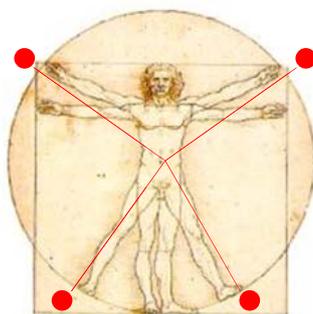


TECNOLOGÍ@ y DESARROLLO

Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente

VOLUMEN XIII. AÑO 2015

SEPARATA



OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN DE JUGOS DE TABACO.

Herrero Gamarro, N. ; de la Macorra García, C. ; Rincón Arévalo, P.



UNIVERSIDAD ALFONSO X EL SABIO
Escuela Politécnica Superior
Villanueva de la Cañada (Madrid)

© Del texto: Herrero Gamarro, N.; de la Macorra García, C.; Rincón Arévalo, P.
Mayo, 2015.

<http://www.uax.es/publicacion/optimizacion-de-las-condiciones-de-fermentacion-de-jugos-de-tabaco.pdf>

© De la edición: *Revista Tecnol@ y desarrollo*

Escuela Politécnica Superior.

Universidad Alfonso X el Sabio.

28691, Villanueva de la Cañada (Madrid).

ISSN: 1696-8085

Editor: Javier Morales Pérez – tecnologia@uax.es

No está permitida la reproducción total o parcial de este artículo, ni su almacenamiento o transmisión ya sea electrónico, químico, mecánico, por fotocopia u otros métodos, sin permiso previo por escrito de la revista.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN DE JUGOS DE TABACO.

Herrero Gamarro, N. (a); Rincón Arévalo, P. (b); de la Macorra García, C (c)

- a) Licenciada en Ciencias Ambientales. Escuela Politécnica Superior. Universidad Alfonso X “El Sabio”. Area Medio Ambiente y Ciencias de la Salud. Tfno: 918109116. nherrgam@uax.es.
- b) Dr Ingeniero Industrial. Research and Development Manager. Tomsa Destil, S.L.
- c) Dra. Europea en Ciencias Químicas. Area Industrial y Medio Ambiente. Escuela Politécnica Superior. Universidad Alfonso X “El Sabio”.

RESUMEN: Las nuevas políticas en materia de energía así como la no tan reciente preocupación por el medio ambiente fomentan la búsqueda de nuevas fuentes de energía que garanticen un suministro suficiente, a precios razonables, y que a su vez sean sostenibles ambientalmente. Actualmente ninguna de las energías renovables conocidas es capaz, por sí sola, de cumplir estas premisas, sin embargo nos encontramos en un periodo de transición en el que el aprovechamiento energético de cultivos no alimentarios está cada vez más extendido; en este contexto, dado que España es el principal productor de tabaco de Europa se están desarrollando nuevas vías de investigación encaminadas a hacer de este cultivo la materia prima para la obtención de numerosas sustancias de interés económico; una alternativa es la producción de bioetanol. En este trabajo se pretende optimizar las condiciones de fermentación del tabaco para su aprovechamiento como cultivo energético.

PALABRAS CLAVE: Tabaco; fermentación; bioetanol, *biocombustible*

ABSTRACT: New policies on energy as well as the not so recent concern for the environment promote the search for new sources of energy to ensure sufficient, affordable supplies, and which in turn are environmentally sustainable. At present, no known renewable energy can no, by itself, meet these premises, however we are in a period of transition in which the energy use of non-food crops is increasingly more widespread; in this context, given that Spain is the leading producer of tobacco in Europe are developing new avenues of research to make this growing the raw material for obtaining numerous substances of economic interest; an alternative is the production of bioethanol. This work seeks to optimize the conditions for fermentation of tobacco for use as energy crops.

KEY-WORDS: *Tobacco; fermentation; bioethanol. biofuel*

SUMARIO: 1. Introducción 2. Metodología 3. Resultados y discusión, 4. Conclusiones 5. Bibliografía

1. Introducción

Se entiende por biocombustibles aquellos combustibles producidos a partir de la biomasa y que son considerados, por tanto, una energía renovable. Pueden presentarse en forma sólida (residuos vegetales, fracción biodegradable de los RSU), líquida (bioalcoholes y biodiesel) o gaseosa (biogás, hidrógeno). Dentro de los biocombustibles, los biocarburantes son aquellos que pueden aplicarse en los actuales motores de combustión interna; su elen presentarse en forma líquida (García Camús & García Laborda, 2008).

