de agua destilada periódicamente, manteniendo agitación manual constante. A partir de ello, se determinó que la biomasa previamente procesada para extracción de polifenoles absorbe 8 veces su peso en agua.

Microescala

Pretratamiento

Para el tratamiento ácido se realizaron ensayos con 0.5 g de biomasa en matraces Erlenmeyer de 250 ml al 0.5% 0.75% y 1% de ácido sulfúrico en un volumen de solución de 20 mL. El ensayo se realizó por triplicado manteniendo en termomezclador a 100 rpm por 21 horas. Posteriormente se llevó a autoclave: 121 °C/15 psi por 30 minutos.

Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada matraz por triplicado en tubos Eppendorf y centrifugaron en microcentrifuga (Labnet Prism™ R) a 23°C, 15000 x g, por 10 minutos. Se tomaron alícuotas de 50 mL del sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL adicionando 50 mL de reactivo DNS, se colocaron en baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Posteriormente se colocaron en agua fría por 5 minutos y se adicionaron 300 mL de agua destilada para facilitar la lectura en el espectrofotómetro de microplaca (Thermo Scientific™ Multiskan™ Go) a 540 nm, obteniendo así la concentración de glucosa en cada prueba expresada en mg/mL.

A la par, se realizó una curva de calibración utilizando una solución de 2 mg/mL de dextrosa anhidra haciendo diluciones seriadas de concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL por triplicado. De cada disolución se tomaron 50 mL más 50 mL de reactivo DNS. La concentración de dextrosa se llevó a cabo por el método Miller GL (1959) [5].

Hidrólisis enzimática

Este proceso se llevó a cabo adicionando 10 mL de enzima Cellic CeTec2 ® directamente en un tubo Eppendorf de 2 mL, más un porcentaje de buffer y biomasa que se describen en la Tabla 1. El procedimiento fue realizado de acuerdo a lo reportado en [6].

Evaluación de la carga de sólidos

Se realizan tres ensayos por triplicado con 1%, 3% y 5% de sólidos como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Ensayos para evaluación de carga de sólidos.

Ensayo	Biomasa (mg)	Enzima (µL)	Buffer (µL)
1%	10	10	980
3%	30	10	960
5%	50	10	940

Se mantuvieron a 50°C en termomezclador (Eppendorf ThermoMixer C™) Fig. 1, durante una hora tomando alícuotas cada 1, 5 y 60 minutos.



Figura 1. Tubos Eppendorf en equipo ThermoMixer C™ siendo procesados para hidrólisis enzimática. De izquierda a derecha se encuentran las concentraciones de 1%, 3% y 5% de sólidos por triplicado.

Una vez tomada la alícuota en tubos Eppendorf, se enfrió con agua corriente y se mezcló con 50 mL de solución DNS siguiendo el método Miller. Previo a la lectura en placa se centrifugó para asegurar que no se contamine con residuos sólidos.

Resultados

La biomasa utilizada en esta investigación fue hoja de brócoli obtenida de un proceso previo de extracción de polifenoles. La biomasa fue expuesta a un pretratamiento termoquímico a 121°C y tres diferentes concentraciones de ácido sulfúrico. La Tabla 2 muestra los resultados de los pretratamientos ensayados. Es

posible observar que el tratamiento con 0.5% de ácido sulfúrico presenta una mayor producción de azúcares reductores en comparación con los pretratamientos de 0.75 y 1%.

Tabla 2. Concentración óptima de ácido sulfúrico para la extracción de glucosa.

Concentración	Glucosa (mg/mL)
0.5%	0.5325
0.75%	0.2516
1%	0.1617

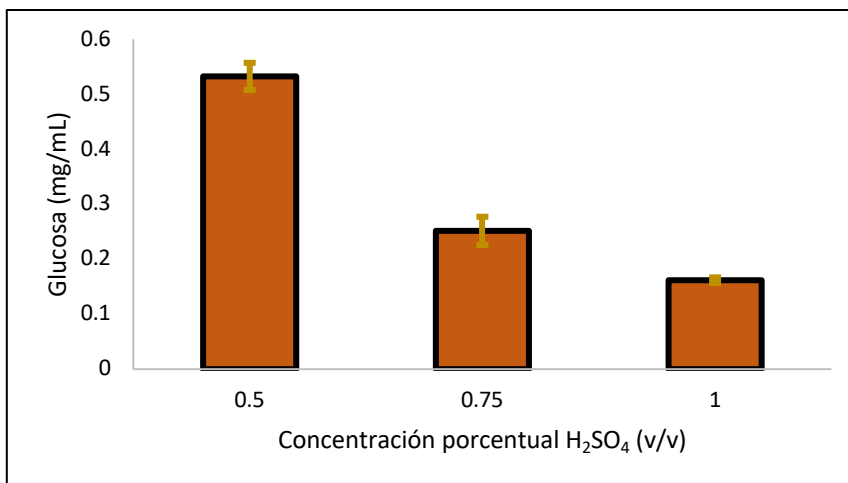


Figura 1. Concentración óptima de ácido sulfúrico para extracción de glucosa.

Según se observa en la Figura 1, el pretratamiento ácido que permite mayor extracción de azúcares reductores es a una concentración de 0.5% (v/v) de ácido sulfúrico concentrado por lo que la hidrólisis enzimática se llevó a cabo a esa concentración de ácido. Los resultados obtenidos a partir de la hidrólisis se muestran en la Tabla 3. Tabla 3. Concentración de glucosa de acuerdo con la carga de sólidos para la hidrólisis enzimática.

