

**Producción de bioetanol a
partir de subproductos de la
industria vitivinícola.
Utilización de orujos de uva
blanca.**

José Andrés LINARES DÍAZ

Ingeniería en Recursos Naturales Renovables

2018

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Cuyo

Almirante Brown 500, Chacras de Coria, Mendoza

Producción de bioetanol a partir de
subproductos de la industria vitivinícola.
Utilización de orujos de uva blanca.

Autor

José Andrés LINARES DIAZ

Directora

Silvia Cristina PALADINO, Ingeniera Agrónoma Magister en
Ciencia de los Alimentos

Miembros del Comité Evaluador:

Marcelo ALBERTO, Ingeniero Agrónomo Magister en Bioestadística

María Flavia FILIPPINI, Doctora Ingeniera Agrónoma

Cecilia REBORA, Ingeniera Agrónoma Magister en Horticultura

RESUMEN

Los orujos de uva blanca conforman los principales residuos del proceso de vinificación en blanco. Mendoza, como la principal provincia vitivinícola argentina, genera alrededor de 22.000 toneladas anuales de este residuo en peso seco. Por otro lado, en la actualidad, las naftas comercializadas en la Argentina contienen un 12% de bioetanol como sustancia de corte; lo que obliga a la Provincia de Mendoza a transportar un gran volumen de este biocombustible desde distintas regiones del país para realizar el corte de naftas.

El objetivo de este trabajo fue generar bioetanol a partir de orujos de uva blanca, aplicando tratamientos térmicos, químicos y enzimáticos para degradar los polisacáridos existentes e incrementar los rendimientos de etanol del proceso.

Se emplearon orujos de uva blanca del cultivar Chardonnay, residuos de la vinificación en blanco obtenidos de la Bodega Monteviejo, ubicada en Vista Flores, Tunuyán, Mendoza; los cuales se secaron en estufa a 40°C antes de su procesamiento. Los tratamientos de hidrólisis aplicados fueron: temperatura (25°C, 55°C, 97°C), ácido sulfúrico (concentraciones comprendidas entre 1 M y 0,06 M) y enzimas pectolíticas (0,062 a 0,5 gramos de enzimas por gramo de orujo seco). Las variables evaluadas fueron: 1) azúcares reductores (método del ácido 3,5-dinitrosalicílico) y 2) alcohol etílico (método densimétrico); realizando el procesamiento estadístico de los datos por medio del análisis de la varianza con el software "Statgraphics Centurion XV".

El tratamiento de hidrólisis de los orujos que arrojó los mejores resultados, comprendió una maceración en agua destilada a 97°C durante 1 hora con la posterior adición de 0,5 gramos de pectinasas por gramo de orujo seco y un reposo a 45°C durante 20 horas. La suspensión resultante se fermentó a 28°C empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obteniendo un rendimiento en alcohol etílico de 434 litros por tonelada de orujo seco procesado.

Debido a lo observado, los orujos de uva blanca parecerían conformar una materia prima adecuada para la producción de bioetanol, presentando: un volumen considerable emitido anualmente por la Provincia de Mendoza, un elevado valor inicial de azúcares (producto del proceso de elaboración del vino blanco) y una baja dispersión en el territorio, lo que facilitaría su recolección y posterior aprovechamiento.

PALABRAS CLAVES

Bioetanol, Orujos de uva blanca, Hidrólisis de polisacáridos, Fermentación, Biocombustibles, Energías renovables.

AGRADECIMIENTOS:

En primera instancia quiero darle las gracias a mi directora de tesis, Silvia Paladino, quién desde un principio y sin siquiera conocerme me brindó todo su apoyo, tiempo y conocimiento para desarrollar este trabajo; siempre guiándome y dándome el espacio para que descubriera las cosas por mí mismo.

De igual manera agradezco a todos los integrantes de la Cátedra de Enología de la facultad; quienes me recibieron como un integrante más del equipo haciendo de mi estancia en el laboratorio un verdadero placer.

A los evaluadores de este trabajo, quienes dedicaron parte de su tiempo para observarlo y mejorarlo, intentando que el esfuerzo realizado quedara lo más fielmente representado.

A las bodegas que nos recibieron y proporcionaron los orujos de uva blanca para realizar este estudio: Bodega Monteviejo (Enólogo Diego Barrera), Cooperativa Vitivinícola San Carlos Sud, Bodegas Salentein y Bodega de la Facultad.

A mi familia, que siempre estuvo ahí para lo que necesitara.

A mis amigos y compañeros de facultad, sin los cuales no sé si podría haber llegado a este punto.

ÍNDICE DE CONTENIDO:

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	PRESENTACIÓN DEL TEMA DE ESTUDIO.....	1
1.2.	GENERACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ORUJOS DE UVA BLANCA.....	3
1.3.	OBJETIVOS	5
1.4.	HIPÓTESIS	5
1.5.	MARCO TEÓRICO.....	6
1.5.1.	Bioetanol	6
1.5.2.	Producción de bioetanol.....	6
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1.	ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	11
2.2.	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL ORUJO.....	12
2.3.	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	12
2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
2.5.	ENSAYOS PARA EVALUAR EL RENDIMIENTO EN AZÚCARES DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS	13
2.5.1.	Pretratamiento Térmico	13
2.5.2.	Pretratamiento Ácido.....	14
2.5.3.	Sacarificación o Hidrólisis Enzimática.....	15
2.6.	ENSAYOS DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN	18
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
3.1.	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL ORUJO.....	21
3.2.	ENSAYOS DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES	21
3.2.1.	Pretratamiento Térmico	21
3.2.2.	Pretratamiento ácido	24
3.2.3.	Sacarificación o Hidrólisis Enzimática.....	28
3.3.	FERMENTACIONES.....	38
3.3.1.	Ensayos de Fermentación	38
3.3.2.	Grado de aprovechamiento, por medio de la fermentación alcohólica, de los azúcares reductores liberados por el tratamiento enzimático	43
3.3.3.	Comparación de los resultados obtenidos	45

4. CONCLUSIONES.....	47
5. FUTURAS INVESTIGACIONES	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO.....	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRESENTACIÓN DEL TEMA DE ESTUDIO

En el año 2010, conforme la entrada en vigencia de la Ley Nacional 26.093/2006, todas las naftas comercializadas dentro del territorio argentino comenzaron a contener un mínimo de 5% de bioetanol. Este escenario, ayudado por una serie de medidas de promoción e impositivas, impulsó la producción de dicho biocombustible en el norte del país, a partir de la fermentación de la caña de azúcar. Pocos años después, para suplir la demanda insatisfecha de alcohol, se instalaron plantas de producción de bioetanol a partir de maíz en la región centro del país. Actualmente, por medio de la Resolución 37/2016 del Ministerio de Energía y Minería de la Nación, el porcentaje de corte obligatorio de las naftas con alcohol es del 12%. Además, el Decreto N° 543 de ese mismo año, estableció una participación equitativa del etanol de caña de azúcar y de maíz para el corte de naftas; esto con la idea de favorecer en la misma medida ambos sectores productivos. Las justificaciones de la implementación de esta normativa, sostienen que la medida se adopta tanto para diversificar la matriz energética como para ampliar la influencia de las energías renovables. En el ANEXO A, puede consultarse una gráfica que muestra la entrada en vigencia de los distintos porcentajes de corte establecido por la Ley 26.093 desde el año 2010 hasta la fecha.

Durante el año 2016, la Provincia de Mendoza ingresó más de 180.000 m³ de bioetanol desde otras provincias para realizar el corte obligatorio de naftas. Esto se debe a la inexistencia de plantas de producción de este biocombustible en Mendoza y a la presencia de la Destilería de Luján de Cuyo, quién, en el año 2016, realizó el corte del 25% de las naftas del país; consumiendo de esta forma el 25% del bioetanol ([Ministerio de Energía y Minería - República Argentina 2016](#)).

La producción de biocombustibles a partir de materias primas ligadas al mercado de alimentos (biocombustibles de primera generación), no es bien vista por algunos sectores de la sociedad civil por estar acusada de tener una serie de impactos negativos, tanto en el ámbito económico como en el ambiental. Dentro de estos impactos destacan: la alteración del precio de mercado de los alimentos básicos ([Aimaretti et al. 2012](#)) y la aceleración de la expansión agrícola hacia zonas frágiles del territorio nacional ([Di Paola y Sangalli 2009](#)). Debido a esto, en los últimos años, ha tomado protagonismo el estudio de los biocombustibles de segunda generación, aquellos derivados de descartes agroalimentarios o forestales.

De aquí se desprende el interés en este tema de estudio, el cual pretende analizar la factibilidad técnica en la producción de bioetanol a partir de uno de los residuos agroindustriales más abundantes en la Provincia de Mendoza, los orujos de uva blanca.

Los orujos de vinificaciones blancas contienen aproximadamente nueve veces más azúcares reductores que los de uva tinta ([Corbin et al. 2015](#)). Esto se debe al proceso de vinificación en blanco, en el cual el orujo se separa del mosto inmediatamente luego de ser molido, sin estar presente en la etapa de fermentación. Esto lo diferencia de la vinificación tinta, donde la fermentación ocurre con la presencia de los hollejos con la finalidad de transferir color y demás atributos sensoriales a la bebida. Este intervalo de tiempo permite que la levadura fermente los azúcares que, de otra forma, quedarían remanentes en el orujo.

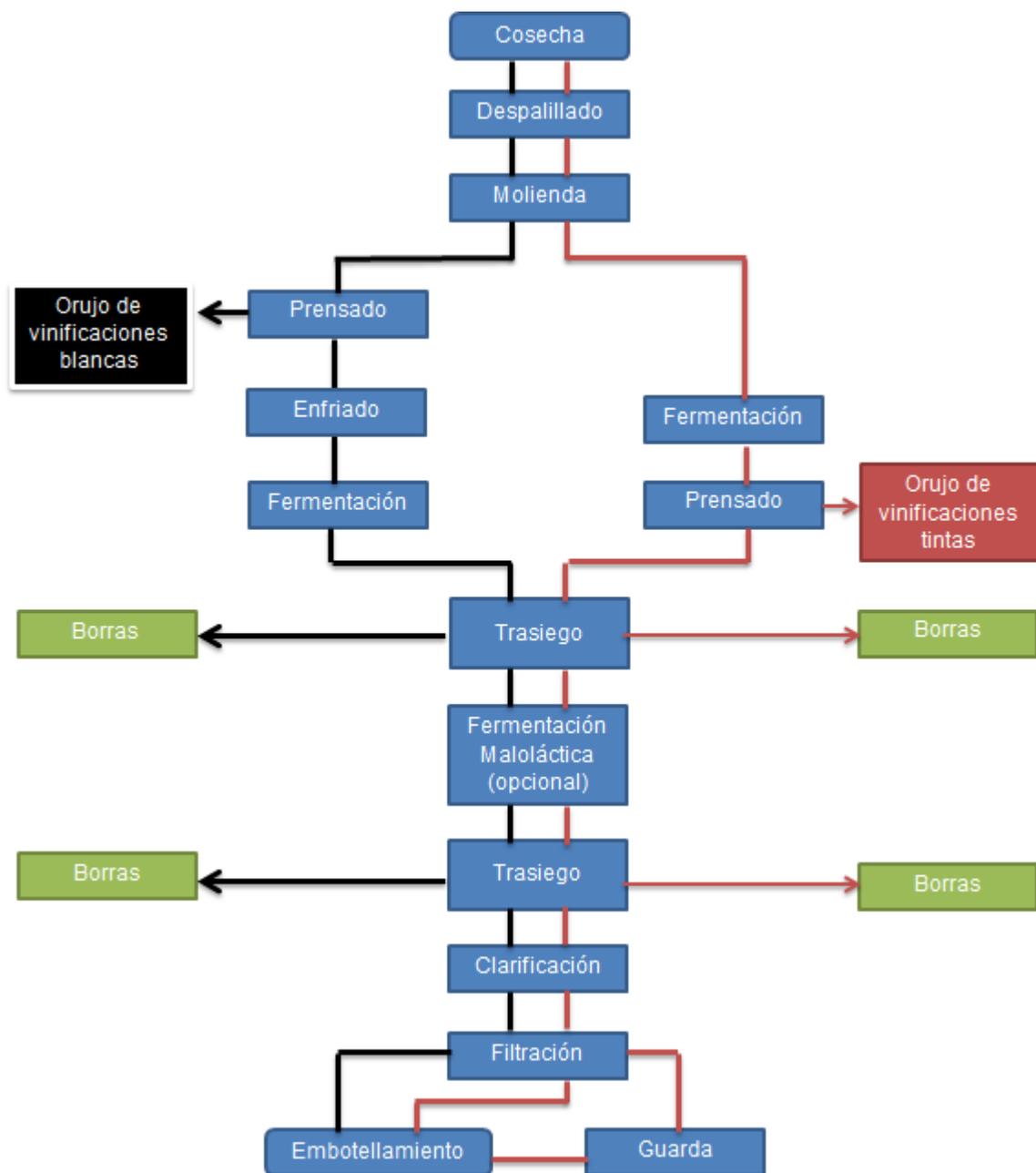


Figura 1: Diagrama simplificado del flujo de actividades de la vinificación blanca y tinta.

Fuente: modificado a partir del trabajo de Bayrak (2013)

El orujo de uva blanca está compuesto principalmente por hollejo y semillas. El hollejo conforma aproximadamente el 7% del peso del racimo y las semillas o pepitas el 4% (Boulton *et al.* 1996); cabe aclarar que estos valores varían considerablemente en función de la variedad de la planta, grado de madurez de la uva, manejo de la canopia, condiciones medioambientales y procesamiento de la uva (Corbin *et al.* 2015).

Teniendo en cuenta que en promedio se procesan 318.000 toneladas de uvas blancas al año en Mendoza para elaborar vinos y mostos (promedio de los últimos 10 años, tabla en ANEXO B - Instituto Nacional Vitivinícola 2016), y dado que el orujo conforma aproximadamente el 11% de esto (en peso seco), se puede estimar que el volumen de orujos de uva blanca disponible es de unas 35.000 toneladas secas. Cabe aclarar que estos datos, obtenidos de los informes “Cosecha y elaboración” del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), no tienen en cuenta las uvas tintas destinadas a vinificaciones en

blanco; por lo que es posible que el volumen de residuos abarcados en este trabajo sea aún mayor. De estas 35.000 toneladas de orujo de uva blanca, un 36% corresponde al peso de las semillas, las cuales podrían retirarse previamente para producción de aceite. De todas maneras, de realizarse tal clasificación, el total de hollejos de vinificaciones blancas sería superior a las 22.000 toneladas en peso seco.

Los orujos de vinificaciones blancas poseen alrededor de un 40 % de azúcares solubles en agua; carbohidratos, en su mayoría, fermentescibles por *Saccharomyces cerevisiae* (Corbin *et al.* 2015; Bayrak 2013). Por otro lado, en caso de querer aprovechar las macromoléculas existentes en los orujos para generar etanol, se debería realizar un proceso de hidrólisis de polisacáridos. Este proceso permitiría fragmentar las macromoléculas existentes liberando azúcares de menor peso molecular, capaces de ser metabolizados por los microorganismos seleccionados. La ruptura de polisacáridos puede realizarse por diferentes métodos, dentro de los cuales cabe enunciar: tratamientos mecánicos, térmicos, ácidos, oxidativos y enzimáticos.

La fermentación de este subproducto de la industria vitivinícola, además de desarrollar un beneficio económico por la generación de alcohol, facilitaría la disposición final del residuo por estabilizarlo y disminuir su volumen debido a las pérdidas por desprendimiento de CO₂, arrastre de sustancias volátiles y precipitaciones de sales (Boulton *et al.* 1996).

1.2. GENERACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ORUJOS DE UVA BLANCA

La cantidad de uva blanca procesada cada año en la provincia de Mendoza responde a diversos factores; entre ellos: el mercado nacional e internacional del vino y sus insumos; la cantidad de hectáreas implantadas con uvas blancas y el factor meteorológico. Factor, que en años particulares puede provocar grandes pérdidas en la cantidad de uva finalmente cosechada. Ejemplo de esto último es el año 2016, el cual arrojó una producción 40% menor al promedio de los últimos 10 años.

A continuación se encuentra graficada la cantidad de uva blanca procesada en la Provincia de Mendoza en los últimos 10 años y la cantidad de hectáreas con uva blanca para vinificar, tanto a nivel provincial como nacional.

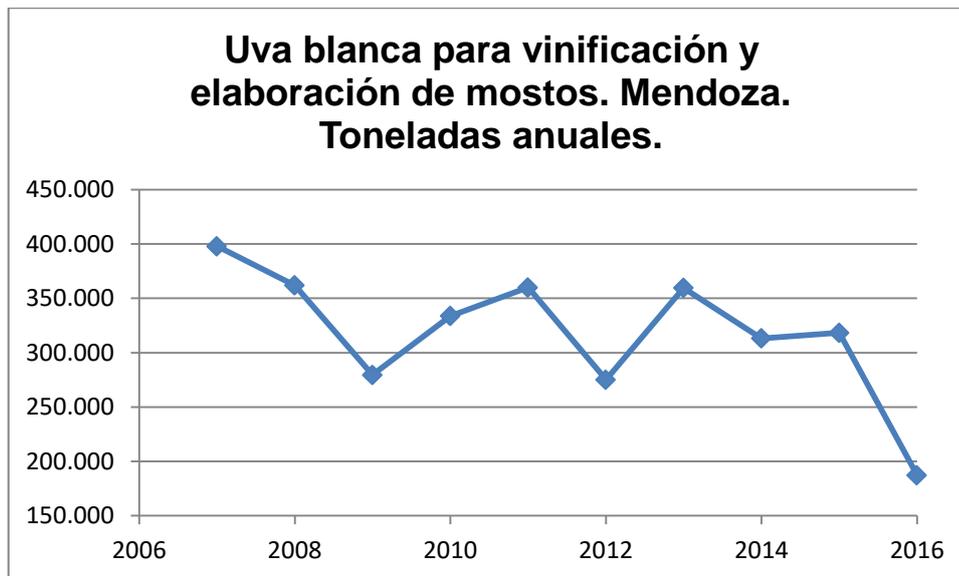


Gráfico 1: Toneladas de uvas blancas destinadas a vinificación y elaboración de mostos en la Provincia de Mendoza.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de los Anuarios Vitivinícolas del INV (Instituto Nacional Vitivinícola 2016). Datos del año 2006, 2009 y 2016 ausentes; datos reemplazados por el valor de uva local destinada a elaborar vinos y mostos.