Atendiendo a la tecnología empleada en la elaboración de los biocombustibles, se pueden clasificar:

De primera generación: La materia prima es de procedencia agrícola y se emplean partes alimenticias de la planta ricas en azúcares, almidón y aceites. Se emplean tecnologías convencionales de fermentación y digestión anaeróbica. La ventaja principal de este tipo de biocombustibles es su fácil procesado, pero el aspecto negativo radica en que se produce una competencia tanto de suelo como de especies vegetales empleadas con el sector alimentario.

De segunda generación: Se emplean restos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa como biomasa de origen. Las tecnologías requeridas para la elaboración de este tipo de biocombustibles es más compleja que en el caso de los de primera generación, destacando los procesos de sacarificación-fermentación, y el proceso Fischer-Tropsch (García Camús & García Laborda, 2008). Este último proceso también recibe los nombres de proceso GTL y proceso BTL, cuyas siglas en inglés provienen de "Gas-To-Liquids" y "Biomass-To-Liquids" respectivamente, los cuales consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica de la biomasa, para después sintetizar algún combustible líquido como el etanol. La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético, pero su desventaja es la poca ganancia en disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos, respecto a los biocombustibles de primera generación.

De tercera generación: Se emplean especies vegetales no alimenticias de rápido crecimiento y alta densidad energética almacenada en su contenido químico, por lo que se conocen como cultivos energéticos. Es en este campo el que se centran la mayoría de investigaciones actuales. Las ventajas de estos biocombustibles son el secuestro de

anhídrido carbónico (CO_2) para la producción de las plantas empleadas y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero. Su desventaja es la utilización de tierras de cultivo de alimentos para sembrar los insumos, con excepción de las algas verdes.

De cuarta generación: Los biocombustibles son producidos por bacterias genéticamente modificadas que emplean CO_2 o alguna otra fuente de carbono para la elaboración del biocombustible. A diferencia de los casos anteriores, la bacteria o microorganismo empleado es el responsable de la transformación durante todo el proceso. Actualmente esta generación de biocombustibles se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de anhídrido carbónico, sin embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes (Álvarez Maciel, 2009).

El biocombustible más empleado en la actualidad es el bioetanol obtenido a partir de azúcares o almidón (Hanh-Hagredal, M. Galbe, Gorwa-Grauslund, & Zacchi, 2006), siendo Brasil el mayor exportador a nivel mundial. El bioetanol obtenido a partir de la caña de azúcar elaborado por Brasil representan la mitad de las exportaciones mundiales de biocombustibles.

El etanol se emplea como oxígeno en sustitución del MTBE (metil tert-butil éter), el cual enriquece químicamente la mezcla aire/combustible (carburante), mejorando en consecuencia la combustión en la cámara de combustión del vehículo. Esto da como resultado una combustión más completa, por lo que se reduce considerablemente la emisión de monóxido de carbono (Chaves Solrera, 2004).

Industrialmente la producción de bioetanol comienza a inicios de los años 80, aunque la primera demostración de funcionamiento de un motor impulsado por biocombustibles fue en la Feria de Exhibición de París de 1898, utilizándose aceite de cacahuete como combustible. Su inventor, Rudolph Diesel, pensaba que el futuro de dicho motor (en contraposición con las máquinas de vapor de la época, que utilizaban carbón) pasaba por la utilización de combustibles procedentes de la biomasa, y así fue de hecho hasta los años 20, quedando posteriormente relegados por la industria petrolera. De igual manera, los primeros automóviles estadounidenses de American Ford funcionaban con bioetanol, y su creador, Henry Ford, mantenía tesis muy similares a las de Rudolph Diesel. Como respuesta a las crisis del petróleo de 1973 y 1978, las políticas energéticas de los años 80 favorecieron la búsqueda de alternativas a la dependencia de los combustibles fósiles, especialmente en EEUU y Brasil (APPA, 2007).

Como con todas las tecnologías, se plantean una amplia gama de ventajas y desventajas.