Tiempo (min)	Tiempo (horas)	Glucosa (mg/mL)		
		1%	3%	5%
0	0	0	0	0
1	0.016	0.265 ± 0.06	0.443 ± 0.015	0.288±0.07
5	0.083	0.427 ± 0.4	0.454 ± 0.004	0.333±0.005
60	1	0.43 ± 0.4	0.342 ± 0.10	0.345±0.004

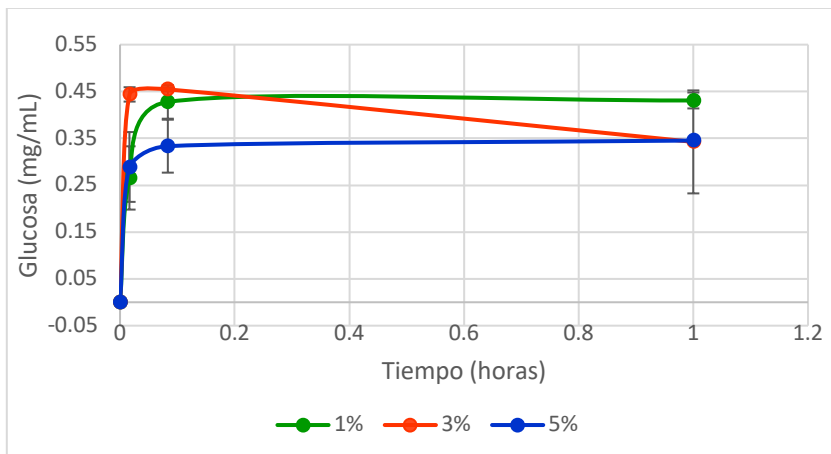


Figura 2. Concentración de glucosa generada de acuerdo con la carga de sólidos presentes en la hidrólisis enzimática.

La generación de glucosa durante la hidrólisis se observa ligeramente mayor para la carga de 3% de biomasa y la de menor generación de glucosa se observó para la carga de 5% de acuerdo en la Figura 2.

Discusión

El presente estudio muestra la relevancia de los parámetros específicos en el pretratamiento y la hidrólisis enzimática en la biomasa obtenida del brócoli. El diseño experimental se basó principalmente en evaluar la concentración de ácido sulfúrico como parte del pretratamiento y la carga de sólidos en la hidrólisis enzimática. Según los resultados obtenidos en el proceso a microescala, se obtuvo mayor producción de azúcares reductores para concentraciones de 0.5% de ácido sulfúrico, como se muestra en el Gráfico 1. Podemos observar que cuanto mayor es la concentración de ácido menor es la concentración de glucosa. En cuanto a la carga de sólidos, para el caso del 3% tenemos una rápida producción de azúcares ya que según la Tabla 3, al primer minuto de la reacción la cantidad de azúcares es casi el doble respecto a las otras concentraciones. Para los 5 minutos el aumento ocurre a una menor tasa de crecimiento y a una hora se observa un decremento, por lo que se puede tratar de errores en la medición. Para el caso del 1% se observa una tasa de crecimiento ligeramente menor con respecto a la de 3%, sin embargo, se mantiene un comportamiento ascendente por lo que el escalamiento se realizó considerando el 1% de sólidos. Respecto a la carga de 5% de sólidos, como es posible observar en el Gráfico 3, se tiene menor producción de azúcares reductores, se cree que una posible causa es la respuesta inhibitoria de la hidrólisis enzimática por parte de la biomasa. Sin embargo, es necesario realizar el pretratamiento ácido a diferentes tiempos, por ejemplo 15, 30 y 60 minutos, tal como se sugiere en [7] para tener certeza respecto a la acción inhibitoria a dicha concentración.

Conclusiones

Este trabajo ha permitido obtener resultados preliminares para la optimización de la sacarificación de residuos de brócoli. Los parámetros que se evaluaron fueron concentración de ácido sulfúrico como pretratamiento y la carga óptima de sólidos durante la hidrólisis enzimática. Sin embargo, el área de oportunidad de ofrecer este estudio se encuentra principalmente en aumentar el tiempo de hidrólisis y como observación adicional, contar con un instrumento de filtrado de microporo para asegurar una correcta lectura de las alícuotas tomadas del termo-mezclador Eppendorf. El seguimiento de este estudio permitirá obtener un protocolo de obtención de azúcares reductores a partir de residuos de brócoli siendo así viable para el escalamiento a nivel industrial.

Bibliografía

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2020). Panorama Agroalimentario 2020. Edición 2020. Ciudad de México.
- Wojtusik Wojtusik, M. (2018). Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos.
- Tejeda, L., Quintana, J., Pérez, J., & Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 111-116.
- Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 45-50.
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31:426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Rojas Pérez, L. C. (2012). Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.
- González-Chavez, J., Arenas-Grimaldo, C., Amaya-Delgado, L., Vázquez-Núñez, E., Suarez-Vázquez, S., Cruz-López, A., Segovia-Hernández, J., Pérez-Vega, S., Molina- Guerrero, C. (2022/4/1). Sotol bagasse (*Dasyliirion* sp.) as a novel feedstock to produce bioethanol 2G: Bioprocess design and biomass characterization . *Industrial Crops & Products*, 178, 114571.