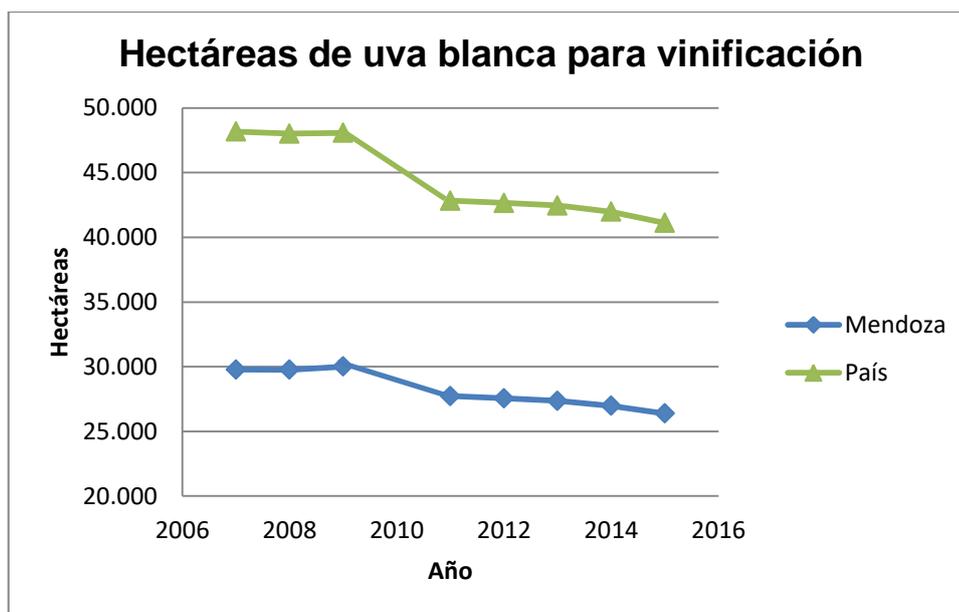


Gráfico 2: Hectáreas de uvas blancas para vinificación en la Provincia de Mendoza y en la República Argentina.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de los anuarios vitivinícolas del INV (Instituto Nacional Vitivinícola 2016): Superficie según variedad de uva implantada. Datos del año 2016 y 2010 faltantes.

Como se observa en el gráfico 2, la cantidad de uva blanca implantada ha variado de forma negativa tanto a nivel nacional como provincial, disminuyendo entre los años 2007 y 2016 un 14% y un 11% respectivamente. Por otro lado, el orujo de uva blanca es un recurso fuertemente concentrado en la Zona Este-Centro del territorio provincial (Maipú, San Martín, Junín, Rivadavia), lo que constituye un beneficio en caso de resultar una materia prima adecuada para la generación de bioetanol. Los residuos agroindustriales tienen un bajo valor de mercado; por lo que su costo real de adquirirlos está dado, en su mayoría, por el costo de recolección y transporte. La zona Este-Centro de Mendoza produce el 65% de los

vinos blancos de la Provincia, y por lo tanto, genera el 65% de los orujos de uva blanca (tabla en el ANEXO C).

También se consideró relevante analizar la producción de mosto sulfitado de uva blanca; actividad que genera un residuo de las mismas características al de la vinificación en blanco, y en proporciones similares (ANEXO C). El mosto sulfitado es el líquido que se obtiene del prensado de la uva, al cual se le adiciona metabisulfito de potasio o dióxido de azufre para su conservación (Ley Nacional N° 14.878/59). Este producto es utilizado como edulcorante natural de bebidas, alimentos y productos medicinales. Al igual que en el caso del vino blanco, la producción del mosto sulfitado de uva blanca está concentrada en la zona Este-Centro de la Provincia, la cual produce el 73% de los mostos en promedio (ANEXO C). Teniendo en cuenta estos datos, se puede considerar a los orujos de blanca como un subproducto con baja dispersión en el territorio; lo que facilitaría su procesamiento para la generación de bioetanol.

1.3. OBJETIVOS

Objetivo General

Aportar conocimiento al aprovechamiento de los orujos de uvas blancas para la producción de bioetanol a partir de diferentes tecnologías.

Objetivos Específicos

Incrementar la cantidad de azúcares fermentescibles en orujos de uva blanca de la variedad Chardonnay (obtenidos en el año 2016 de la Bodega Monteviejo ubicada en Vista Flores, Mendoza) por medio de la implementación de tratamientos térmicos, químicos y enzimáticos para degradar los polisacáridos existentes.

Obtener etanol a partir de la fermentación de los orujos de uva blanca hidrolizados, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4. HIPÓTESIS

Es posible incrementar la concentración de azúcares fermentescibles de los orujos de uva blanca aplicando tratamientos que hidrolicen los polisacáridos presentes, mejorando, consecuentemente, el rendimiento de etanol a partir de la fermentación de este subproducto de la elaboración del vino blanco.

1.5. MARCO TEÓRICO

1.5.1. Bioetanol

La producción de etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) tiene dos rutas. La primera y más importante es la fermentativa, por medio de la transformación de azúcares por microorganismos (bioetanol). La otra ruta, sintética, es llevada a cabo a través de una reacción catalítica de hidratación de etileno (derivado del petróleo). Esta última ruta actualmente representa una pequeña cantidad del etanol consumido a nivel mundial (Cortínez Villalobos 2010); sin estar presente en el territorio nacional.

El bioetanol usado para el corte de naftas en Argentina, deriva de una solución alcohólica de etanol que sufre procesos de destilación (hasta alcanzar su punto azeotrópico: 96% de etanol) y deshidratación, logrando finalmente una pureza igual o superior al 99,4 % (Resolución 1295/2008 Secretaría de Energía de la Nación); punto en el cual también recibe el nombre de etanol anhidro (Mejía *et al.* 2006).

Cabe destacar que todo el bioetanol producido y consumido actualmente en el país es de primera generación, proveniente de la fermentación de materias primas alimenticias. Debido a las problemáticas asociadas con la generación de estos biocombustibles, y a la búsqueda constante de fuentes energéticas alternativas, son numerosos los estudios que buscan generarlo a partir de subproductos o residuos agroindustriales (bioetanol de segunda generación).

A nivel internacional, existen estudios de producción de bioetanol a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (Martínez *et al.* 2014), desechos de frutas (Tejeda *et al.* 2010; Canseco Pérez *et al.* 2010), pastos (Mateus *et al.* 2012) y otros. En el caso específico de la Provincia de Mendoza, se han realizado estudios referidos al potencial de producción de bioetanol a partir de topinambur (Lelio *et al.* 2009) y de biomasa forestal (Bustamante *et al.* 2015).

A pesar del estudio y la innovación, es poco el bioetanol de segunda generación que se produce a nivel mundial; y en el caso particular de la Argentina, no existe ninguna planta de producción de tales características inserta en el mercado de este biocombustible.

1.5.2. Producción de bioetanol

1.5.2.1. Microorganismos fermentadores

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo comúnmente utilizado para la producción de bioetanol; esto debido a sus rendimientos y a la elevada tolerancia a altas concentraciones de este compuesto (Cortínez Villalobos 2010). La levadura fermenta eficientemente los azúcares de 6 átomos de carbono (hexosas), sin ser capaz de metabolizar las pentosas. Esto se traduce en una disminución del rendimiento del proceso, cuya magnitud depende de la composición de la materia prima fermentada. En caso de querer fermentar las pentosas, se hace necesario utilizar otro microorganismo, necesitando dos tanques de fermentación distintos o realizando co-cultivos (Rueda Martín y Herrera Hernández 2006). Ejemplo de esto podría ser el uso de *S. cerevisiae* junto con la levadura *Pichia stipitis*; la cual fermenta pentosas.

Además de levaduras, bacterias gram negativas son estudiadas para la producción de etanol; en este campo toman relevancia *Zymomonas mobilis* y *Escherichia coli*. Resulta interesante señalar que mediante ingeniería genética se han creado cepas de *Escherichia*

coli capaces de fermentar tanto pentosas como hexosas (Riaño 2010). Por otro lado, *Z. mobilis* se considera como una de las alternativas más importantes en la producción de etanol a gran escala. Presenta la capacidad de tener una mayor tolerancia al alcohol, menor producción de biomasa y un mayor rendimiento de etanol en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*; esto por poseer una ruta metabólica distinta (ruta de Entner-Doudoroff) (Zhang *et al.* 1995).

Las levaduras, aunque más lentas ejecutando el proceso de fermentación, presentan una baja producción de inhibidores y una facilidad de separación después de la fermentación (Riaño 2010). Además, la propia actividad de la levadura disminuye el pH del medio; lo que reduce la posibilidad de contaminación por otros microorganismos. Estos son algunos de los motivos por los cuales *Saccharomyces* sigue siendo el microorganismo más difundido en fermentaciones industriales (Karsch *et al.* 1983).

Con respecto a los sistemas de fermentación utilizados, las fermentaciones en batch (sistema cerrado, sin reposición de nutrientes) son las más difundidas. También es posible encontrar sistemas fermentativos de ciclo continuo con reactores de células inmovilizadas (Zapata 2010) o procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SSF por sus siglas en inglés) (Zheng *et al.* 2012). Las fermentaciones en estado sólido, por otro lado, permiten realizar el proceso en ausencia de un medio líquido (Hang *et al.* 1986; Rodríguez *et al.* 2010).

1.5.2.2. Composición de los Orujos de uva blanca

La composición de los orujos de uva blanca está afectada por el porcentaje de semillas, hollejo y escobajo presente. Se estima que el 20% de la uva molida permanece luego en forma de orujo; conteniendo alrededor de un 65% de humedad (Corbin *et al.* 2015). El hollejo, o piel del grano de uva, es el constituyente más abundante de este subproducto.

El orujo de vinificaciones blancas contiene una fracción importante de azúcares simples, y otra de azúcares compuestos o polisacáridos. La primera conforma cerca del 40% del peso seco, y está integrada principalmente por fructosa y glucosa (Boulton *et al.* 1996; Corbin *et al.* 2015). La otra, se encuentra compuesta en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y pectina. La lignina es otra macromolécula presente en grandes proporciones (Bayrak 2013).

A continuación se presenta la composición química porcentual de las macromoléculas existentes en los orujos de uva blanca:

Tabla 1. Macromoléculas presentes en los orujos de uva blanca: Valores porcentuales expresados en peso seco

Polímero	Orujo de vinificaciones blancas (%)
Celulosa	9,2
Hemicelulosa	4
Pectina	5,7
Lignina	11,6
Proteína	7

Fuente: Zheng *et al.* 2012.

Celulosa

Es un polímero lineal de monómeros de glucosa (hexosa) que, al hidrolizarse, libera monosacáridos que pueden ser aprovechados fermentativamente por *S. cerevisiae*. La celulosa posee dos estructuras: una cristalina (organizada) y otra amorfa (Riaño 2010), esta última más susceptible al ataque enzimático. Las regiones cristalinas, por otro lado, necesitan ser desestabilizadas previamente mediante algún tipo de tratamiento para poder hidrolizarse (Rueda Martín y Herrera Hernández 2006).

Hemicelulosa

Es un carbohidrato complejo y heterogéneo; compuesto por pentosas, hexosas y ácidos entrelazados entre sí formando una cadena lineal ramificada (Cortínez Villalobos 2010). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, lo que otorga rigidez a la pared celular de las células vegetales (Riaño 2010).

La naturaleza de la biomasa lignocelulósica determina los azúcares con los que está conformada la hemicelulosa (Torres *et al.* 2015); los cuales pueden clasificarse en pentosanos y hexosanos en función de la proporción de azúcares con 5 o 6 átomos de carbono en su composición (Cortínez Villalobos 2010).

Pectina

Las pectinas son un grupo de polisacáridos estructuralmente complejos y diversos que abundan en la pared celular primaria y en la laminilla media de las células vegetales. Este polímero, constituido principalmente por ácido galacturónico, presenta ramificaciones que pueden albergar azúcares potencialmente fermentescibles por *S. cerevisiae* (Caffall y Mohnen 2009).

Lignina

Es el componente de naturaleza no polisacárida más abundante en las paredes celulares vegetales. Está formada por compuestos aromáticos que derivan de azúcares a los cuales se les ha extraído agua irreversiblemente (Rueda Martín y Herrera Hernández 2006).

1.5.2.3. Tratamientos destinados a la fragmentación de polisacáridos

1.5.2.3.1. Pretratamientos

Teniendo en cuenta que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* solo tiene la capacidad de fermentar monosacáridos para generar etanol, se realizan procedimientos sobre el material lignocelulósico para fragmentar los polisacáridos presentes y así, aumentar el rendimiento del proceso. Uno de los procedimientos de mayor difusión, es el de la sacarificación enzimática.

Al tener las enzimas una limitada accesibilidad a los polisacáridos, se realizan ciertos pretratamientos del material con el objetivo de: remover parte de la lignina y la hemicelulosa (compuestos que forman barreras contra el ataque enzimático), reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad del material. Si el material no fuese tratado, las fibras de celulosa (con una alta cristalinidad) resultarían impermeables al ataque enzimático por estar dentro de una matriz de hemicelulosa y rodeadas de lignina (Riaño 2010; Cortínez Villalobos 2010).

Un pretratamiento se considera adecuado cuando ([Sun y Cheng 2002](#)):

- aumenta la susceptibilidad de los polisacáridos a la hidrólisis enzimática
- conserva los azúcares originales y evita la destrucción de los liberados en el proceso
- evitar la formación de subproductos inhibidores para los procesos posteriores (hidrólisis enzimática y fermentación de azúcares)

Existen diversos pretratamientos, los cuales se clasifican en función de la forma en que atacan al material lignocelulósico: mecánicos, térmicos, químicos, físico-químicos y biológicos ([Riaño 2010](#)).

A continuación, se describen los pretratamientos a utilizar en este trabajo:

Pretratamiento Mecánico:

Consiste en la molienda del material de trabajo, ya sea en estado húmedo o seco. Esta molienda, además de aumentar la superficie de contacto del residuo lignocelulósico, es capaz de disminuir la cristalinidad y la polimerización de la celulosa ([Ferrer et al. 2002](#)); facilitando de esta forma su degradación a monómeros.

Pretratamiento Térmico:

El material se somete al efecto del agua caliente con el objetivo principal de solubilizar la hemicelulosa y aumentar la permeabilidad del material. A pesar de que la bibliografía sugiere temperaturas de trabajo entre 170°C y 230°C ([Riaño 2010](#)); en trabajos realizados sobre orujos de uva blanca se han reportado rendimientos positivos en el valor de azúcares reductores por el uso de temperaturas menores (100°C) ([Corbin et al. 2015](#)). En otro trabajo realizado sobre orujos de blanca, se utilizaron temperaturas de 80°C con el único objetivo de transferir los azúcares presentes en el orujo al medio líquido ([Bayrak 2013](#)); sin plantear la posibilidad de que la temperatura empleada fuera lo suficientemente agresiva como para liberar nuevos azúcares reductores por ruptura de polisacáridos.

Pretratamiento químico con ácido diluido:

El pretratamiento ácido es el más difundido a la hora de trabajar con materiales lignocelulósicos. Las hidrólisis ácidas se realizan comúnmente con ácido sulfúrico (H₂SO₄) o ácido clorhídrico (HCl) ([Riaño 2010](#)), donde el ácido hidroliza la celulosa y parte de la hemicelulosa; siendo capaz también de romper la matriz de lignina. De esta forma, este pretratamiento tiene la finalidad de romper polisacáridos, para liberar nuevos azúcares, y disminuir la cristalinidad de la celulosa para hacerla más permeable a un posterior ataque enzimático ([Conte et al. 2010](#)). Cabe destacar que, en la mayoría de los trabajos encontrados acerca de la utilización de orujos de vinificaciones blancas para la producción de etanol, este pretratamiento es evaluado ([Mendes et al. 2013](#); [Bayrak 2013](#); [Corbin et al. 2015](#); [Zheng et al. 2012](#); [Korkie et al. 2002](#)).

Los pretratamientos con ácidos, además de la hidrólisis, pueden desencadenar reacciones de descomposición de pentosas y hexosas dando lugar a sustancias tóxicas para la levadura como el furfural y el hidroximetilfurfural ([Bayrak 2013](#)). Para evitar este impacto negativo, pueden realizarse tratamientos ácidos en bajas concentraciones, menores al 5% v/v ([Cortínez Villalobos 2010](#)), donde se minimiza la formación de estos compuestos químicos ([Bayrak 2013](#)).

El pretratamiento con ácido diluido puede realizarse con altas temperaturas (160°C-200°C), y bajas cargas de sólidos (relación sólido:líquido de 1:20 a 1:10) o a bajas temperaturas

(120°C-160°C) en un proceso con alta carga de sólidos (1:10 a 4:10). Posterior al pretratamiento ácido, se hace necesaria la neutralización del medio para poder llevar a cabo una correcta hidrólisis enzimática y una posterior fermentación (Cortínez Villalobos 2010).

Con respecto a la implementación particular de este pretratamiento sobre los orujos de uva blanca, Bayrak (2013) hizo uso de ácido sulfúrico 1 Molar a 100°C durante 4 horas en una relación sólido:líquido (g/ml) de 1:10. Corbin (2015), por otro lado, utilizó la misma relación sólido:líquido pero con tiempos de pretratamientos, concentraciones ácidas y temperaturas distintas. De esta manera comparó los efectos del H₂SO₄ 0,5 Molar a 121°C durante 1 hora; y el H₂SO₄ 1 Molar a 100°C durante 3 horas. Ambos autores atribuyen al pretratamiento ácido un impacto positivo sobre el valor de azúcares reductores.

1.5.2.3.2. Sacarificación o hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática, comúnmente, se realiza luego de que el material ha sido pretratado por alguno de los métodos anteriormente señalados. Además de la finalidad de desagregar los polisacáridos (Ferrer *et al.* 2002), los pretratamientos permiten aumentar la susceptibilidad del material a la hidrólisis enzimática por debilitar su estructura química (Corbin *et al.* 2015) y disminuir la adsorción de enzimas hacia sitios de la lignina, lo que de otra forma afectaría el rendimiento de la sacarificación enzimática por inactivar parte de las enzimas (Conte *et al.* 2010).

En los trabajos destinados a la hidrólisis de polisacáridos en orujos de uva blanca, las enzimas más utilizadas son celulasas (Corbin *et al.* 2015; Bayrak 2013; Korkie *et al.* 2002) y pectinasas (Bayrak 2013; Korkie *et al.* 2002).

Las temperaturas a utilizar durante el período de reposo de la hidrólisis enzimática, está condicionada por la enzima utilizada. Bayrak (2013) utilizó temperaturas de 37°C o 45°C al utilizar un preparado enzimático que contenía: celulasa, pectinasa y B-glucosidasa.

Con respecto al pH, se puede indicar que para el caso de las enzimas pectolíticas con actividad Polygalacturonasa obtenidas de *Aspergillus aculeatus*, el rango se sitúa entre los valores 3 y 4,5 (Foda *et al.* 1984).

El tiempo de hidrólisis enzimática fue analizado por Corbin (2015), quién no obtuvo mejoras en el rendimiento del proceso enzimático pasadas las 12 horas de tratamiento utilizando celulasas. Bayrak (2013), por otro lado, utilizó tiempos de hidrolización de 48 horas o 124 horas teniendo la precaución de agregar, previamente, un antibiótico (penicilina) para evitar posibles contaminaciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se tomaron muestras de uvas blancas recién prensadas de la Bodega Montevejo, ubicada en Vista Flores, Tunuyán, Mendoza (latitud: -33.666818, longitud: -69.194119 (Unidades en grados decimales)). El orujo correspondía a uvas del cultivar Chardonnay obtenidas del cuadro 43 de la finca Montevejo S.A en el año 2016. Las muestras se recolectaron en recipientes plásticos de 25 litros que se guardaron a -20°C hasta la posterior utilización de los orujos ([Rubio Belizón et al. 2011](#)). El cultivar Chardonnay, junto con el cultivar Pedro Giménez, son los más utilizados en la región para vinificaciones blancas, abarcando entre los dos el 50% de las uvas blancas ingresadas a establecimientos ([Instituto Nacional Vitivinícola 2016](#)).