Dentro de las principales ventajas se encuentran su baja toxicidad, su biodegradabilidad y una menor producción de gases contaminantes a lo largo de todo el proceso, ya que la combustión de bioetanol no contribuye al aumento de dióxido de carbono atmosférico (Sticklen, 2008). Esto no puede decirse de los combustibles fósiles, ya que proceden de materia orgánica retirada del ciclo natural del carbono, siendo las actividades antropogénicas las únicas que lo introducen, a causa de la combustión, en la atmósfera en forma de monóxido y dióxido de carbono. Además su producción puede llevarse a cabo a partir de una gran variedad de materias primas, aportando independencia de los países poseedores de combustibles fósiles.

En cuanto a las desventajas cabe destacar el hecho de que el bioetanol se consume entre un 25% y un 30% más rápido que la gasolina, por lo que para ser competitivo debe contar con un menor precio por barril (IICA, 2007). También es relevante en el aspecto económico el hecho de que el coste de producción de estos carburantes es más elevado que el de los carburantes fósiles de referencia, siendo siempre la materia prima empleada el factor de mayor influencia (IDAE, PER 2005-2010, 2005).

Los motores actuales pueden funcionar sin necesidad de hacer modificaciones mecánicas con una mezcla de gasolina/etanol 3:1.

La biomasa para energía se obtiene mayoritariamente de las industrias de primera y segunda transformación de los productos agrícolas y forestales, de los residuos de explotaciones ganaderas, de los restos de aprovechamientos forestales, de los residuos de los cultivos y también de cultivos implantados y explotados con el único objetivo de la obtención de biomasa. A estos últimos se les denomina cultivos energéticos, pero no dejan de ser cultivos forestales o agrícolas. La ventaja fundamental de los cultivos es la predictibilidad de su disposición y la concentración espacial de la biomasa, asegurando el suministro (IDAE, Biomasa: Cultivos energéticos, 2007).

Generalmente, se utilizan cultivos de rápido crecimiento como la caña de azúcar, la remolacha o el sorgo dulce para la obtención de energía o como materia prima para la elaboración de sustancias combustibles y, representan una alternativa que, actualmente, se centra en conseguir la máxima rentabilidad energética a la par que económica.

Los cultivos energéticos en sus inicios no fueron una opción bien acogida en España, debido a la competencia con el mercado agroalimentario y la falta de rentabilidad agraria de estos cultivos, entre otras causas. (BIO OIL-ACOR, 2006) (BESEL S.A., 2007). Por ello, la tendencia actual es el empleo de cultivos sin interés alimentario, como por ejemplo el tabaco (*Nicotiana tabacum*).

La Unión Europea ocupa el quinto lugar a nivel mundial de producción de tabaco. España es el tercer productor de tabaco de la Unión, concentrándose la mayoría en Extremadura, por lo que el sector del tabaco es uno de los motores económicos de esta comunidad autónoma, suponiendo el 12% de la producción vegetal total. Las reformas en la asignación de subsidios para el cultivo publicadas en la última PAC (Política Agrícola Común de la Unión Europea), así como la nueva ley antitabaco han supuesto grandes pérdidas en el sector (Cano Montero, 2006), por lo que los productores tienden a buscar nuevos usos y alternativas para este cultivo.

La fermentación alcohólica es una de las etapas principales que transforman el mosto o zumo azucarado procedente del pretratamiento de la materia vegetal de origen en un líquido que contiene un determinado porcentaje de alcohol etílico (Vicen Vela, Álvarez Blanco, & Zaragoza Carbonell, 2006).

La fermentación alcohólica se considera un proceso anaerobio, ya que el oxígeno necesario para oxidar los azúcares está contenido dentro de la misma molécula y no requiere de oxígeno atmosférico. Según la ecuación de Gay-Lussac (Ec. 1.1):



Los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica son las *levaduras*, las cuales pertenecen al grupo de los hongos y sólo se presentan en forma de células aisladas aunque, en algunos casos, pueden formar pseudomicelios. Son organismos eucariotas que se reproducen por ascosporas o por gemación.

Las levaduras son facultativas, lo que quiere decir que la fermentación sólo tiene lugar en ausencia de oxígeno; este hecho fue comprobado por Pasteur, que demostró que, suministrando oxígeno suficiente, la levadura crece sobre un sustrato de glucosa sin producir etanol (Parés & Juárez, 1997).

Por su resistencia a las altas concentraciones de etanol, así por su elevado rendimiento la levadura más estudiada y más empleada en las fermentaciones alcohólicas es *Saccharomyces cerevisiae*.

Un esquema de las reacciones que tienen lugar durante este proceso puede verse en la figura 1.1, en la que además se representan las proporciones relativas de cada subproducto generado (tomando como valor 100 % el inicial de glucosa aportada).

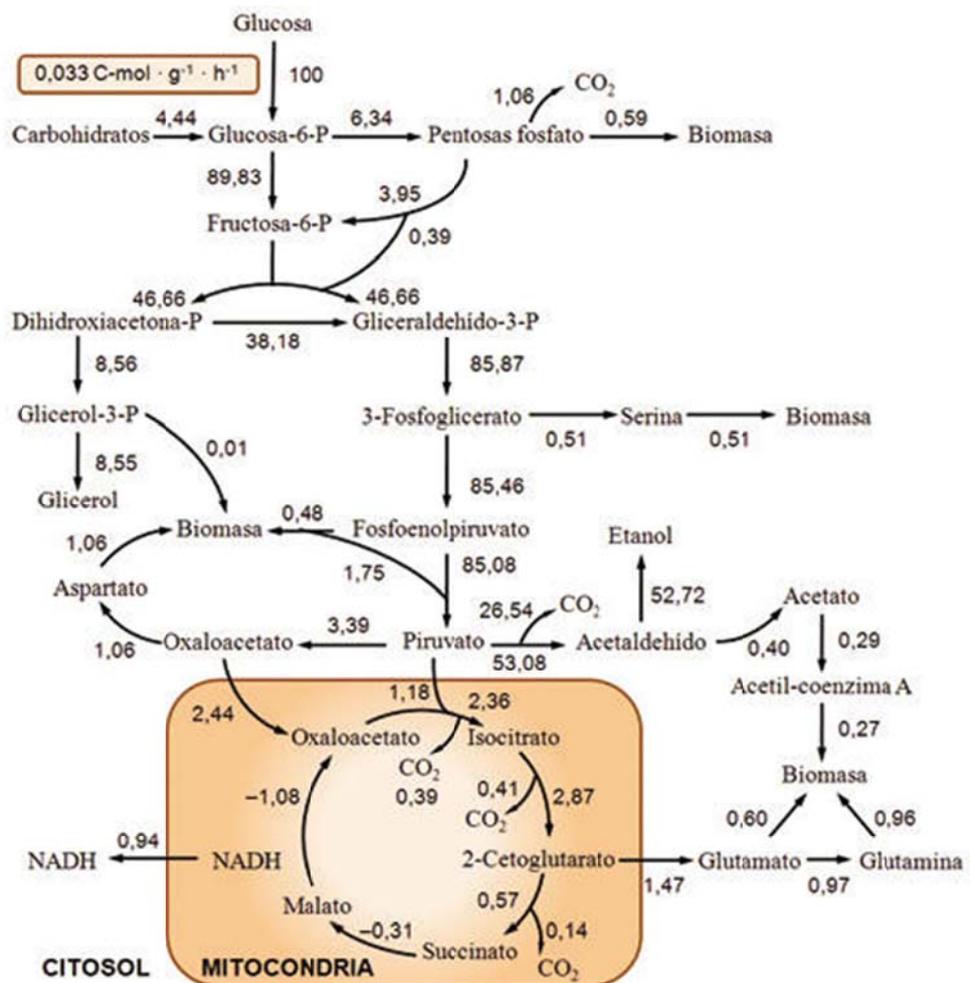


Figura 1.1: Flujos metabólicos para *S. cerevisiae* en condiciones anaeróbicas y porcentaje relativo de consumo de sustrato.

Fuente: (Nissen, Schulze, Nielsen, & Villadsen, 1997)

Durante la fermentación se pueden distinguir tres fases: Durante la primera fase, que tiene una duración aproximada de 24 horas predominan las levaduras con baja producción de etanol y elevada producción de ácidos volátiles como el acético. La segunda fase transcurre entre los días 2 y 4 de la fermentación y predominan bacterias con alta resistencia al etanol como *Saccharomyces cerevisiae*: durante esta etapa tiene lugar la máxima producción de etanol. Por último, a partir del 5º día de fermentación comienzan a desarrollarse hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*, aunque sigue predominando *S. cerevisiae*. Ya que se parte de la premisa de que el contenido en azúcares del tabaco es bajo, se optó por fijar el tiempo de fermentación en 72 horas a fin de no alcanzar la última etapa de la fermentación y que no se produjera una competencia por los azúcares fermentables entre *S. cerevisiae* y otras especies indeseables.