Al momento de ir necesitando orujo para realizar los ensayos, se fueron retirando alícuotas de esta muestra base. A estas submuestras se les retiró el escobajo y parte de las semillas (las que se encontraban fuera de los granos de uva) para luego ser secadas en estufa a 40°C hasta alcanzar peso constante ([Rubio Belizón et al. 2011](#); [Mendes et al. 2013](#)). El orujo se molió con un molinillo de café "Peabody smartchef" minutos antes de su utilización (pretratamiento mecánico).

Los ensayos destinados a evaluar el rendimiento en azúcares de los distintos tratamientos, fueron realizados sobre muestras de 1 gramo de orujo seco en tubos de vidrio de 10 ml. Por otro lado, los ensayos de fermentaciones y destilaciones (debido a la necesidad de un mayor volumen final de solución) fueron realizados en frascos de 500 ml con alícuotas de 35 gramos de orujo seco. Todos los ensayos comenzaron con una relación sólido:líquido de 1 en 10 (g/ml) ([Corbin et al. 2015](#); [Bayrak 2013](#); [Urbaneja G. et al. 1997](#); [Torres et al. 2015](#); [Mendes et al. 2013](#)).



Figura 2: Orujo de uva blanca fresco, seco y seco molido

2.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL ORUJO

Teniendo en cuenta la pérdida de peso del orujo por estar en estufa a 40°C hasta alcanzar peso constante, se pudo determinar su humedad inicial. Los resultados expuestos en este trabajo están plasmados en función de orujo seco; por lo que este valor de humedad resulta necesario en caso de querer referir los resultados obtenidos a la muestra original.

El porcentaje de humedad del orujo se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} * 100$$

2.3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Una vez finalizado el tratamiento de los orujos de uva blanca, se procedió a analizar la concentración de azúcares reductores en los hidrolizados. Es necesario aclarar que dentro del término “azúcares reductores” están incluidas tanto las hexosas (azúcares capaces de ser fermentados por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) como las pentosas no fermentescibles por *Saccharomyces cerevisiae*.

Para realizar la determinación de azúcares reductores (Gil *et al.* 2006), se trasvasaron las muestras a tubos Falcon de 15 ml; los cuales se centrifugaron (“Centrifugadora Rolco 3080 rpm”) a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se separó 1 ml del sobrenadante de la suspensión centrifugada para efectuar la serie de diluciones que permitieran realizar un análisis correcto de azúcares reductores. Estas diluciones se calcularon teniendo en cuenta los valores de glucosa (g/l) utilizados para construir la curva de calibración del método.

La determinación cuantitativa de estos azúcares se realizó por espectrofotometría a 540 nanómetros, mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar. Se utilizó un espectrofotómetro “UV-VIS Spectrum sp-2000UV” para dicha operación.

Los resultados se expresaron en gramos de azúcares reductores/litro de solución, solución que hace referencia a la suspensión generada a partir de 1 parte de orujo seco y 10 partes de solvente (agua o ácido). En el ANEXO D se puede consultar acerca del modo de preparación del reactivo, la fundamentación del método DNS, el procedimiento empleado para la construcción de las curvas de calibración y la forma de interpretación del valor de absorbancia obtenido del espectrofotómetro.

A continuación se enumeran los pasos realizados al momento de llevar a cabo una determinación de azúcares reductores con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Gil *et al.* 2006):

- Se toma 0,5 ml de la muestra previamente diluida y se le agrega 0,5 ml de reactivo DNS.
- Se prepara una muestra blanco por dilución de 0,5 ml de agua destilada y 0,5 ml del reactivo DNS.
- Se agitan todas las muestras.

- Se colocan las muestras a ebullición por 5 minutos.
- Se enfrían con agua a temperatura ambiente.
- Se enfrían con hielo.
- Se les adiciona 5 ml de agua destilada.
- Se agitan las muestras y se dejan en reposo 15 minutos.
- Se hacen las lecturas en espectrofotómetro a 540 nanómetros.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trabajó con un diseño estadístico completamente aleatorizado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar la confiabilidad de los resultados se realizaron análisis de la varianza con el software “Statgraphics Centurion XV”, se utilizó la prueba HSD de Tukey. El nivel de significancia empleado para realizar los análisis estadísticos fue de 0,05.

2.5. ENSAYOS PARA EVALUAR EL RENDIMIENTO EN AZÚCARES DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS

2.5.1. Pretratamiento Térmico

Para evaluar el efecto del pretratamiento térmico sobre el orujo de uva blanca seco, se utilizaron baños termoestabilizados. Las muestras de orujo se colocaron en material de vidrio, luego se agregaron 10 partes de agua, se agitaron y se colocaron en el baño durante el tiempo establecido para el ensayo. Los tubos se agitaron nuevamente cada media hora transcurrida y al finalizar el proceso.

Para los tratamientos a 97°C, se dispuso del baño termoestabilizado “Fbr by Decalab”. Los tubos se insertaron cuando el agua estaba a ebullición a presión ambiente. Para los tratamientos con temperaturas menores a la de ebullición, el baño termoestabilizado “Colora Ultra-Thermostat” permitió fijar temperaturas de trabajo precisas. Cabe resaltar que la temperatura y presión dentro de cada uno de los tubos no fue monitoreada para ninguno de los tratamientos de este estudio, de todas formas, se tuvo la precaución de no cerrar completamente la tapa de los tubos o frascos que se colocaron en los baños. El tiempo de la maceración (1 hora, 2 horas, 3 horas) empezó a transcurrir una vez que el agua del baño comenzó a hervir nuevamente. Una vez finalizada la maceración, los tubos se retiraron y sumergieron en agua a temperatura ambiente para frenar el posible efecto del pretratamiento.

Cuando se menciona que los tratamientos se realizaron a ebullición, debe aclararse que los ensayos fueron realizados en Chacras de Coria, Mendoza, Argentina (latitud: -33.005815, longitud: -68.872648 (Unidades en grados decimales)), a una altura de 910 metros sobre el nivel del mar; donde el agua tiene una temperatura de ebullición de 97°C.



Figura 3: Muestras de orujo sometidas a un pretratamiento térmico a ebullición

Los ensayos realizados para evaluar el efecto del pretratamiento térmico sobre los orujos de uva blanca fueron los siguientes:

- ***Efecto de la temperatura de maceración***

Ensayo de 3 tratamientos de 1 hora de duración: 1) agua 25°C, 2) agua 45°C y 3) agua 97°C. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- ***Efecto del tiempo de maceración***

Ensayos a ebullición

Ensayo de 3 tratamientos con agua a ebullición (97°C) a distintos tiempos de maceración: 1) una hora, 2) dos horas y 3) tres horas. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

Ensayos a temperatura ambiente

Ensayo de 5 tratamientos con agua a temperatura ambiente (25°C) a distintos tiempos de maceración: 1) una hora, 2) dos horas 3) tres horas, 4) cuatro horas y 5) cinco horas. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

2.5.2. Pretratamiento Ácido

En tubos de vidrio de 10 ml se agregó en una relación de 1:10 (g/ml) el material a tratar y ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluido. Se evaluaron soluciones ácidas de distintas concentraciones (1 Molar; 0,5 Molar; 0,25 Molar; 0,12 Molar; 0,06 Molar) a distintas temperaturas (25°C, 55°C, 97°C) y tiempos de maceración (1 hora, 3 horas) siguiendo el procedimiento empleado para el tratamiento térmico. Los tubos se agitaron manualmente cada 30 minutos durante el período de maceración, al igual que con las maceraciones con agua.



Figura 4: Muestras de orujo sometidas a un pretratamiento ácido a 55°C

Los ensayos realizados para evaluar el efecto del pretratamiento ácido sobre los orujos de uva blanca fueron los siguientes:

- **Ácido Sulfúrico 0,5 Molar y 1 Molar**

Ensayo de 3 tratamientos de 1 hora de duración a 97°C macerados con distintos solventes: 1) agua, 2) ácido sulfúrico 0,5 Molar y 3) ácido sulfúrico 1 Molar. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- **Ácido Sulfúrico 1 Molar: variación del tiempo de maceración**

Ensayo de 2 tratamientos con ácido sulfúrico 1 Molar a 97°C con distintos tiempos de maceración: 1) una hora y 2) dos horas. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- **Ácido Sulfúrico 1 Molar: variación de la temperatura de maceración**

Ensayo de 3 tratamientos con ácido sulfúrico 1 Molar con variación de la temperatura de maceración: 1) 25°C, 2) 55°C y 3) 97°C. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- **Ácido Sulfúrico de menor molaridad**

Ensayo de 4 tratamientos a ebullición (97°C) de 1 hora de duración con distintos solventes: 1) agua, 2) ácido sulfúrico 0,06 Molar, 3) ácido sulfúrico 0,12 y 4) ácido sulfúrico 0,25 Molar. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

2.5.3. Sacarificación o Hidrólisis Enzimática

Para el tratamiento enzimático se utilizaron pectinasas de uso industrial. La enzima utilizada fue "Ultrazym Premium DX", usada en enología con distintas finalidades, la cual contaba con una actividad poligalacturonasa de 11992 PGU/g.

La temperatura de los tratamientos se fijó inicialmente en 45°C teniendo en cuenta la temperatura mínima y máxima de funcionamiento de la enzima, situada en 5°C y 55°C respectivamente.

El pH de la solución generada a partir de 1 gramo de orujo y 10 partes de agua tuvo un valor de 3,7 en promedio; por lo que no hizo falta ajustarlo para un correcto funcionamiento de la enzima pectolítica (según las especificaciones técnicas de esta).

La cantidad de enzima utilizada, en un comienzo, fue de 0,125 gramos de pectinasa por gramo de orujo seco. La enzima se hidrató 15 minutos antes de ser adicionada con 10 partes de agua destilada (g/ml).

La duración del tratamiento enzimático se estableció inicialmente en 20 horas. Los tratamientos se agitaron durante el periodo de maceración cada 30 minutos, para luego ser dejados en reposo sin agitación a la temperatura y tiempos establecidos para la hidrólisis enzimática.

En todos los ensayos enzimáticos realizados, se agregó 1 ml del preparado enzimático por cada gramo de orujo seco; agregándose en su reemplazo 1 ml de agua destilada para los tratamientos testigos o sin enzimas.

Los ensayos realizados para evaluar el efecto del tratamiento enzimático sobre los orujos de uva blanca fueron los siguientes:

- *Ensayo exploratorio: efecto de la enzima pectolítica sobre el rendimiento azucarino*

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración y un tiempo de reposo de 20 horas a 45°C con la previa adición de: 1) 1 ml de preparado enzimático (0,125 g de enzima/g de orujo seco) y 2) 1 ml de agua destilada. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

A) Ensayos destinados a evaluar el efecto del tipo de pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática

● **Pretratamiento Térmico**

- *Tiempos de maceración*

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático (0,125 g de enzima/g de orujo seco) con un tiempo de reposo de 20 horas a 45°C: 1) maceración de 1 hora de duración y 2) maceración de 2 horas de duración. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- *Temperatura de maceración*

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones de 1 hora de duración con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático (0,125 g de enzima/g de orujo seco) con un tiempo de reposo de 20 horas a 45°C: 1) maceración a 25°C y 2) maceración a 97°C. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

● **Pretratamiento Ácido**

- *Hidrólisis Enzimática con previo Pretratamiento Ácido*

En el caso de haber realizado una hidrólisis ácida anterior, se hizo necesario el ajuste del pH de la solución a 3,7 mediante el uso de hidróxido de sodio (NaOH) al 20%. Para esto se utilizó un "pHmetro Adwa ad1030".

Para evaluar el efecto del tratamiento enzimático con previo pretratamiento ácido sobre los orujos de uva blanca, se realizó el siguiente ensayo:

Ensayo de 4 tratamientos con maceraciones a 97°C de 1 hora de duración con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático (0,125 g de enzima/ g de orujo seco) y un período de reposo a 45°C: 1) maceración con agua, 2) maceración con ácido sulfúrico 0,06 Molar, 3) maceración con ácido sulfúrico 0,12 Molar, 4) maceración con ácido sulfúrico 0,25 Molar. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

B) Ensayos de optimización de las variables adoptadas para el proceso de hidrólisis enzimática

- Hidrólisis enzimática sobre extracto (fracción líquida) o sobre suspensión sólido-líquida.

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración con la posterior adición de una solución de enzimas (0,125 g de enzima/10 ml de agua) y reposo por 20 horas a 45°C: 1) aplicación del preparado enzimático sobre la fracción líquida resultante del proceso de maceración y 2) aplicación del preparado enzimático sobre la suspensión sólido-líquida de orujos y agua resultante del proceso de maceración. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

Para poder trabajar con la fase líquida únicamente, se centrifugaron las muestras para, posteriormente, tomar 5 ml del sobrenadante. Se agregó únicamente 0,5 ml de la solución enzimática en estos tratamientos por trabajar con la mitad del hidrolizado original conformado por 1 gramo de orujo y 10 ml de agua. Por otro lado, el triplicado con presencia de la fase sólida y líquida, se hidrolizó con 1 ml del preparado enzimático como en los ensayos anteriores.

- Variación de la temperatura del proceso de sacarificación

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático (0,125 g de enzima/g de orujo seco): 1) sacarificación enzimática con un reposo de 20 horas a 45°C y 2) sacarificación enzimática con un reposo de 20 horas a 20°C. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- Variación en la cantidad de enzima utilizada.

Disminución de la cantidad de enzimas aplicadas

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático y reposo por 20 horas a 45°C: 1) preparado enzimático de 0,125 g de enzima/g de orujo seco y 2) preparado enzimático de 0,062 g de enzima/g de orujo seco. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

Aumento de la cantidad de enzimas aplicadas (tratamiento de 6 horas):

Ensayo de 4 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático y un período de reposo de 6 horas a 45°C: 1) preparado enzimático de 0,125 g de enzima/g de orujo seco, 2) preparado enzimático de 0,187 g de enzima/g de orujo seco, 3) preparado enzimático de 0,250 g de enzima/g de orujo seco y 4) preparado enzimático de 0,375 g de enzima/g de orujo seco.

Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- ***Variación del tiempo de reposo***

Ensayo de 3 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) por 1 hora con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático (0,500 g de enzima/g de orujo seco) y un período de reposo a 45°C de: 1) 2 horas, 2) 6 horas y 3) 20 horas. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- ***Efecto de la agitación***

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración con la posterior adición de 1 ml de preparado enzimático (0,062 g de enzima/ g de orujo seco) y reposo por 2 horas a 45°C: 1) sin agitación durante el período de reposo y 2) agitación cada 30 minutos durante las 2 horas de hidrólisis enzimática. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

- ***Rendimiento azucarino del proceso enzimático con variables ajustadas***

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones a ebullición (97°C) de 1 hora de duración y un tiempo de reposo de 20 horas a 45°C con la previa adición de: 1) 1 ml de preparado enzimático (0,500 g de enzima/g de orujo seco) y 2) 1 ml de agua destilada. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y la variable respuesta fue la concentración de azúcares reductores.

2.6. ENSAYOS DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN

Teniendo en cuenta que el alcohol etílico proviene de la fermentación alcohólica de los azúcares presente en el medio, se realizaron fermentaciones de los tratamientos que arrojaron los mejores resultados de azúcares reductores.

Para realizar una correcta cuantificación del alcohol generado, se hizo necesario obtener un volumen final de fermentado superior o igual a los 200 ml. Debido a esto, se dejaron de lado los tratamientos con 1 gramos de orujo seco en tubos de vidrio de 10 ml para trabajar con muestras de 35 gramos de orujo seco en frascos de 500 ml. La proporción sólido:líquido utilizada permaneció invariable, 1:10, por lo que una vez molido el orujo de uva blanca se adicionó 350 ml de agua en los frascos de vidrio.



Figura 5: Tratamientos en frascos de 350 ml que han finalizado el proceso de maceración a 97°C

Se utilizaron levaduras secas de la marca “Levuline LUMAI” *Saccharomyces cerevisiae* galactosa negativa; las cuales se hidrataron en una relación de 1 g de levadura seca / 10 ml de agua a 38°C-42°C durante 15 minutos.

Una vez finalizado el tratamiento de los orujos de uva blanca a fermentar, la suspensión de orujos y agua se filtró para retirar los sólidos y, asegurar de esta manera, que no se siguieran liberando azúcares nuevos al medio durante la etapa de fermentación. La solución resultante se trasvasó a erlenmeyers de 500 ml y, antes de comenzar el proceso de fermentación, se retiró una alícuota de 5 ml para determinar la cantidad de azúcares reductores con que iniciaba el proceso fermentativo.

Se adicionó levadura en una relación de 0,5 gramos / litro de solución y se suplementaron los siguientes nutrientes para asegurar un correcto desempeño del microorganismo fermentativo (Mendes *et al.* 2013):

- 2,5 gramos de extracto de levadura / litro de solución
- 2 gramos de fosfato ácido de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ / litro de solución
- 1 gramo de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ / litro de solución
- 1 gramo de sulfato de magnesio $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ / litro de solución

Tanto el volumen de levadura adicionado (2,5 ml), como los nutrientes (3 ml de cada uno), fueron considerados factores de dilución al momento de realizar el análisis de azúcares reductores.



Figura 6: Orujos hidrolizados, filtrados y trasvasados, a los cuales ya se les ha adicionado la solución de levaduras y nutrientes necesaria para desencadenar correctamente el proceso fermentativo

Luego de adicionada la levadura y los nutrientes, los tratamientos se llevaron a estufa durante 20 horas a 28°C. Concluida esta etapa, se retiró otra alícuota de 5 ml para determinar el valor de azúcares reductores finales del proceso fermentativo. Posteriormente, el fermentado se filtró con algodón y se destiló para evaluar la cantidad de alcohol generada durante el proceso. Para esta última etapa se utilizó un alcoholómetro “Fite” calibrado para trabajar a 20°C, por lo que, anteriormente, debió ajustarse la temperatura de la solución a analizar. En el ANEXO E figura el método llevado a cabo para la determinación de alcohol en forma detallada.



Figura 7: Soluciones alcohólicas obtenidas una vez finalizado el proceso de destilación

Los ensayos de fermentación realizados fueron los siguientes:

- ***Fermentación de orujos con y sin tratamiento enzimático***

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones en agua a 97°C por 1 hora de duración, reposo a 45°C durante 20 horas y posterior fermentación. 1) adición de 35 ml de agua destilada al iniciar el período de reposo y 2) adición de 35 ml de solución enzimática (0,500 g de enzima/ g de orujo seco) al iniciar el período de reposo. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y las variables de respuesta fueron la concentración de azúcares reductores y el volumen de alcohol generado durante el proceso fermentativo.