Como cualquier proceso en el que intervengan microorganismos, las condiciones de pH, temperatura, presencia de nutrientes y de sustancias tóxicas son fundamentales a la hora de obtener un buen rendimiento en la fermentación. También hay que tener presente que hay ciertas sustancias que, o bien por su naturaleza química o bien por su concentración en el medio, pueden resultar tóxicas para la levadura. De hecho, una concentración elevada de etanol en el medio puede resultar limitante en el proceso de fermentación causando efectos adversos en el crecimiento microbiano (Ingram & Vreeland, 1980).

En este estudio se pretende determinar el tipo de nutriente y concentración óptimas para la fermentación de jugos procedentes de tabaco.

2. Metodología

2.1 Pretratamiento del tabaco:

Las plantas de tabaco (variedad Virginia), procedente de Naval Moral (Extremadura) fueron troceadas y exprimidas; la fracción sólida se sometió a un proceso de difusión con agua para extraer la mayor cantidad de azúcares posibles, del interior de la planta, sin modificación química, para su posterior fermentación a etanol de acuerdo con el proceso descrito por Herrero et al (Herrero Gamarro, de la Macorra García, & Rincón Arévalo, 2015).

La presencia de azúcares en los jugos se determinó de forma cualitativa, para lo que se realizaron los ensayos de Fehling (von Fehling, 1848), Barfoed (Bradford, 1976) y

Benedict (Benedict, 1909). Para el ensayo de Fehling se añaden a 1000µL de reactivo de Fehling, comercializado por Prolabo, 500µL de muestra, se agita y se lleva a ebullición durante 5 minutos al baño maría; la aparición de un precipitado rojizo de Cu₂O indica la presencia de monosacáridos y/o disacáridos reductores. Para el ensayo de Benedict: se añaden 1000µl de reactivo de Benedict de la marca Fisher a 1000µl de solución problema y, tras homogeneizar, se calienta al baño maría durante 5 minutos. La aparición de un precipitado color blanco amarillento señala la presencia de hidróxido cuproso que no llega a pasar a óxido cuproso, indicando la presencia de azúcares reductores. La prueba de Barfoed se realiza añadiendo 500µL de reactivo de Barfoed, de laboratorios Carolina, a 500µL de muestra; tras agitar, el tubo se calienta al baño maría durante 5 minutos; si se observa un precipitado blanco amarillento de hidróxido cuproso se confirma la presencia de azúcares reductores. Estas pruebas cualitativas confirmaron la presencia de monosacáridos reductores.

2.2 Ensayos de microvinificación:

La levadura empleada en el presente trabajo ha sido una variedad comercial de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionada por TOMSA DESTIL S.A., siendo necesarios 25µg de levadura por cada 50mL de jugo; fue activada durante 30 minutos en agua destilada a 30°C y agitación constante antes de proceder a su inoculación. La proporción masa de levadura/masa de agua destilada empleada, según las indicaciones comerciales, fue de 1:5. Las condiciones óptimas de fermentación para *S. cerevisiae* son de 28 a 35°C de temperatura y pH ligeramente ácido (entre 5 y 6). Por otro lado, además de necesitar la glucosa como fuente de energía, toda célula requiere de nutrientes como nitrógeno y fósforo necesarios para la producción de proteínas.

Las fermentaciones se realizaron sobre 100ml de jugo en erlenmeyers de 250ml. Una vez realizado el inóculo en los Erlenmeyer, estos fueron sellados con algodón para impedir la entrada de oxígeno pero, al mismo tiempo, facilitar la salida de CO₂ en caso de sobrepresión.