- ***Fermentación con y sin presencia de orujos durante el proceso fermentativo***

Ensayo de 2 tratamientos con maceraciones en agua a 97°C por 1 hora de duración con la posterior adición de 35 ml de preparado enzimático (0,500 g de enzima/ g de orujo seco) y reposo a 45°C durante 20 horas, posterior fermentación. 1) desecho de la parte sólida del hidrolizado antes de comenzar el proceso fermentativo y 2) permanencia de la parte sólida del hidrolizado durante la fermentación. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y las variables de respuesta fueron la concentración de azúcares reductores y el volumen de alcohol generado durante el proceso fermentativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL ORUJO

La humedad de los orujos de uva blanca arrojó un valor promedio de 64%, coincidiendo con los resultados obtenidos por Corbin (2015).

Los valores de azúcares reductores de los ensayos expuestos a continuación, se encuentran expresados en peso seco, siendo capaz de referirlos a la muestra original húmeda al afectarlos por el factor de conversión de 0,36. Este mismo factor, también es aplicable para referir los rendimientos de etanol a la muestra original. Por último cabe señalar, que los valores de azúcares reductores (se afecten o no por el coeficiente de 0,36) siempre serán los obtenidos a partir de la suspensión de 1 parte de orujo (seco o húmedo) y 10 partes de solvente (g/ml).

3.2. ENSAYOS DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES

3.2.1. Pretratamiento Térmico

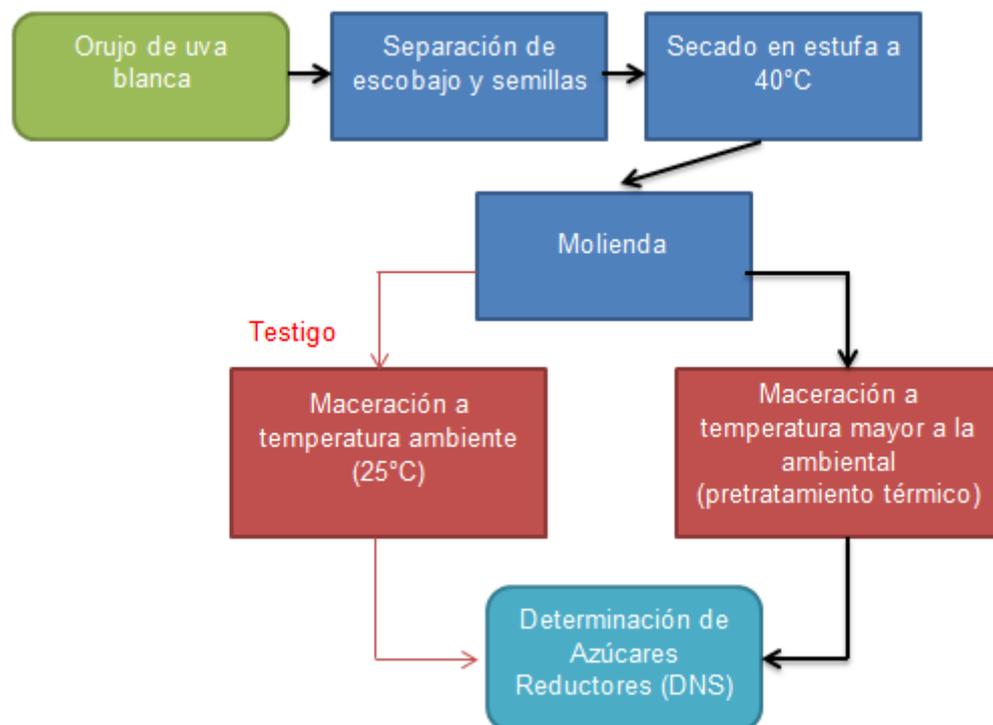


Figura 8: Diagrama de flujo simplificado para evaluar el pretratamiento térmico

3.2.1.1. Efecto de la temperatura de maceración

Se realizó un ensayo con tres tratamientos de 1 hora de duración: 1) agua 25°C, 2) agua 45°C y 3) agua 97°C. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 2. Temperatura de maceración: Efecto de la temperatura de maceración (25°C, 45°C y 97°C) sobre la cantidad de azúcares reductores, maceraciones con agua durante 1 hora.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Agua 25°C	37,52 (a)
Agua 45°C	37,94 (a)
Agua 97°C	39,65 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

El pretratamiento con agua a 97°C durante 1 hora extrajo mayor cantidad de azúcares reductores que los realizados a 25°C y 45°C durante el mismo período de tiempo. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Corbin (2015); donde el 85% de la glucosa total de los orujos de uva blanca pudo extraerse por medio de un tratamiento de 3 horas con agua a 100°C. A raíz de los resultados obtenidos, Corbin estima que la celulosa de los orujos de uva blanca parecería estar poco estructurada y, por lo tanto, más permeable a procesos de hidrólisis.

Por otro lado, el incremento en el valor de azúcares reductores observado, también podría explicarse desde el punto de vista de un aumento en la velocidad de solubilización de los azúcares, por haber incrementado la temperatura. Esta última suposición se relaciona con lo realizado por Bayrak (2013) en su estudio, donde se utilizó agua a 80°C con el único objetivo de solubilizar los azúcares; contrastando de esta manera con el planteo de la liberación de nuevos azúcares por fragmentación de polisacáridos.

3.2.1.2. Efecto del tiempo de maceración

Ensayos a ebullición:

Se realizaron extracciones de azúcares con agua a ebullición (97°C) con duraciones de 1 hora, 2 horas y 3 horas.

Tabla 3. Tiempo de maceración a 97°C: Efecto del tiempo de maceración (1 hora, 2 horas y 3 horas) sobre la cantidad de azúcares reductores, maceraciones con agua a 97°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
1 hora	43,19 (a)
2 horas	42,76 (a)
3 horas	44,71 (a)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

El hecho de aumentar el tiempo de maceración no reportó mayores beneficios para los tratamientos a ebullición. Es evidente que el efecto del pretratamiento térmico, sobre la cantidad de azúcares reductores contabilizados, se logra completamente durante la primera hora de macerado a esta temperatura.

Ensayos a temperatura ambiente:

Se observó la posibilidad de mejorar el rendimiento de extracción de azúcares reductores a 25°C por medio de la extensión del período de maceración. De obtener resultados positivos y similares a los arrojados por la maceración a 97°C por una hora; podría mejorarse la eficiencia energética del proceso al utilizar maceraciones a baja temperatura por un mayor tiempo.

Tabla 4. Tiempo de maceración a 25°C: Efecto del tiempo de maceración (1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas y 5 horas) sobre la cantidad de azúcares reductores, maceraciones con agua a 25°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
1 hora	36,24 (a)
2 horas	37,65 (b)
3 horas	37,16 (a) (b)
4 horas	37,23 (a) (b)
5 horas	37,23 (a) (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre macerar 1 hora y macerar 2 horas a 25°C; sin observar diferencias entre el tratamiento de 1 hora con los realizados durante, 3, 4 y 5 horas. Esto muestra que la diferencia que puede llegar a existir por modificar la duración de la maceración a 25°C es baja dentro de los tiempos considerados. El hecho de quintuplicar el tiempo de tratamiento arrojó un incremento de solamente un 0,3% en el valor azucarino.

Dado el bajo impacto del factor temporal en la extracción de azúcares a 25°C, puede suponerse que la mejora en el rendimiento por realizar maceraciones a 97°C, no se debe a un aumento de la velocidad de solubilización de los azúcares por efecto de la temperatura. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Corbin (2015), este incremento en la concentración de azúcares parecería deberse a la ruptura de algún polisacárido presente en los orujos de uva blanca.

3.2.2. Pretratamiento ácido

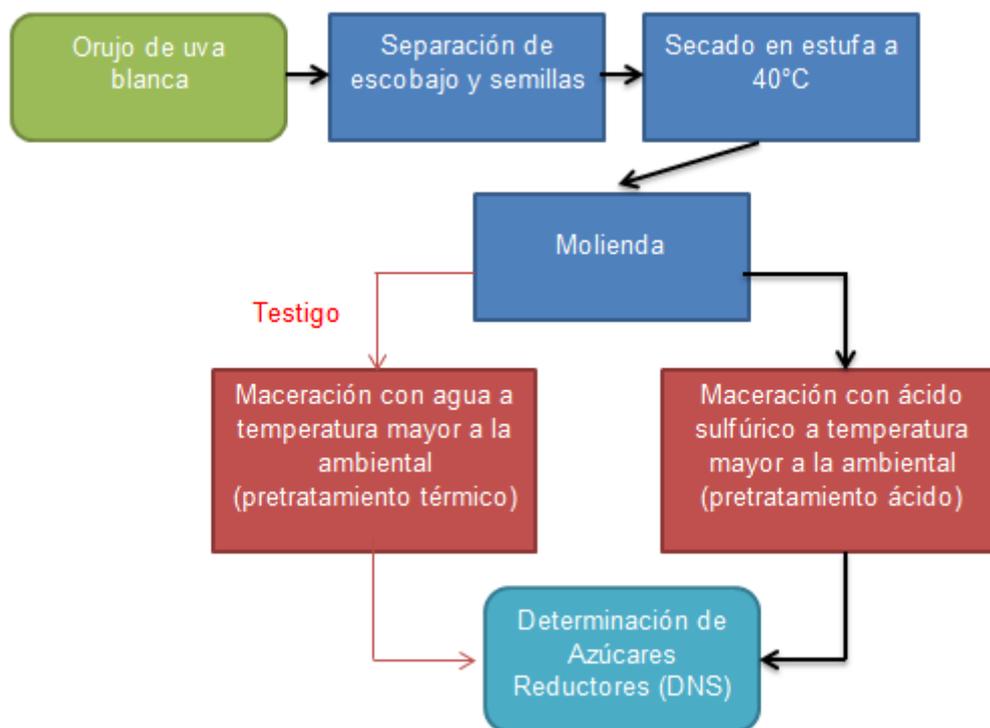


Figura 9: Diagrama de flujo simplificado para evaluar el pretratamiento ácido

A diferencia del pretratamiento térmico, la fracción líquida con la cual se hidrató el orujo seco inicialmente fue ocupada por ácido sulfúrico de distintas molaridades. En un principio se evaluaron las concentraciones ácidas 1 Molar y 0,5 Molar por ser las comúnmente utilizadas en otros estudios realizados sobre orujos de uva blanca (Corbin *et al.* 2015; Bayrak 2013; Ferrer *et al.* 2002).

3.2.2.1. Ácido Sulfúrico 0,5 Molar y 1 Molar

Maceraciones con ácido sulfúrico se compararon con maceraciones con agua en función de su capacidad de extracción de azúcares. La temperatura elegida para el ensayo fue de 97°C y el tiempo de maceración de 1 hora. Las molaridades evaluadas fueron: 0,5 Molar y 1 Molar.

Tabla 5. Efecto de distintos solventes: Efecto de diferentes solventes (agua, ácido sulfúrico 0,5 Molar y ácido sulfúrico 1 Molar) sobre la cantidad de azúcares reductores, macerando 1 hora a 97°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Agua	42,58 (a)
H ₂ SO ₄ 0,5 Molar	39,08 (b)
H ₂ SO ₄ 1 Molar	33,92 (c)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Se identificó un impacto negativo sobre el valor de azúcares reductores por el uso de ácido sulfúrico. Dicho efecto parecería incrementarse al utilizar concentraciones ácidas de mayor molaridad, lo que se observa al comparar el tratamiento 0,5 Molar y 1 Molar.

Los resultados obtenidos pueden interpretarse teniendo en cuenta lo concluido por Urbaneja (1997) al trabajar con pulpas de café; donde se observó que el ácido sulfúrico a ebullición causaba un decrecimiento en la concentración de fructosa del medio. La fructosa decrecía tanto al aumentar la concentración de ácido sulfúrico (molaridades comprendidas entre 0,05 y 0,2) como la duración del pretratamiento ácido a ebullición (tiempos de 30 a 240 minutos). Este efecto antagónico del ácido sulfúrico a ebullición, es de particular importancia al trabajar con orujos de blanca, ya que la fructosa, junto a la glucosa, son los azúcares más abundantes de este subproducto (Boulton *et al.* 1996; Corbin *et al.* 2015).

De manera similar, Zheng (2012) plantea que el pretratamiento ácido utilizado (ácido sulfúrico 0,1 Molar a 120°C durante 5 minutos) resultó demasiado severo para los orujos de vinificaciones blancas, provocando una aparente degradación de los azúcares originales. Consecuentemente, en el estudio nombrado, los orujos de blanca sometidos a pretratamientos ácidos presentaron una menor producción de etanol que los tratamientos que no se vieron expuestos a los efectos del ácido sulfúrico.

En contraposición con los resultados obtenidos, tanto Corbin (2015) como Bayrak (2013) plantean un efecto positivo sobre los azúcares reductores de los orujos de blanca al utilizar ácido sulfúrico en concentraciones y temperaturas similares a las utilizadas.

3.2.2.2. Ácido Sulfúrico 1 Molar: variación del tiempo de maceración

A pesar de los resultados negativos anteriormente expuestos, se realizó un nuevo ensayo con ácido sulfúrico 1 molar a 97°C. Se eligió esta concentración (en lugar de 0,5 M) con el objetivo de hacer más evidente el efecto negativo del ácido sobre la concentración azucarina. Los tratamientos de 1 hora de duración se compararon con otros de 2 horas de duración para observar si existía una liberación de azúcares reductores luego de la caída inicial.

Tabla 6. Tiempo de maceración: Efecto del tiempo de maceración (1 hora y 2 horas) sobre la cantidad de azúcares reductores, maceraciones con ácido sulfúrico 1 Molar a 97°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
H ₂ SO ₄ 1 hora	32,01 (a)
H ₂ SO ₄ 2 horas	28,93 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

La tabla 6 muestra la persistencia del impacto negativo del ácido a pesar de haber modificado la duración del tratamiento. Incluso puede observarse un decrecimiento del valor de azúcares reductores por aumentar el tiempo de maceración; lo que podría deberse a un incremento en la destrucción o inactivación de la fructosa como plantea Urbaneja en su estudio (Urbaneja *et al.* 1997).

3.2.2.3. *Ácido Sulfúrico 1 Molar: variación de la temperatura de maceración*

Se decidió evaluar el efecto de tratamientos con ácido sulfúrico 1 Molar a una menor temperatura, partiendo de la suposición de que la interacción entre la concentración ácida y la temperatura es la que destruye los azúcares reductores. En ensayos anteriores se ha podido observar que la temperatura por sí sola no es la causante de la destrucción de los monosacáridos, lo que se refleja claramente al comparar tratamientos macerados con agua a 25 °C y 97°C (3.2.1.1.).

Las temperaturas analizadas fueron 25°C, 55°C y 97°C. Todos los tratamientos se maceraron con ácido sulfúrico 1 Molar, siguiendo la relación sólido:líquido de 1 en 10 establecida inicialmente.

Tabla 7. Temperatura de maceración: Efecto de la temperatura de maceración (25°C, 55°C y 97°C) sobre la cantidad de azúcares reductores, maceraciones con ácido sulfúrico 1 Molar por 1 hora.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/Kg)
H ₂ SO ₄ 25 °C	37,79 (a)
H ₂ SO ₄ 55 °C	38,48 (a)
H ₂ SO ₄ 97 °C	32,01 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*medias con una letra común no son significativamente diferentes para un nivel de significancia de 0,05

Puede observarse que los tratamientos a menores temperaturas de maceración (25°C y 55°C) arrojaron mayor concentración azucarina que el realizado a ebullición; sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los dos primeros.

De esta manera, el impacto negativo del ácido sulfúrico sobre los azúcares reductores presentes en los orujos de uva blanca, parecería incrementarse tanto al aumentar la molaridad del ácido (3.2.2.1.) y la duración del pretratamiento (3.2.2.2.) (como plantea Urbaneja (1997)), como así también al aumentar la temperatura del proceso de maceración ácida.

3.2.2.4. *Ácido Sulfúrico de menor molaridad*

Dado que en la tabla 5 se observó que empleando una concentración ácida 1 Molar se obtuvo menos rendimiento azucarino que con una 0,5 Molar, se decidió trabajar con concentraciones menores para averiguar si era posible revertir el impacto negativo de las maceraciones con ácido sulfúrico. Las concentraciones utilizadas fueron seleccionadas en función de los resultados obtenidos por Cortínez (2010) para residuos forestales tratados con ácido sulfúrico diluido. Cortínez obtuvo una tasa de conversión óptima a concentraciones ácidas del 1% (v/v), lo que equivale a una solución 0,18 Molar con ácido sulfúrico.

Se comparó el rendimiento arrojado por soluciones ácidas de baja molaridad (0,06 Molar; 0,12 Molar y 0,25 Molar) con los obtenidos por maceraciones con agua. Los tratamientos fueron realizados a una temperatura de 97°C durante 1 hora.

Tabla 8. Efecto de distintos solventes-Ácidos de menor molaridad: Efecto de diferentes solventes (agua y ácido sulfúrico: 0,06 Molar, 0,12 Molar y 0,25 Molar) sobre la cantidad de azúcares reductores, macerando 1 horas a 97°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Agua	43,29 (a)
H ₂ SO ₄ 0,06 Molar	42,51 (a)
H ₂ SO ₄ 0,12 Molar	42,24 (a)
H ₂ SO ₄ 0,25 Molar	40,19 (a)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Puede observarse que las molaridades evaluadas no tuvieron un impacto negativo significativo sobre la cantidad de azúcares reductores. Tampoco se evidencia un impacto positivo que justifique el uso de este tipo de hidrólisis en los orujos de uva blanca.

A raíz de los resultados obtenidos, se decide descartar el pretratamiento ácido como un medio para provocar la liberación de nuevos azúcares reductores en los orujos de uva blanca. A pesar de esto, la bibliografía ([Corbin et al. 2015](#)) plantea que la hidrólisis ácida, además de fragmentar polisacáridos, disminuye la cristalinidad de la celulosa; lo que aumenta, consecuentemente, el rendimiento del posterior tratamiento enzimático. Este es el motivo por el cual, a pesar de no haber obtenido buenos resultados para las hidrólisis ácidas aisladas, se realizarán ensayos posteriores con el agregado de enzima.

3.2.3. Sacarificación o Hidrólisis Enzimática

3.2.3.1. Ensayo exploratorio: efecto de la enzima pectolítica sobre el rendimiento azucarino

En este primer ensayo de sacarificación, se observó el efecto del uso de enzimas pectolíticas (0,125 g de enzima/g de orujo seco) sobre orujos de uvas blancas que sufrieron un pretratamiento térmico a 97°C durante 1 hora. Este pretratamiento térmico fue seleccionado como punto de partida por haber arrojado los mejores rendimientos de manera aislada.

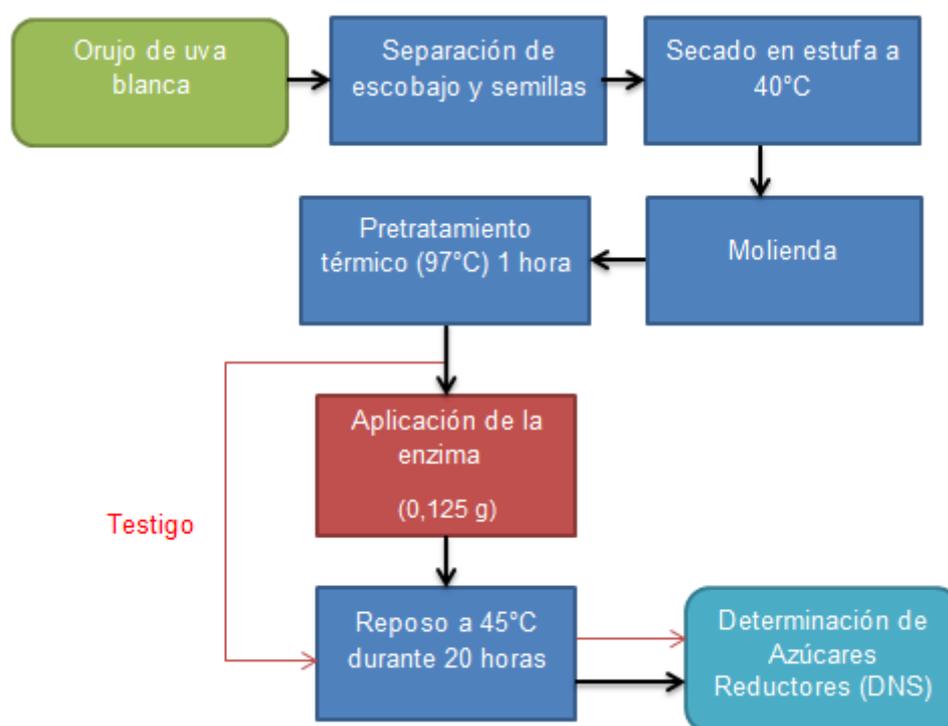


Figura 10: Diagrama de flujo simplificado para evaluar una hidrólisis enzimática con previo pretratamiento térmico

Tabla 9. Acción enzimática: Efecto del uso de enzimas pectolíticas sobre la cantidad de azúcares reductores, macerando 1 hora a 97°C con un posterior reposo de 20 horas a 45°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Sin enzimas	45,83 (a)
Con enzimas	59,21 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Finalizado el tratamiento, se observó una diferencia significativa, y de gran magnitud, por el uso de enzimas pectolíticas sobre los orujos de uva blanca secos.

Se realizaron diversos ensayos enzimáticos con la finalidad de optimizar el proceso de sacarificación. En una primera instancia, se mantuvieron constantes las variables propias del tratamiento enzimático (temperatura del proceso, duración del período de reposo,

concentración enzimática) para focalizar el estudio en el impacto de los pretratamientos en combinación con el uso de enzimas. De esta forma, es posible que un tratamiento incremente la obtención de azúcares al combinarlo con la hidrólisis enzimática (por hacer el material más susceptible al ataque enzimático), y que, por sí solo, no haya generado ningún impacto positivo cuantificable. Luego de haber seleccionado el pretratamiento que mejor se acoplaba a la hidrólisis enzimática con la pectinasa evaluada, se dispuso modificar las variables propias del tratamiento enzimático (anteriormente asumidas) hasta encontrar la combinación más adecuada de ellas. Es por esto que, los ensayos expuestos a continuación, se encuentran clasificados en dos grupos:

A) Ensayos destinados a evaluar el efecto del tipo de pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática

- **Pretratamiento Térmico**

3.2.3.2. *Tiempos de maceración*

Se compararon hidrólisis enzimáticas con distintos períodos de previa maceración con agua a 97°C. Los tiempos de maceración evaluados fueron de 1 hora y 2 horas.

Tabla 10. Tiempos de maceración: Efecto de la duración (1 hora, 2 horas) del pretratamiento térmico sobre la cantidad de azúcares reductores, macerando a 97°C con una posterior hidrólisis enzimática de 20 horas a 45°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Agua 97°C – 1 hora	59,21 (a)
Agua 97°C – 2 horas	59,67 (a)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

No se obtuvieron diferencias en el valor de azúcares reductores por variar el período de maceración térmica de 1 a 2 horas. En función de los resultados obtenidos, se puede decir que el incremento de la duración del tratamiento térmico no es necesario. El aumento del tiempo de la maceración a 97°C no liberó nuevos azúcares reductores (Ver 3.2.1.2.) ni mejoró el rendimiento de la hidrólisis enzimática como puede verse en los resultados expuestos.

3.2.3.3. *Temperatura de maceración*

Luego de observar que, para las variables seleccionadas, no hay diferencias por aumentar el tiempo del pretratamiento térmico, se evaluó el efecto de la variación de la temperatura de maceración con la misma finalidad.

De esta forma, se comparó un tratamiento enzimático con maceración a 25°C con un tratamiento enzimático con maceración a 97°C, ambos de 1 hora de duración.

Tabla 11. Temperaturas de maceración: Efecto de la temperatura de maceración (25°C y 97°C) sobre la cantidad de azúcares reductores, macerando con agua por 1 hora con una hidrólisis enzimática posterior, de 20 horas a 45°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Agua 25°C	56,97 (a)
Agua 97°C	59,21 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Maceraciones a 97°C con agua, previo al tratamiento enzimático, arrojaron mejores rendimientos de azúcares reductores que maceraciones a 25°C. A pesar de esto, dicha diferencia parecería deberse a la liberación inicial de azúcares por el pretratamiento térmico (ver resultados anteriores en 3.2.1.1.) y no a una mejora en la eficiencia del proceso enzimático. Los resultados obtenidos permiten suponer que el pretratamiento térmico a 97°C desarrollado, no mejoró la susceptibilidad de los orujos de uva blanca a la hidrólisis enzimática. De esta forma, el rendimiento de la sacarificación enzimática parecería ser indiferente a las temperaturas y tiempos de maceraciones evaluados.

La diferencia del valor de azúcares entre tratamientos macerados a 97°C y a 25°C, resulta menor al 5%; por lo que en caso de querer desarrollarse este proceso a una mayor escala, debería analizarse si se justifica el aumento de la temperatura de maceración por esta mejora. A los fines de este trabajo, se seguirá utilizando el tratamiento enzimático junto con una maceración térmica por haber arrojado resultados mayores y significativos estadísticamente.

- **Pretratamiento Ácido**

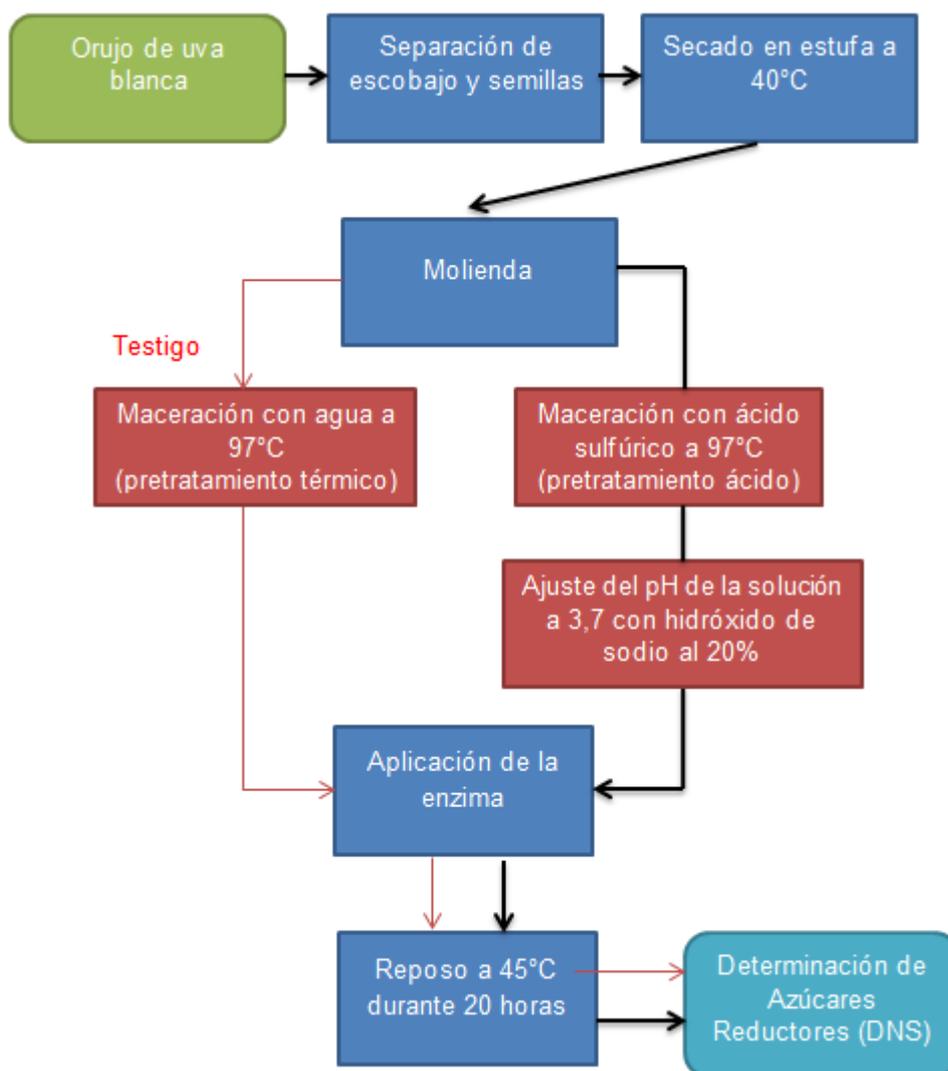


Figura 11: Diagrama de flujo simplificado para evaluar una hidrólisis enzimática con previo pretratamiento ácido

3.2.3.4. *Hidrólisis Enzimática con previo Pretratamiento Ácido*

Este ensayo se genera con el objetivo de comparar la maceración ácida con la maceración con agua y, determinar de esta forma, qué tipo de pretratamiento (térmico o ácido) resulta más adecuado para acompañar a la sacarificación enzimática. Cabe destacar que el pretratamiento ácido es el más comúnmente elegido al momento de procesar materiales lignocelulósicos para obtener bioetanol; encontrándose presente en la mayoría de los trabajos realizados sobre orujos de uva (Mendes *et al.* 2013; Bayrak 2013; Corbin *et al.* 2015; Zheng *et al.* 2012; Korkie *et al.* 2002).

Se seleccionaron aquellas molaridades de ácido sulfúrico que arrojaron los mejores resultados en el apartado de “Pretratamiento Ácido”; siendo estas las de concentraciones más bajas (0,06 Molar; 0,12 Molar y 0,25 Molar).

Tabla 12. Maceración con distintos solventes: Efecto del solvente (agua o ácido sulfúrico: 0,06 Molar, 0,12 Molar, 0,25 Molar) sobre la cantidad de azúcares reductores, macerando por 1 hora a 97°C con una posterior hidrólisis enzimática de 20 horas a 45°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Agua	63,01 (a)
H ₂ SO ₄ 0,06 Molar	61,47 (a)
H ₂ SO ₄ 0,12 Molar	61,40 (a)
H ₂ SO ₄ 0,25 Molar	60,84 (a)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Los tratamientos evaluados no arrojaron diferencias significativas entre ellos, al igual que lo observado por los tratamientos ácidos de manera aislada (3.2.2.4.). Esto permite suponer que, al igual que con el pretratamiento térmico, no se logró una mejora del rendimiento de la hidrólisis enzimática por realizar, previamente, una maceración ácida. De esta manera, parecería que ninguno de los pretratamientos evaluados en este estudio mejoró la susceptibilidad del material a la hidrólisis enzimática.

Por otro lado, bajo ninguna de las condiciones planteadas un pretratamiento ácido pudo superar el rendimiento de un pretratamiento con agua a 97°C. Debido a esto, se decide seleccionar el pretratamiento con agua a 97°C durante 1 hora para el posterior ajuste de las variables del tratamiento enzimático. Cabe destacar que los resultados obtenidos difieren con los obtenidos por Corbin (2015), quien observó una mejora del rendimiento del tratamiento enzimático por realizar anteriormente un pretratamiento ácido en lugar de uno térmico.

B) Ensayos de optimización de las variables adoptadas para el proceso de hidrólisis enzimática

Definido ya el pretratamiento, se buscó maximizar la extracción de azúcares por medio de la modificación de las variables propias del tratamiento enzimático.

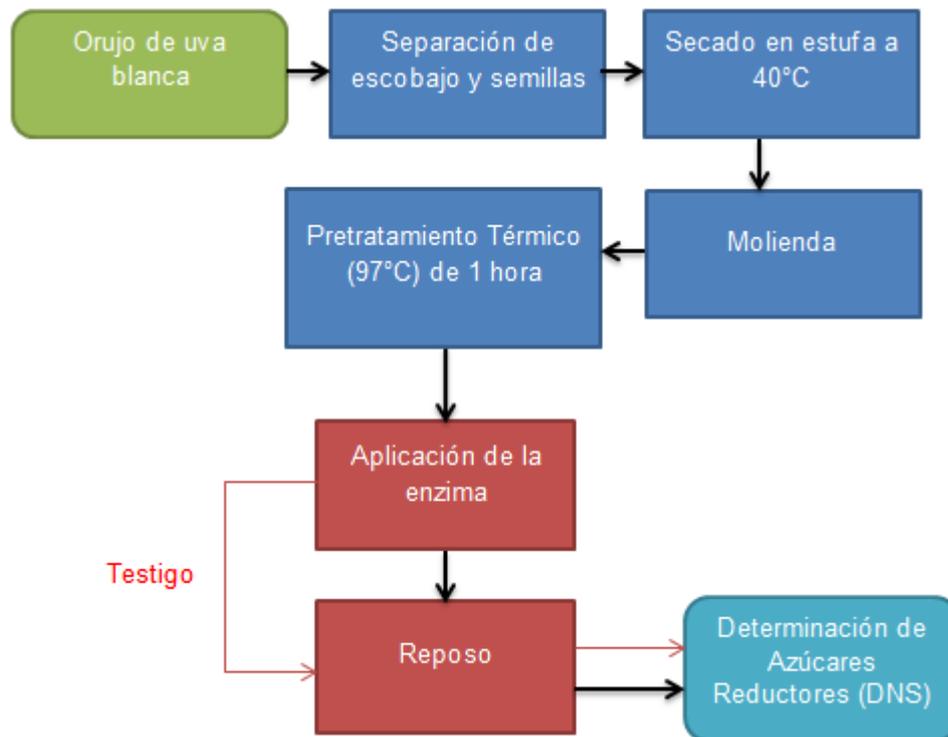


Figura 12: Diagrama de flujo simplificado para evaluar el proceso de hidrólisis enzimática

3.2.3.5. Hidrólisis enzimática sobre extracto (fracción líquida) o sobre suspensión sólida-líquida.

En los ensayos enzimáticos expuestos hasta el momento, la solución de enzimas se aplicó a la suspensión sólida-líquida de orujo y agua resultante del proceso de maceración. Esta metodología se seleccionó partiendo de la suposición de que la fracción sólida del macerado es la que contiene los polisacáridos que se pretenden fragmentar con la enzima. Por otro lado, la bibliografía (Conte *et al.* 2010) plantea la posibilidad de que la lignina presente en la fracción sólida sea responsable de disminuir la actividad de la enzima por adsorción a su superficie.

El ensayo consistió en dos tratamientos enzimáticos: 1) aplicación del preparado enzimático sobre la fracción sólida-líquida y 2) aplicación del preparado enzimático sobre la fracción líquida únicamente.

En la tabla a continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 13. Hidrólisis enzimática con y sin presencia de sólidos: Efecto sobre la cantidad de azúcares reductores por el agregado de enzimas a macerados con o sin sólidos remanentes, macerando con agua a 97° por 1 hora con una posterior hidrólisis enzimática de 20 horas a 45°C.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Suspensión sólida-líquida	48,80 (a)
Fase líquida	47,16 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Existe una diferencia significativa por realizar la hidrólisis enzimática sobre la fase líquida únicamente o sobre el total del macerado (fase líquida y fase sólida). A pesar de esto, la diferencia observada no es de gran magnitud, lo que permitiría suponer que la mayoría de los polisacáridos afectados por la pectinasa Ultrazym Premium DX, en las condiciones de trabajo establecidas, son solubles, o se transfieren a la parte líquida durante el proceso de maceración.

3.2.3.6. Variación de la temperatura del proceso de sacarificación

Se evaluó el efecto de la temperatura de reposo sobre el funcionamiento de la enzima pectolítica. La temperatura utilizada hasta el momento, 45°C, fue comparada con una temperatura menor, 20°C.

Tabla 14. Temperatura de reposo: Efecto sobre la cantidad de azúcares reductores por maceraciones con agua a 97°C por 1 hora con una posterior hidrólisis enzimática a 45°C o 20°C por 20 horas.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Reposo a 45°C	51,86 (a)
Reposo a 20°C	48,82 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Se verifica una mayor extracción de azúcares reductores a la temperatura de trabajo de 45°C; la cual fue utilizada desde un comienzo en los tratamientos enzimáticos.

3.2.3.7. Variación en la cantidad de enzima utilizada.

Los siguientes ensayos fueron realizados con el objeto de optimizar la concentración de enzima empleada.

Disminución de la cantidad de enzimas aplicadas

En una primera instancia se disminuyó la cantidad de enzima a la mitad para observar si la pectinasa estaba siendo utilizada en exceso desde un comienzo.

Tabla 15. Disminución de la cantidad de enzimas: Efecto sobre la cantidad de azúcares reductores por maceraciones con agua a 97°C por 1 hora, con un posterior reposo a 45°C por 20 horas con la adición de diferentes concentraciones enzimáticas (0,125 g de enzima/g de orujo o 0,062 g de enzima/g de orujo).

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
0,125 g de enzima/g de orujo seco	53,82 (a)
0,062 g de enzima/g de orujo seco	46,93 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Pudo observarse un decrecimiento notable en el rendimiento de la sacarificación enzimática por reducir a la mitad la cantidad de enzima aplicada.

Aumento de la cantidad de enzimas aplicadas (tratamiento de 6 horas):

Teniendo en cuenta los resultados del ensayo anterior, se procedió a experimentar con concentraciones enzimáticas mayores. Dado que se trataba de un ensayo exploratorio, se empleó un tiempo de reposo de 6 horas.

Tabla 16. Aumento de la cantidad de enzimas: Efecto sobre la cantidad de azúcares reductores por maceraciones con agua a 97°C por 1 hora, con un posterior reposo a 45°C por 6 horas con la adición de diferentes concentraciones enzimáticas (0,125; 0,187; 0,250 y 0,375 g de enzima/g de orujo).

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
0,125 g de enzima/g de orujo seco	52,21 (a)
0,187 g de enzima/g de orujo seco	55,21 (b)
0,250 g de enzima/g de orujo seco	57,98 (c)
0,375 g de enzima/g de orujo seco	65,08 (d)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

Las diferencias encontradas al incrementar la cantidad de enzimas aplicadas resultaron estadísticamente significativas. Esto pone en evidencia el hecho de que la cantidad de enzima estimada en un comienzo siempre fue insuficiente para degradar la totalidad de los polisacáridos presentes en los orujos de uva blanca.

3.2.3.8. Variación del tiempo de reposo

Se analizó el efecto de la variación del tiempo de reposo sobre la cantidad de azúcares reductores contabilizados. Al haber observado que un aumento en la concentración enzimática arrojaba mayores valores de azúcares reductores, en este ensayo, se utilizaron concentraciones enzimáticas de 0,5 gramos de enzima/ gramo de orujo seco. Los intervalos analizados fueron: 20 horas, 6 horas y 2 horas.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla a continuación:

Tabla 17. Tiempo de reposo: Efecto sobre la cantidad de azúcares reductores por maceraciones con agua a 97°C por 1 hora con una posterior hidrólisis enzimática a 45°C por diferentes períodos de reposo (2, 6 o 20 horas).

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/Kg)
2 horas de reposo	68,04 (a)
6 horas de reposo	71,66 (b)
20 horas de reposo	75,91 (c)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

El tiempo de reposo de 20 horas, planteado en un inicio, resultó ser el más adecuado. Puede observarse una relación entre la cantidad de azúcares extractados y el tiempo de hidrólisis, para esta concentración enzimática y demás variables adoptadas.

3.2.3.9. Efecto de la agitación

Si bien se verificó una menor cantidad de azúcares reductores extractados al disminuir la cantidad de enzima empleada, se decidió introducir la agitación como una alternativa para mejorar el rendimiento de estos tratamientos de baja concentración enzimática (0,06 g de enzimas/g de orujo seco). De esta forma, el ensayo se conformó por 2 tratamientos térmicos de 1 hora de duración con el posterior agregado de enzimas y reposo durante 2 horas. Uno de los tratamientos se agitó manualmente cada 30 minutos mientras que el otro permaneció en reposo durante la totalidad del intervalo de reposo. El motivo de la elección de un tiempo de tratamiento de 2 horas, se debe a la complejidad de realizar una agitación manual empleando intervalos mayores.

Tabla 18. Agitación: Efecto sobre la cantidad de azúcares reductores por maceraciones con agua a 97°C por 1 hora con una posterior hidrólisis enzimática a 45°C por 2 horas con o sin agitación cada 30 minutos.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
Sin agitación	45,15 (a)
Con agitación	47,23 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

El tratamiento con agitación mostró un incremento en la cantidad de azúcares reductores extractados, lo que evidencia una mejora en la hidrólisis enzimática por la aplicación de esta práctica.

3.2.3.10. Rendimiento azucarino del proceso enzimático con variables optimizadas

Los mejores resultados de sacarificación enzimática se obtuvieron al realizar un pretratamiento térmico de 1 hora de duración a 97°C acompañado de una sacarificación enzimática de 20 horas a 45°C empleando 0,5 gramos de enzimas por cada gramo de orujo seco.

En la tabla a continuación se compara el rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática optimizada con respecto a un testigo sin enzima.

Tabla 19. Acción enzimática con variables optimizadas.

Tratamiento	Azúcares Reductores (g/l)
<p>Testigo</p> <p>(Agua 97°C durante 1 hora + reposo a 45°C por 20 horas sin enzimas)</p>	48,17 (a)
<p>Hidrólisis enzimática</p> <p>(Agua 97°C durante 1 hora + reposo a 45°C por 20 horas con enzimas:0,5 g de enzima/g de orujo seco)</p>	88,29 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

El método DNS de determinación de azúcares reductores permitió identificar un incremento de azúcares reductores cercano al doble por la aplicación del tratamiento enzimático expuesto.

3.3. FERMENTACIONES

3.3.1. Ensayos de Fermentación

3.3.1.1. Fermentación de orujos con y sin tratamiento enzimático

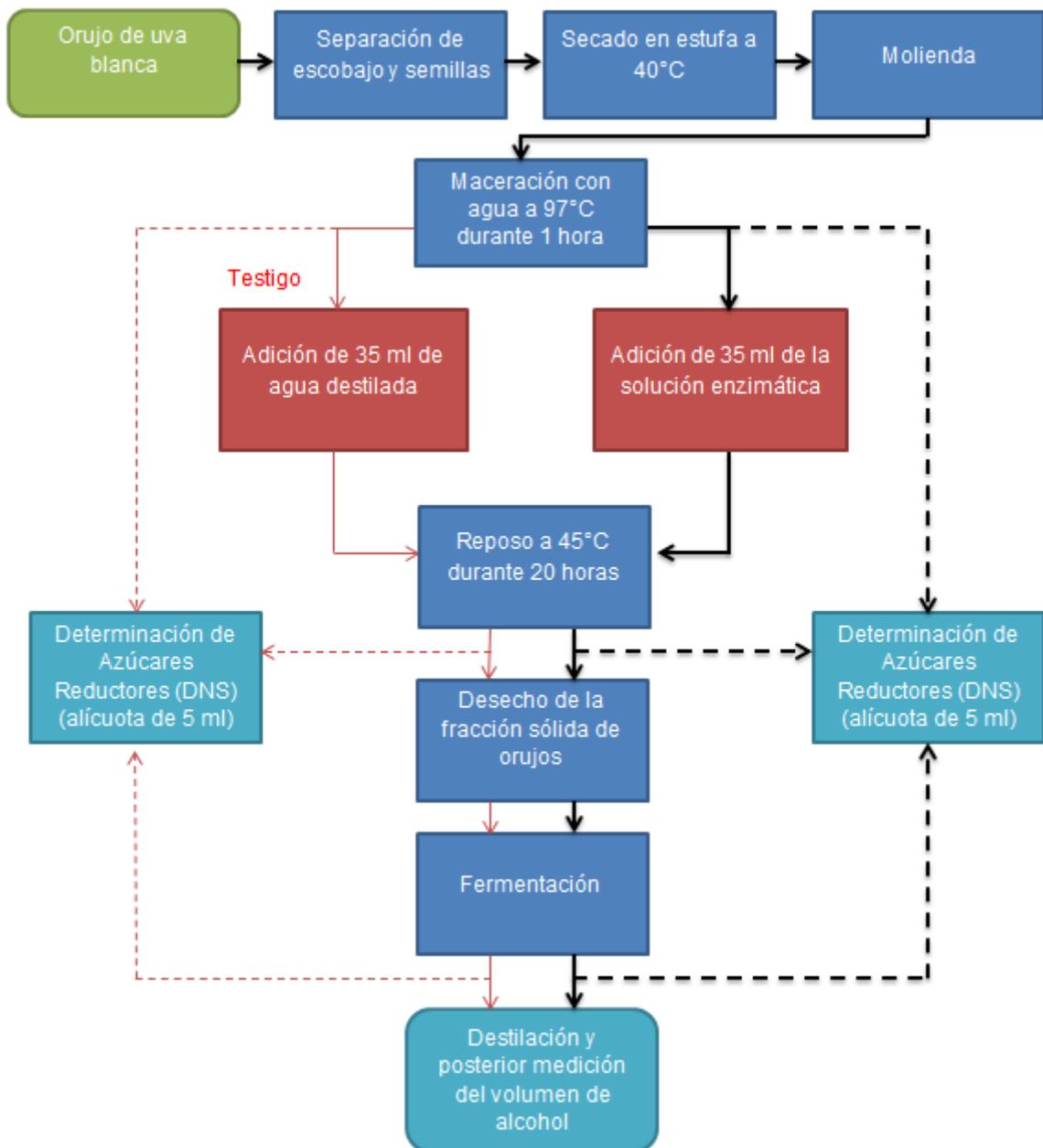


Figura 13: Diagrama de flujo simplificado de fermentaciones de orujos con previo pretratamiento térmico y, con o sin, sacarificación enzimática

Se evaluó el rendimiento de etanol del tratamiento enzimático optimizado en comparación de su testigo sin enzimas. Se realizaron análisis de azúcares reductores al finalizar cada etapa del proceso con la finalidad de poder estimar la cantidad de azúcares fermentados por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 20: Azúcares reductores obtenidos al finalizar las etapas de hidrólisis térmica y enzimática con y sin el agregado de enzimas.

Tratamiento	Az red. (g/l) al finalizar el pretratamiento térmico	Az red. (g/l) al finalizar el periodo de reposo
Testigo (Agua 97°C durante 1 hora + reposo a 45°C por 20 horas sin enzimas)	47,44	48,17
Hidrólisis enzimática (Agua 97°C durante 1 hora + reposo a 45°C por 20 horas con enzimas:0,5 g de enzima/g de orujo seco)	47,07	88,29

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

Tabla 21: Fermentación de los extractos obtenidos con y sin hidrólisis enzimática.

Tratamiento	Az red. (g/l) al iniciar el proceso fermentativo	Grado alcohólico (%v/v)	Az red. (g/l) al finalizar el proceso fermentativo
Testigo (Agua 97°C durante 1 hora + reposo a 45°C por 20 horas sin enzimas)	48,17 (a)	2,13 (a)	2,91 (a)
Hidrólisis enzimática (Agua 97°C durante 1 hora + reposo a 45°C por 20 horas con enzimas:0,5 g de enzima/g de orujo seco)	88,29 (b)	3,80 (b)	7,71 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

*cada columna de la tabla corresponde a un análisis estadístico diferente

Concentración de Azúcares Reductores al finalizar cada etapa del proceso

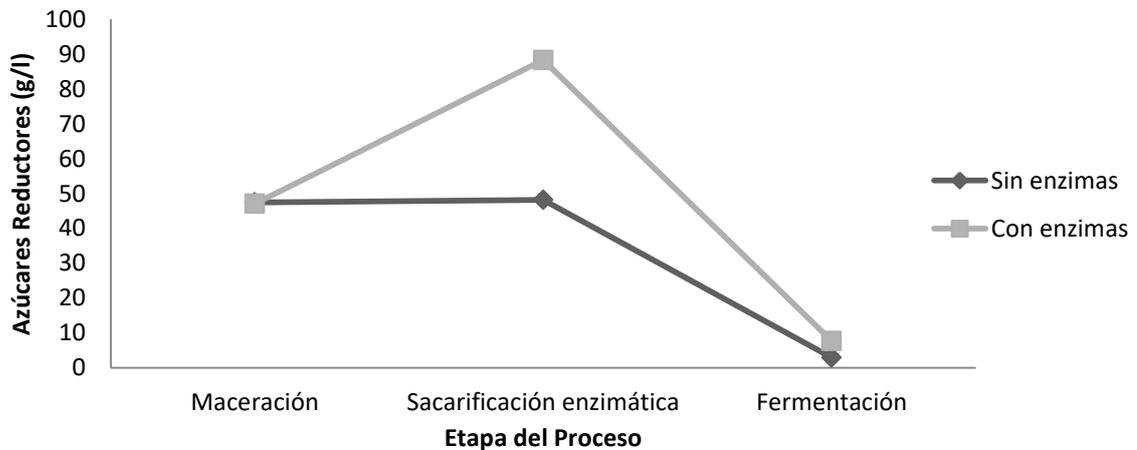


Gráfico 3: Variación de la concentración de azúcares reductores al finalizar cada una de las etapas, tratamientos con o sin el agregado de enzimas pectolíticas.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento de etanol por el empleo de enzimas pectolíticas, lo que corrobora la diferencia observada en los valores de azúcares reductores. El tratamiento enzimático adoptado, permitió incrementar en más de un 75% la cantidad de etanol posible de generar a partir de los orujos de uva blanca.

Al finalizar la fermentación, la solución que no se expuso a los efectos de la hidrólisis enzimática, quedó con un remanente de 2,91 gramos de azúcares reductores por litro de solución. Este valor concuerda con el obtenido por Mendes (2013), donde 3 gramos de azúcares por litro permanecieron residuales por conformar xilosa no fermentescibles por *S. cerevisiae*. Por otro lado, el uso de enzimas pectolíticas incrementó significativamente el contenido de azúcares residuales del proceso de fermentación. Esto podría deberse a la composición química de los polisacáridos fragmentados durante el proceso, los cuales pueden haber liberado pentosas no fermentescibles por el microorganismo utilizado.

3.3.1.2. Fermentación con y sin presencia de orujos durante el proceso fermentativo

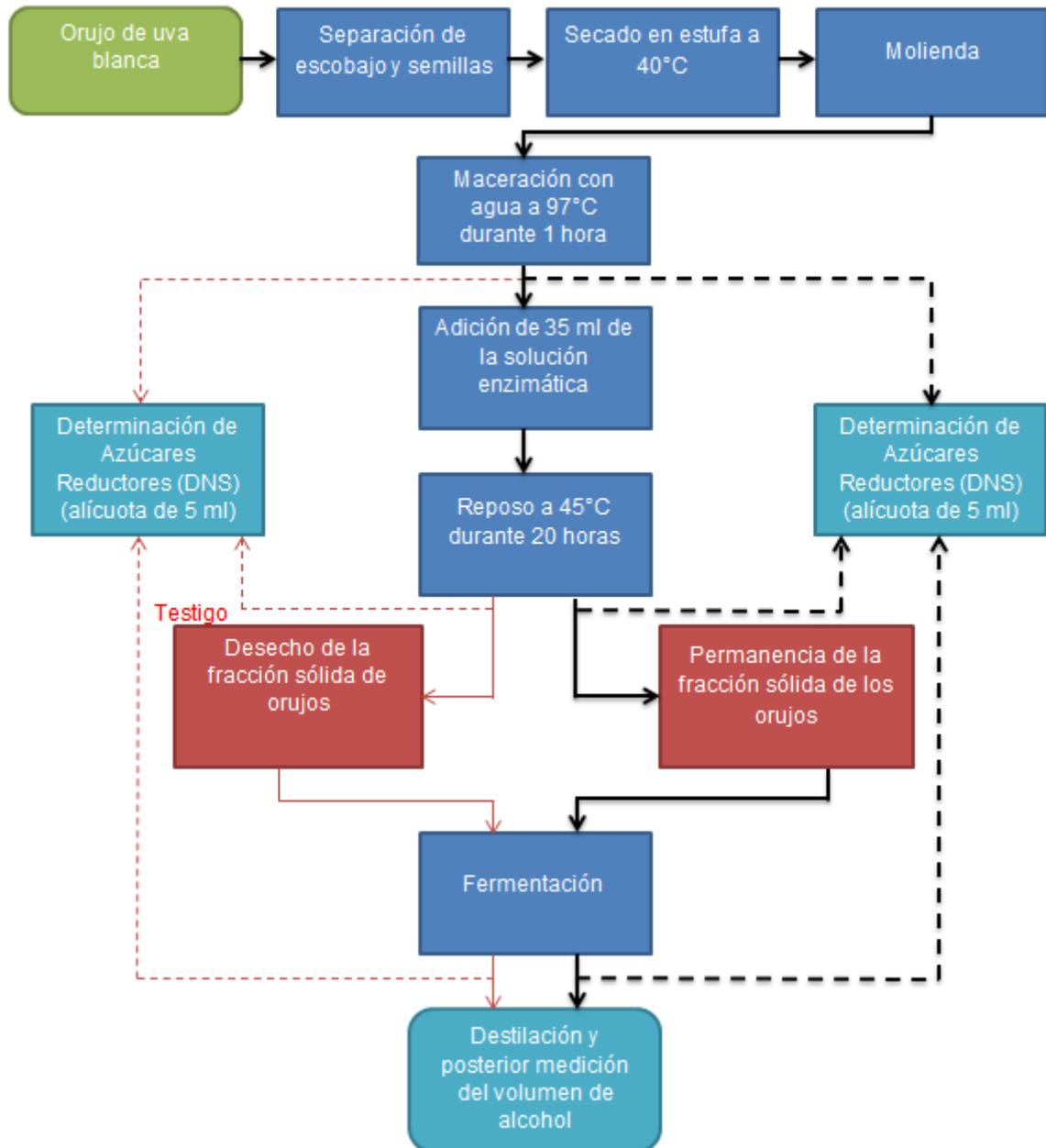


Figura 14: Diagrama de flujo simplificado de orujos que han sido sometidos a un pretratamiento térmico y una sacarificación enzimática, con o sin la permanencia de los sólidos remanentes del proceso de hidrólisis durante la fermentación

Se evaluó el efecto de la permanencia (durante la fermentación) de los orujos molidos residuales del proceso de hidrólisis enzimática y térmica. Estos sólidos decidieron descartarse en el ensayo anterior para evitar la liberación de azúcares durante el período de fermentación; lo que hubiera provocado un error en el balance azucarino por haberse fermentado más azúcares de los realmente contabilizados.

De esta forma, se pretende observar el potencial total de los orujos de uva blanca para generar etanol, aprovechando todos los azúcares fermentescibles por *Saccharomyces cerevisiae* existentes en el medio.

Tabla 22. Azúcares reductores obtenidos al finalizar las etapas de hidrólisis térmica y enzimática: Valor de azúcares reductores contabilizado luego de macerar los orujos a 97°C por 1 hora y dejarlos reposar a 45°C durante 20 horas con el agregado de 0,5 g de enzimas pectolíticas por gramo de orujo seco.

Tratamiento	Az red. (g/l) al finalizar el pretratamiento térmico	Az red. (g/l) al finalizar la hidrólisis enzimática
Sin presencia de sólidos en la fermentación	47,37	88,77
Con presencia de sólidos en la fermentación	48,67	89,78

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

Los ensayos evaluados difieren únicamente en el proceso de fermentación, lo que se evidencia al observar los datos de azúcares reductores arrojados en esta etapa del proceso.

Tabla 23. Fermentación de los extractos obtenidos con y sin presencia de los sólidos durante el proceso fermentativo: Valores de azúcares reductores contabilizados al iniciar y finalizar el proceso fermentativo. Valor de alcohol relevado al fermentar orujos con o sin presencia de sólidos durante el proceso fermentativo, orujos macerados a 97°C por 1 hora con posterior hidrólisis enzimática a 45°C durante 20 horas.

Tratamiento	Az red. (g/l) al iniciar el proceso fermentativo	Grado alcohólico (%v/v)	Az red. (g/l) al finalizar el proceso fermentativo
Sin presencia de sólidos en la fermentación	88,77 (a)	3,73 (a)	7,79 (a)
Con presencia de sólidos en la fermentación	89,78 (a)	3,83 (a)	8,51 (b)

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

*letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,05

*cada columna de la tabla corresponde a un análisis estadístico diferente

Concentración de Azúcares Reductores al finalizar cada etapa del proceso

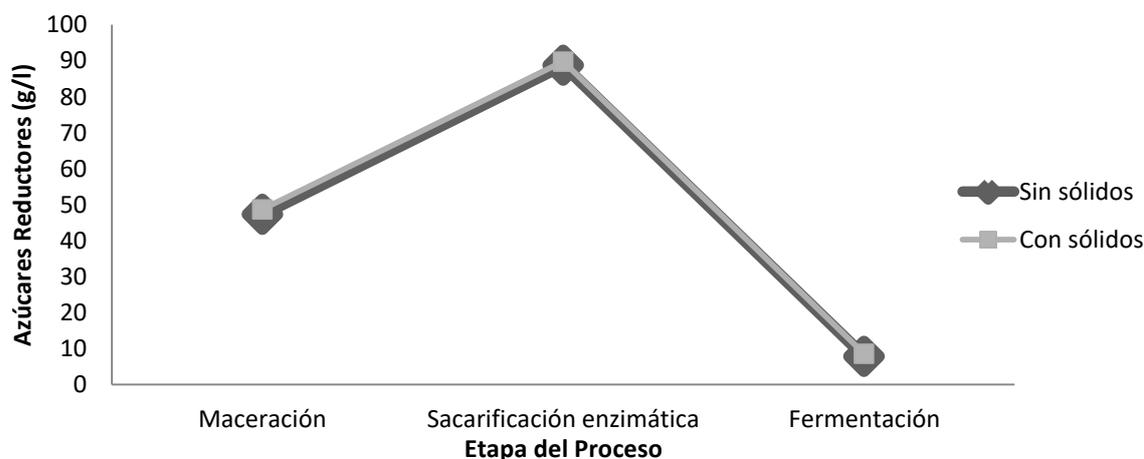


Gráfico 4: Variación de la concentración de azúcares reductores al finalizar cada una de las etapas, tratamientos con o sin la presencia durante la fermentación de los sólidos remanentes del proceso de hidrólisis.

No se encontraron diferencias significativas por realizar fermentaciones con presencia de los sólidos, lo que permite suponer que la mayoría de los azúcares reductores se transfieren a la solución acuosa por medio del procedimiento realizado. De esta forma, podría elegirse entre obtener un residuo rico en azúcares o uno rico en etanol al final del proceso de obtención del bioetanol, sin alterar en gran medida el rendimiento.

3.3.2. Grado de aprovechamiento, por medio de la fermentación alcohólica, de los azúcares reductores liberados por el tratamiento enzimático

La hidrólisis enzimática, además de aumentar el rendimiento de etanol y la extracción de azúcares reductores, también incrementó el valor de azúcares residuales del proceso fermentativo (Tabla 20 y 21). Esto permite suponer que una fracción de los azúcares reductores liberados por el uso de enzimas no es fermentescible por el microorganismo evaluado en las condiciones de trabajo empleadas.

A los fines de evaluar el beneficio real del tratamiento enzimático, se analizó el porcentaje de los azúcares liberados que pudieron ser aprovechados finalmente por *S.cerevisiae*.

Tabla 24: Porcentaje aprovechable de los azúcares reductores liberados por el uso de enzimas (valores extraídos de tabla 20 y 21).

Factor	Cálculo	Az. red. g/l
Az red. al iniciar el proceso fermentativo sin enzimas (AISE)	Datos extraídos de Tabla 20	48,17
Az red. al finalizar el proceso fermentativo sin enzimas (AFSE)		2,91
Az red. al iniciar el proceso fermentativo con enzimas (AICE)		88,29
Az red. al finalizar el proceso fermentativo con enzimas (AFCE)		7,71
Incremento en el valor de Az. red. observado por el uso de enzimas (AICE-AISE)	88,29-48,19	40,12 = a
Azúcares no fermentescibles liberados por el tratamiento enzimático* (AFCE-AFSE)	7,71-2,91	4,8 = b
Azúcares fermentescibles liberados por el tratamiento enzimático*	a-b	35,32 = c
Total de azúcares fermentados, proceso fermentativo con enzimas (AICE-AFCE)	88,29-7,71	80,58=d
Porcentaje aprovechable de los azúcares reductores liberados por el uso de enzimas	$(c*100)/a$	88%
Porcentaje aprovechable del total de azúcares reductores presentes en el macerado $[(1-(AFCE/AICE))*100]$	$(d*100)/AICE$	91%

*fermentescibles por *Saccharomyces cerevisiae* bajo las condiciones de trabajo establecidas

El 88% de los azúcares reductores liberados por el uso de la pectinasa Ultrazym Premium DX resultaron fermentescibles por *S. cerevisiae* en las condiciones de trabajo utilizadas. El porcentaje restante corresponde a azúcares extraídos por el proceso enzimático pero que no pudieron ser aprovechados fermentativamente; valor que posiblemente sea próximo al de pentosas liberadas por el uso de la enzima.

Considerando los azúcares liberados por el uso de enzimas y los demás existentes en el medio, se observa que la pérdida de rendimiento (por no haber podido fermentar todos los azúcares reductores presentes) es menor al 10 %. De esta forma, no parecería ser de fundamental importancia la modificación del sistema o del microorganismo de fermentación (apartado 1.5.2 Microorganismos Fermentadores) para aprovechar los azúcares residuales del proceso.

3.3.3. Comparación de los resultados obtenidos

Con la finalidad de realizar comparaciones de los resultados obtenidos con los arrojados por otros estudios realizados sobre orujos de uva blanca y otras materias primas, los rendimientos se expresaron por “tonelada de materia seca procesada”. De esta forma el grado alcohólico se transformó en “litros de etanol por tonelada de materia seca”, proceso de conversión que figura en el ANEXO F.

3.3.3.1. Bioetanol de orujos de uva blanca

Tabla 25. Rendimientos de orujos de blanca: Rendimiento de etanol de orujos de uva blanca en diversos estudios, resultados expresados en litros de etanol por tonelada de orujo de uva blanca seco.

Trabajos	Tratamiento aplicado	Rendimiento (litros de etanol/ tonelada de orujos de uva blanca secos)
Hang <i>et al.</i> * (1986)	ninguno	189
Rodriguez <i>et al.</i> * (2010)	ninguno	198
Mendes <i>et al.</i> (2013)	ácido	310
Zheng <i>et al.</i> ** (2012)	ácido	308
Potencial máximo estimado por Corbin <i>et al.</i> *** (2015)	ácido y enzimático	400
Resultados obtenidos en el presente estudio	ninguno**** enzimático y térmico*****	225 434

*Fermentación en estado sólido

**Proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) utilizando el microorganismo *Escherichia coli* KO11 capaz de fermentar tanto hexosas como pentosas

***Dato estimado a partir de la composición química de los orujos de uva blanca

**** Orujos macerados durante 1 hora con agua a 25°C (3.2.1.1.) con una posterior fermentación. Ensayo expuesto en el ANEXO G

***** Resultado perteneciente al ensayo de fermentación 3.3.1.1., tabla 20 y 21

La hidrólisis enzimática realizada, permitió obtener un rendimiento de etanol próximo al teórico y máximo estimado por Corbin (2015) a partir de la composición química de los orujos de uva blanca. Esto permite suponer que, la metodología empleada, se encuentra aprovechando en su totalidad este subproducto de la industria vitivinícola para obtener etanol.

3.3.3.2. *Materias primas utilizadas en la Argentina para generar bioetanol*

En el cuadro siguiente, se comparan los rendimientos de etanol obtenidos en este estudio con los arrojados por las materias primas actualmente utilizadas en la Argentina para producir bioetanol. Los resultados se expresan en una primera instancia en función de la tonelada de materia prima seca y, luego, por tonelada de materia prima húmeda.

Tabla 26. Rendimientos de otras materias primas: Rendimientos de etanol de distintas materias primas expresado en litros de etanol por tonelada de materia prima seca y húmeda.

Materia Prima	Tratamiento aplicado	Rendimiento (litros de etanol/tonelada de materia prima seca)	Rendimiento (litros de etanol/tonelada de materia prima húmeda)
Caña de azúcar	Ninguno	315*	85 ¹
Maíz	enzimático	460 ^{2**}	405 ^{3**}
Orujos de uva blanca	Ninguno	225	81***
	enzimático y térmico	434	156***

*dato estimado teniendo en cuenta una humedad del 73% en la caña de azúcar madura (Rolz Asturias C. E. y de León Fajardo L.R. 2008).

**proceso de obtención de etanol por molienda seca.

***rendimientos estimados teniendo en cuenta una humedad del 64% (3.1.) en los orujos de uva blanca.

Se observa un buen rendimiento del proceso desarrollado al compararlo con los arrojados por las materias primas actualmente utilizadas a nivel industrial en el país. Los resultados hacen evidente la aptitud de este subproducto de la industria vitivinícola para producir bioetanol, algo que resalta al observar que el rendimiento de la caña de azúcar es similar al de los orujos de uva blanca sin ningún tipo de tratamiento (rendimiento por tonelada de materia prima húmeda). Así mismo, la metodología de hidrólisis desarrollada permitió obtener rendimientos cercanos a los del maíz por tonelada de materia prima seca.

¹ Siliceo Rodríguez M.L. 2014

² Siliceo Rodríguez M.L. 2014

³ Frank F. et al. 2014

4. CONCLUSIONES

El pretratamiento ácido, en las condiciones evaluadas, resultó inadecuado para los orujos de uva blanca. Probablemente, el impacto negativo observado se deba a la composición de los azúcares reductores existente, desde un inicio, en este residuo agroindustrial. Se observaron decrecimientos en el valor de azúcares reductores tanto al incrementar la molaridad del ácido, como al elevar la temperatura y duración del proceso de maceración con ácido sulfúrico.

El pretratamiento térmico a 97°C, por otro lado, incrementó en un 5% la cantidad de azúcares reductores con respecto a una maceración con agua a 25°C. Dicho incremento parecería deberse a la fragmentación de algún polisacárido. A pesar de esto, el pretratamiento no resultó ser lo suficientemente agresivo como para mejorar el rendimiento de la posterior hidrólisis enzimática. El pretratamiento de ácido diluido de bajas molaridades evaluado, tampoco aumentó la susceptibilidad de los polisacáridos al tratamiento enzimático. De esta forma, ninguno de los pretratamiento evaluados en este estudio podría considerarse adecuado para los orujos de uva blanca.

El tratamiento de los orujos de uva blanca que arrojó los mejores rendimientos de etanol estuvo integrado por un pretratamiento térmico de 1 hora de duración a 97°C (siguiendo una relación de 1 gramo de orujo por cada 10 ml de agua) acompañado de una sacarificación enzimática de 20 horas a 45°C empleando 0,5 gramos de enzimas pectolítica por cada gramo de orujo seco. La solución resultante se filtró y se fermentó durante 20 horas a 28°C. De esta manera fue posible obtener 434 litros de etanol por tonelada de orujo seco; metodología que permitió incrementar en un 93% el etanol generado a partir de este residuo de la industria vitivinícola. Este resultado permite aceptar la hipótesis planteada al comienzo del estudio; la cual sostenía que era posible incrementar la concentración de azúcares fermentescibles de los orujos de uva blanca aplicando tratamientos que hidrolicen los polisacáridos presentes, mejorando, consecuentemente, el rendimiento de etanol.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a pesar de ser capaz de fermentar únicamente hexosas, fermentó el 91% de los azúcares reductores presentes en el medio. Esto se debe a que los azúcares reductores originales de los orujos de uva blanca son, casi en su totalidad, hexosas fermentescibles. De la misma manera, el 88% de los azúcares liberados con el uso de la pectinasa Ultrazym Premium DX resultaron aprovechables por el microorganismo evaluado. Debido a estos resultados, no se considera de fundamental importancia la modificación del sistema o microorganismo de fermentación para valorizar los azúcares residuales del proceso.

Teniendo en cuenta las 22.000 toneladas de orujos de uva blanca (en peso seco) que se producen anualmente en Mendoza, podrían generarse cerca de 10.000 m³ de bioetanol con la metodología diseñada, aprovechamiento que se vería favorecido por la concentración geográfica del recurso. De esta forma, sería posible cubrir una parte de la demanda de este biocombustible en la Provincia de Mendoza (un 5,5% en función del consumo del año 2016), producto que actualmente debe transportarse desde otras regiones del país (donde se genera a partir de maíz y caña de azúcar) por no haber plantas productoras en la provincia.

5. FUTURAS INVESTIGACIONES

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, surgen otros temas factibles de ser investigados:

- Enzimas de una mayor especificidad; teniendo en cuenta que la enzima aplicada es de uso industrial y estaría compuesta por un conjunto de enzimas, dentro de las cuales, la principal actividad es de tipo poligalacturonasa. Por otro lado, también existe la posibilidad de evaluar enzimas con actividades diferentes, como podrían ser celulasas.
- Nuevos pretratamientos destinados a mejorar la susceptibilidad de los orujos de uva blanca al posterior ataque enzimático; partiendo del hecho de que los tratamientos térmicos y ácidos evaluados no cumplieron con tal objetivo.
- El uso de tratamientos enzimáticos sin la presencia de sólidos, por haber observado que la mayoría de los polisacáridos afectados por el uso de la enzima evaluada parecieron haberse transferido eficientemente a la fracción líquida del hidrolizado (3.2.3.5.), lo que podría mejorar la eficiencia del proceso enzimático. Por otro lado, el efecto de la agitación durante el proceso de hidrólisis enzimática podría estudiarse con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso.
- Variables del proceso fermentativo; con el objetivo de mejorar el rendimiento en etanol. Dentro de estas variables podrían enunciarse: pH, aireación, temperatura de fermentación, suplementación de nutrientes y concentración inicial de microorganismos en suspensión. El objetivo de evaluar y optimizar estos parámetros deriva del hecho de que la composición de los orujos de uva blanca hidrolizados es diferente al de uvas para vinificación; además de que los objetivos del proceso de fermentación difieren en ambos casos (priorizando en este estudio el rendimiento en etanol del proceso fermentativo sin prestar atención a los atributos sensoriales finales).
- Impactos de la metodología diseñada sobre orujos de uva blanca frescos; materia prima que probablemente sería la utilizada en caso de poder desarrollar este estudio en una mayor escala.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AIMARETTI, N., YBALO, C., ESCORCIA, M. y CODEVILLA, A., 2012. Revalorización de descartes agroindustriales para la obtención de bioetanol. *Invenio* [en línea], vol. 15, no. 28. [Consulta: 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/877/87724141011/>.
- BAYRAK, E., 2013. *Utilization of wine waste for fermentative processes* [en línea]. İzmir Institute of Technology. [Consulta: 2 October 2017]. Disponible en: <http://openaccess.iyte.edu.tr/handle/11147/3568>.
- BOULTON, R.B., SINGLETON, V.L., BISSON, L.F. y KUNKEE, R.E., 1996. *Principles and Practices of Winemaking*. Editorial Chapman&Hall.
- BUSTAMANTE J., DA SILVA S. M., LÓPEZ L. y BUSTAMANTE A., 2015. Obtención de bioetanol a partir de biomasa generada en un cultivo energético de forestales. *3er Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías (CIAB), 4to Congreso Latinoamericano sobre Biorrefinerías, y 2do Simposio Internacional sobre Materiales Lignocelulósicos*.
- CAFFALL, K.H. y MOHNEN, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, vol. 344, no. 14, pp. 1879-1900.
- CANSECO PÉREZ, M.A., COUDER GARCÍA, B.C., PÉREZ LUNA, Y. y ÁLVAREZ GUTIÉRREZ, P., 2010. Producción de bioetanol a partir de desechos agroindustriales. [en línea], [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_IX/CIX-12.pdf.
- CONTE, R.M.P., CONTRERAS, M.E.L., AGUIRRE, O.S., DE LEUZE, J.A., MORA, A.G. y DE VIDTS, C.S., 2010. Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. [en línea], [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2010/cf-pezoa_rc/pdfAmont/cf-pezoa_rc.pdf.
- CORBIN, K.R., HSIEH, Y.S.Y., BETTS, N.S., BYRT, C.S., HENDERSON, M., STORK, J., DEBOLT, S., FINCHER, G.B. y BURTON, R.A., 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology*, vol. 193, pp. 76-83.
- CORTÍNEZ VILLALOBOS V., 2010. *Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología.
- DI PAOLA, M.E. y SANGALLI, F., 2009. Informe Ambiental Anual. *Fundación Ambiente y Recur* [en línea], [Consulta: 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.farn.org.ar/wp-content/uploads/2013/04/informe20131.pdf>.
- FERRER, J., PÁEZ, G., DE MORENO, L.A., CHANDLER, C., MÁRMOL, Z. y SANDOVAL, L., 2002. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía* [en línea], vol. 19, no. 1. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/11971>.
- FODA, M.S., RIZK, I.R.S., GIBRIEL, A.Y. y BASHA, S.I., 1984. Biochemical properties of polygalacturonase, produced by *Aspergillus aculeatus* and *Mucor pusillus*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, vol. 139, no. 6, pp. 463–469.

- FRANK F., MONTERO G., RICARD F., SIROTIUK V. y VIGLIZZO E., 2014. La huella de carbono en la agroindustria. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. EEA Anguil.
- GIL, D.B., BOCOURT, E.C. y 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 (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar). Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. 40, no. 2, pp. 45–50.
- HANG, Y.D., LEE, C.Y. y WOODAMS, E.E., 1986. Solid-state fermentation of grape pomace for ethanol production. *Biotechnology Letters*, vol. 8, no. 1, pp. 53-56.
- INSTITUTO NACIONAL VITIVINÍCOLA, 2016. Anuarios vitivinícolas 2007-2016. [en línea]. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar/index.php/men-estadisticas/men-estadisticas-vitivinicolas/16-cat-estadisticas/49-est-menu-otros-anuarios>.
- KARSCH, T., STAHL, U. y ESSER, K., 1983. Ethanol production by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, advantages and disadvantages. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, vol. 18, no. 6, pp. 387-391.
- KORKIE, L.J., JANSE, B.J.H. y VILJOEN BLOOM, M., 2002. Utilising grape pomace for ethanol production. [en línea], [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/101652>.
- LELIO, H., REBORA, C. y GÓMEZ, L., 2009. Potencial de obtención de bioetanol a partir de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) regado con aguas residuales urbanas. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* [en línea], vol. 41, no. 1. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/3828/382837644005/>.
- MARTÍNEZ, J.A., MONTOYA, N. y SIERRA, M., 2014. Energía del futuro: Bioalcoholes a partir de Residuos Sólidos Urbanos (RSU). *Revista EAN*, no. 77, pp. 64–80.
- MATEUS, Lady, HERNÁNDEZ, O., VELÁSQUEZ, M. y DÍAZ, J. de J., 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 14, no. 1, pp. 146–156.
- MEJÍA, S.M., ESPINAL, J.F. y MONDRAGÓN PÉREZ, F., 2006. Estudio del azeótropo etanol-agua. Caracterización molecular de Dímeros de etanol, heterodímeros y heterotrímeros de etanol-agua. [en línea], [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/7201>.
- MENDES, J.A.S., XAVIER, A.M.R.B., EVTUGUIN, D.V. y LOPES, L.P.C., 2013. Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, vol. 49, pp. 286-291.
- MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINERÍA - REPÚBLICA ARGENTINA, 2016. Refinación y Comercialización de Petróleo, Gas y Derivados (Tablas Dinámicas). [en línea]. [Consulta: 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.energia.gob.ar/contenidos/verpagina.php?idpagina=3300>.
- RIAÑO, A.M.S., 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga* [en línea], vol. 1, no. 5. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/58>.
- RODRÍGUEZ, L.A., TORO, M.E., VAZQUEZ, F., CORREA-DANERI, M.L., GOUIRIC, S.C. y VALLEJO, M.D., 2010. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 35, no. 11, pp. 5914-5917.

- RUBIO BELIZÓN, E., CARMONA JIMÉNEZ, Y., IGARTUBURU CHINCHILLA, J.M., GARCÍA BARROSO, C., MACÍAS DOMÍNGUEZ, F.A. y GARCÍA MORENO, M. de V., 2011. Estudio de la composición de los residuos de vinificación con fines alimenticios. [en línea], [Consulta: 4 octubre 2017]. Disponible en: <http://rodin.uca.es/xmlui/handle/10498/16312>.
- RUEDA MARTÍN D. C. y HERRERA HERNÁNDEZ W. J., 2006. *Diseño Preliminar de un proceso de obtención de etanol a partir de material lignocelulósico de frutas, aplicando tecnología de hidrólisis térmica catalizada*. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas.
- SILICEO RODRIGUEZ M.L., 2014. *Análisis de la productividad industrial de bioetanol*. Universidad Veracruzana. Facultad de ciencias químicas.
- SUN, Y. y CHENG, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, vol. 83, no. 1, pp. 1–11.
- TEJEDA L., TEJADA C., VILLABONA Á., ALVEAR M., CASTILLO C., HENAO D., MARIMÓN W., MADARIAGA N. y TARÓN A., 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*, vol. 5, no. 10, pp. 120–125.
- TORRES, C.L., CHAMACHE, P.F., LEÓN, J.M., BARRAGAN, J.A., VÁSQUEZ, C.B., ALVA, E.M., PEREZ, L.R. y POLO, F.V., 2015. Extracción de Azúcares Reductores Totales “ART” de “coronta” de Zea mays “maíz amarillo duro”. *UCV-SCIENTIA*, vol. 3, no. 2, pp. 214–218.
- URBANEJA G., FERRER J.R., PÁEZ G., DE MORENO L.A., COLINA G. y SANDOVAL L., 1997. Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad de Zulia* [en línea], vol. 14, número 2. Disponible en: http://revfacagronluz.org.ve/v14_2/v142z010.html.
- ZAPATA, A.M., 2010. Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas. *Revista Tumbaga* [en línea], vol. 1, no. 5. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/57>.
- ZHANG, M., EDDY, C., DEANDA, K., FINKELSTEIN, M. y PICATAGGIO, S., 1995. Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, vol. 267, no. 5195, pp. 240-243.
- ZHENG, Y., LEE, C., YU, C., CHENG, Y.-S., SIMMONS, C.W., ZHANG, R., JENKINS, B.M. y VANDERGHEYNST, J.S., 2012. Ensilage and Bioconversion of Grape Pomace into Fuel Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 44, pp.

ANEXO

ANEXO A: Variación del porcentaje de corte de naftas establecido por la Ley Nacional 26.093/06 de la República Argentina.

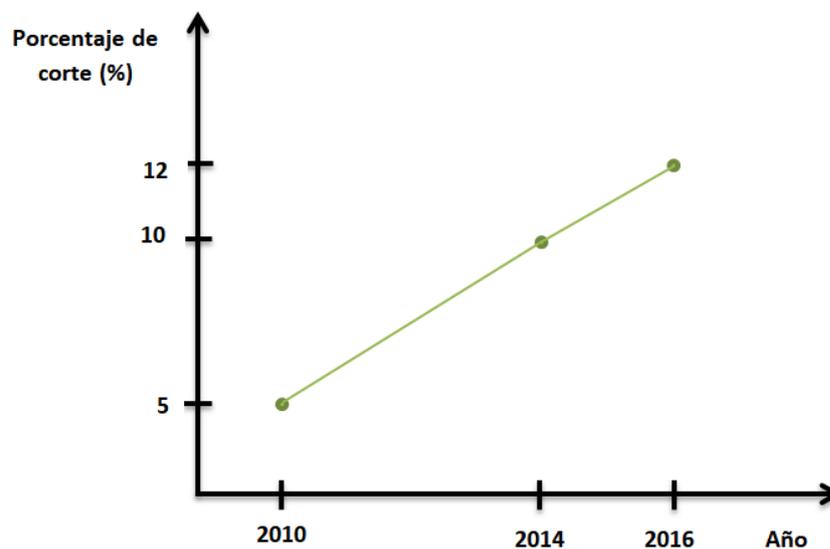


Gráfico 5: Variación del porcentaje de participación de bioetanol en las naftas comercializadas en la Argentina.
Fuente: elaboración propia a partir de la Ley Nacional 26.093/06.

ANEXO B: Cantidad de uvas blancas procesadas anualmente en la Provincia de Mendoza.

Tabla 27: Promedio de toneladas de uvas blancas destinadas a vinificación y elaboración de mostos durante los últimos 10 años de cosechas en la Provincia de Mendoza.

Año	Toneladas de uva blanca para vinificación y mosto
2007	397.977
2008	361.935
2009	279.516
2010	333.754
2011	360.093
2012	275.206
2013	359.591
2014	313.224
2015	318.338
2016	187.247
Promedio de los últimos 10 años	318.688

Los valores que figuran en negro (extraídos de los Informes Cosecha y Elaboración del INV) están compuesto por: el total de uvas blancas de alta calidad enológica y el ítem de “otras blancas”, para la Provincia de Mendoza (Extraídos de la tabla: Región Centro-Oeste. Uva ingresada a establecimientos en quintales. Destino: elaborar vinos y mostos).

Por otro lado, los valores que figuran en rojo, son valores estimativos. Estos reflejan la producción de uva en la Provincia pero no la cantidad que finalmente se procesó en esta (Extraído de la tabla: “Producción de uva según Provincia de origen – Destino: Elaborar vinos y mostos”, presentes en el archivo: Uva destinada a vinos y mostos según origen variedades).

Bibliografía:

INSTITUTO NACIONAL VITIVINÍCOLA, 2016. Anuarios vitivinícolas 2007-2016. [en línea]. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar/index.php/men-estadisticas/men-estadisticas-vitivincolas/16-cat-estadisticas/49-est-menu-otros-anuarios>.

ANEXO C: Producción y distribución de vino blanco y mosto sulfitado de uva blanca.

Tabla 28: Valores en hectolitros de la producción anual de vino blanco en la Provincia de Mendoza y en la Zona Este-Centro del territorio Provincial (Maipú, San Martín, Junín, Rivadavia).

Año	Producción anual de vino blanco (Hectolitros)		Porcentaje de Participación de la Zona Este-Centro
	Mendoza	Zona Este-Centro	
2016		datos faltantes	
2015	3.108.673	2.030.284	65
2014	4.382.579	3.001.668	68
2013	3.758.136	2.447.908	65
2012	2.596.529	1.616.336	62
2011		datos faltantes	
2010	4.490.841	3.219.452	72
2009	3.191.697	2.128.362	67
2008		datos faltantes	
2007	3.927.153	2.423.607	62
Promedio			66

Tabla 29: Valores en hectolitros de la producción anual de mosto sulfitado de uva blanca en la Provincia de Mendoza y en la Zona Este-Centro del territorio Provincial (Maipú, San Martín, Junín, Rivadavia).

Año	Producción anual de mosto sulfitado de uva blanca (Hectolitros)		Porcentaje de Participación de la Zona Este-Centro
	Mendoza	Zona Este-Centro	
2016		datos faltantes	
2015	2.548.544	1.821.111	71
2014	2.268.594	1.704.781	75
2013	3.532.230	2.511.859	71
2012	2.426.636	1.744.500	72
2011		datos faltantes	
2010	1.717.262	1.419.395	83
2009	1.630.027	1.162.035	71
2008		datos faltantes	
2007	4.107.971	2.921.602	71
Promedio			73

Datos extraídos del archivo: "Elaboración de vinos y otros subproductos", presente en los Anuarios Vitivinícolas del INV.

Bibliografía:

INSTITUTO NACIONAL VITIVINÍCOLA, 2016. Anuarios vitivinícolas 2007-2016. [en línea]. [Consulta: 3 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.inv.gov.ar/index.php/men-estadisticas/men-estadisticas-vitivinicolos/16-cat-estadisticas/49-est-menu-otros-anuarios>.

ANEXO D: Método DNS para determinación de azúcares reductores

Fundamentación del método y preparación de la solución DNS

Este método colorimétrico cuantifica la cantidad de azúcares reductores por medio de una reacción redox que ocurren entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y los azúcares reductores de la muestra.

Para preparar 100 ml de la solución DNS, en un Erlenmeyer de 100 ml (Gil *et al.* 2006):

- Se disolvió 1,6 g de hidróxido de sodio en agua destilada
- Se adicionó de forma gradual 30 g de tartrato de sodio y potasio
- Se adicionó 1 g de ácido dinitrosalicílico previamente disuelto en agua destilada
- Se aforó a 100 ml con agua destilada
- Se guardó la solución en frascos color ámbar

De esta manera, el reactivo DNS, consiste en una solución formada por: Sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico), hidróxido de sodio y ácido dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico); el cual actúa como oxidante reduciéndose en presencia del grupo reductor de la glucosa formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Por otro lado, el grupo aldehído reductor de los azúcares se oxida, formando un grupo carboxílico (Miller 1959). En este método analítico, el ácido dinitrosalicílico se encuentra en exceso frente a los grupos reductores, de esta forma, y al agregar en todas las muestras la misma cantidad de reactivo, mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra. Estas diferencias de coloración son determinadas por espectrofotometría visible, a la longitud de onda de máxima absorbancia de 540 nanómetros.

Construcción de la curva de calibración del método DNS

Para correlacionar la absorbancia de las muestras colocadas en el espectrofotómetro, con la cantidad de azúcares reductores de estas, se debe realizar una curva de calibración del método DNS; curva que será específica para cada solución DNS preparada. Esta curva se construye por medio de la determinación de la absorbancia de una serie de soluciones de glucosa de concentración conocida. De esta forma, y mediante una regresión lineal entre ambas variables, se construye una curva de calibrado.

La concentración de azúcares reductores de una solución problema se averigua a través de la ecuación de la recta ($y = m \cdot x + b$) donde:

$$\text{Concentración de azúcares reductores de la solución} = [\text{pendiente de la recta (m)} \cdot \text{Absorbancia}] + \text{ordenada al origen de la regresión}$$

A lo largo del presente estudio se utilizaron distintas soluciones DNS y, por lo tanto, se utilizaron distintas curvas de calibrado. Las curvas fueron construidas a partir de una solución de glucosa de 4 g/l; con la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones (g/l) de: 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,50 y 2,75. Los tratamientos se hicieron por triplicado y se ingresaron solo los valores promedios de estos para realizar la regresión lineal.

A continuación se muestran los datos obtenidos al momento de calibrar el método con la solución DNS 4, la curva de calibración resultante y el modelo final. La recta central del gráfico 6 representa la ecuación dada por la regresión lineal.

Tabla 30: Valores de absorbancia a 540 nm para soluciones de glucosa de distintas concentración luego de aplicado el método DNS sobre estas.

Solución de Glucosa (g/l)	Absorbancia	Promedio Absorbancia
1,25	0,548	0,551
1,25	0,542	
1,25	0,562	
1,50	0,659	0,664
1,50	0,668	
1,50	0,665	
1,75	0,794	0,806
1,75	0,815	
1,75	0,810	
2,00	0,905	0,912
2,00	0,930	
2,00	0,900	
2,25	0,996	1,005
2,25	1,003	
2,25	1,015	
2,50	1,123	1,132
2,50	1,136	
2,50	1,138	

Valores de absorbancia de distintas soluciones de glucosa para la solución DNS 4

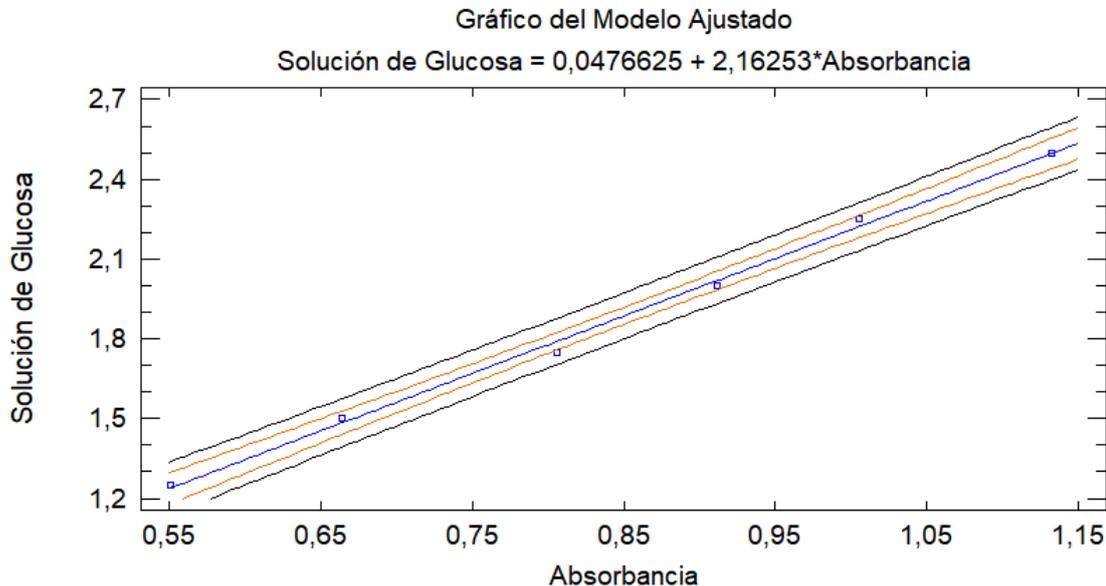


Gráfico 6: Curva de calibración de la solución DNS 4, construida a partir de la regresión lineal de la absorbancia en función de la concentración de glucosa en la solución ($R^2 = 0,997$).

Se muestra con cuadrados azules los valores de absorbancia promedio de los triplicados

Modelo para la solución DNS 4:

$$\text{Concentración de azúcares reductores de la solución (g/l)} = 0,048 + (2,162 * \text{Absorbancia})$$

Interpretación del valor de absorbancia obtenido del espectrofotómetro

El valor de absorbancia obtenido de la lectura del espectrofotómetro, se insertó en la ecuación lineal de la solución DNS utilizada para ese ensayo. El resultado de esto fue un determinado valor de azúcares reductores que debió ser ajustado por un factor de corrección en función de las diluciones realizadas para lograr que, el valor de azúcares reductores del hidrolizado con orujos, estuviera dentro del rango de azúcares reductores calibrado (usualmente rango comprendido entre 1,25 g/l y 2,5 g/l).

De esta forma, el factor de corrección consistió en la razón de la inversa de las diluciones empleadas. Por lo general, el factor utilizado fue de 25, valor que se desprende de la dilución 1 en 25 necesaria para que el valor de absorbancia obtenido quedara dentro de los utilizados para construir la curva de calibración. En los tratamientos con enzimas, el factor de corrección utilizado comúnmente fue de 27,5, esto debido al mililitro de solución enzimática adicionado. Los análisis de azúcares reductores del apartado de fermentación (3.3.), tuvieron en cuenta las soluciones de nutrientes y levaduras adicionadas como factores de dilución.

Ejemplo del cálculo para un tratamiento sin el agregado de enzimas:

- Valor observado en el espectrofotómetro: 0,784 A
- Ingreso del valor de absorbancia a la ecuación de la recta de la solución DNS utilizada:

$$\text{Concentración de azúcares reductores de la solución (g/l)} = 0,048 + (2,162 * \text{Absorbancia})$$

$$\text{Concentración de azúcares reductores de la solución (g/l)} = 0,048 + (2,162 * 0,748) = 1,6652$$

- Ajuste del valor de azúcares reductores por la inversa de la dilución 1 en 25 empleada para desencadenar correctamente la reacción con el ácido dinitrosalicílico.
 $1,6652 * 25 = 41,63$ gramos de azúcares reductores/litro de solución

Este valor de 41,63 g de azúcares reductores, es el observado por litro de solución obtenida de la hidratación de 1 parte de orujo en 10 partes de solvente (agua o ácido).

Bibliografía:

GIL, D.B., BOCOURT, E.C. y 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*, vol. 40, no. 2, pp. 45–50.

MILLER G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, pp. 426–428.

ANEXO E: Método densimétrico para la determinación de etanol.

La metodología empleada para la cuantificación del grado alcohólico de las muestras fermentadas consistió en:

- Enrasar el fermentado en un matraz aforado de 200 cm³
- Verter el contenido en un balón de destilación y enjuagar el matraz tres veces con pequeñas cantidades de agua destilada, volcando el producto de dicho enjuague en el mismo balón.
- Agregar 2 cm³ de glicerina, agente antiespumante.
- Colocar un matraz aforado de 200 cm³ en la salida del refrigerante.
- Destilar hasta alcanzar las dos terceras partes del volumen inicial.
- Enrasar el matraz con agua destilada hasta completar nuevamente los 200 cm³.
- Homogeneizar la mezcla y ajustar la temperatura del destilado a 20°C.
- Volcar el líquido en una probeta. Introducir el alcoholómetro provocando un pequeño movimiento de rotación.
- Leer tangencialmente en la parte inferior del menisco el grado alcohólico de la solución evaluada.

Cabe aclarar que con el término “grado alcohólico” se hace referencia a la expresión % v/v.

Bibliografía:

RIBÉREAU GAYON J., PEYNAUD E., SUDRAUD P. y RIBÉREAU GAYON P., 1980. *Tratado de Enología. Ciencias y técnicas del vino. Tomo I: Análisis y control de los vinos*. Editorial Hemisferio Sur. Capítulo 2. Pág. 41-83.

ANEXO F: Expresión del grado alcohólico en litros de etanol/tonelada de materia seca.

Ejemplo de cálculo del volumen de etanol generado para el tratamiento térmico con enzimas del ensayo de fermentación N°1 (3.3.1.1.):

- Grado alcohólico de la solución: 3,8° (% v/v = % volumen de etanol/volumen de la solución). Valor obtenido de la lectura del alcoholómetro.
- Volumen total del fermentado (suponiendo que no hay pérdidas por evaporación) =
Agua (350 ml) +enzima o agua (35 ml)+nutrientes (12,5 ml)+levadura (2,5 ml) = 399,5 ml
- Teniendo en cuenta que en 100 ml de solución hay 3,8 ml de etanol (3,8° de etanol), podemos decir que en los 399,5 ml de fermentado hay 15,18 ml de etanol.
- Al haber generado 15,18 ml de etanol a partir de 35 gramos de orujo seco, es posible escalar el rendimiento para 1000 gramos o 1 kg, lo que arroja una producción de 434 ml de etanol.
- Expresado en tonelada de materia seca, el rendimiento sería de 434 litros de etanol/tonelada de orujos de uva blanca secos.

Unificando todo en una única fórmula, podemos decir que:

$$\text{Rendimiento}^4 = \frac{\text{volumen total del fermentado} * \text{grados de la solución alcohólica} * 1000}{100 * 35}$$

⁴ Rendimiento en litros de etanol/tonelada de materia seca procesada o mililitros de etanol/kg de materia seca.

ANEXO G: Rendimiento alcohólico de orujos de uva blanca sin pretratamiento térmico ni tratamiento enzimático.

A los fines de comparar el rendimiento de etanol arrojado por orujos con y sin el proceso de hidrólisis térmica y enzimática desarrollado, se realizó una fermentación de orujos de uva blanca secos y molidos sin ningún tratamiento. Los orujos únicamente fueron macerados con agua a 25°C durante 1 hora, para luego ser fermentados con la metodología empleada para los demás ensayos.

De esta forma, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 31: Ensayo de Fermentación sin hidrólisis térmica ni enzimática

Tratamiento	Az red. (g/l) al iniciar el proceso fermentativo	Grado alcohólico (%v/v)	Az red. (g/l) al finalizar el proceso fermentativo
Orujos macerados a 25°C por 1 hora	42,56	2,16	2,66

*el valor que se muestra representa la media de 3 repeticiones

El volumen final del fermentado de este nuevo ensayo fue de 364,5 ml (por no tener enzimas ni agua en su reemplazo). De esta forma, el rendimiento de etanol por tonelada de materia seca fue de 225 litros.