Los Erlenmeyer debidamente identificados se introdujeron en una estufa a 35°C controlando los cambios de masa de los mismos a intervalos regulares de tiempo para determinar la cinética de la fermentación por pérdida de masa debido al desprendimiento de CO₂ (Sablayrolles, Barre, & Grenier, 1987). Dado que todos los recipientes estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales, la pérdida de masa debida a la evaporación de agua será la misma en todos ellos, pudiéndose achacar las diferencias en pérdida de masa al desprendimiento de CO₂. Por tanto, la variación de la masa puede emplearse en estas condiciones como un indicador de la actividad de las levaduras. Los

gramos de CO₂ librado/L se calcularon empleando la ecuación Ec. 2.1 (Sablayrolles, Barre, & Grenier, 1987).

$$g \text{ CO}_2 \text{ librado} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\Delta M}{V} \quad \text{Ec. 2.1.}$$

ΔM : variación de la masa del erlenmeyer desde en tiempo cero hasta el momento de la medida en gramos.

V : volumen de jugo fermentado en litros.

La determinación de la cinética de la fermentación se realizó aplicando la ecuación Ec. 2.2 (Sablayrolles, Barre, & Grenier, 1987).

$$\text{Velocidad de fermentación} \left(\frac{g \text{ CO}_2 / L}{h} \right) = \frac{\sum_{24}^{72} \text{CO}_2 \text{ librado}}{72 \text{ horas}} \quad \text{Ec. 2.2}$$

Tras 72 horas de fermentación se destiló el etanol y el volumen de agua eliminada durante la destilación se repuso añadiendo agua destilada a fin de conservar las características de las muestras, las cuales fueron analizadas en los laboratorios de TOMSA DESTIL S.A. mediante cromatografía de gases. Se empleó, para ello, un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL con detector FID, y una columna Sidelco semicapilar polar SPB-5/30m x 0.53mm/0.5hm, con una detección mínima de 1ppm

2.3 Determinación del tipo y concentración de nutriente óptima:

Se realizaron ensayos de microvinificación para determinar el tipo de nutriente y la concentración óptima de los mismos, empleándose diferentes sustancias inorgánicas, como nutrientes, recogidas en la tabla 2.1:

ERLENMEYER	NUTRIENTE	[N] (ppm)	[P] (ppm)
1	KNO ₃	65	0
2		130	0
3		260	0
4	(NH ₄) ₂ SO ₄	65	0
5		130	0
6		260	0
7	NH ₃ +H ₃ PO ₄	65	2400

8		130	4800
9		260	9600

Tabla 2.1: Concentración y tipo de nutriente empleado, siendo [N] y [P] las concentraciones de nitrógeno y fósforo dosificadas.

Fuente: Elaboración propia.

Los nutrientes fueron disueltos en los jugos antes de proceder a la inoculación de la levadura y se ajustó el pH de cada Erlenmeyer a 5,5 empleando NaOH 1 M y HCl 1 M en función de las necesidades.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación del tipo y concentración de nutriente óptima:

El CO₂ desprendido a lo largo de las 72h de fermentación, se muestra en la tabla 3.1

ERLENMEYER	ΔM 24 HORAS (mg)	ΔM 48 HORAS (mg)	ΔM 72 HORAS (mg)
1	-348	-678	-993
2	-288	-601	-895
3	-268	-513	-745
4	-227	-452	-664
5	-265	-497	-726
6	-387	-631	-857
7	-337	-670	-977
8	-341	-665	-971
9	-351	-684	-1005

Tabla 3.1: Pérdida de masa de los Erlenmeyer (ΔM) a lo largo del tiempo.

Fuente: Elaboración propia.

Con estos datos se calcularon las cantidades de CO₂ liberadas y las velocidades de fermentación obtenidas, empleando las ecuaciones 2.1 y 2.2 respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 3.2

ERLENMEYER	CO ₂ LIBERADO (g/L)			CINÉTICA DE FERMENTACIÓN (g CO ₂ /L/h)
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS	24-72 HORAS
1	3,48	6,78	9,92	0,14
2	2,88	6,01	8,95	0,12
3	2,68	5,13	7,45	0,10
4	2,27	4,52	6,64	0,09
5	2,65	4,97	7,26	0,10
6	3,87	6,31	8,57	0,12
7	3,37	6,7	9,77	0,14
8	3,41	6,65	9,71	0,13
9	3,51	6,84	10,05	0,14

Tabla 3.2: g CO₂ liberado/L y velocidad de la fermentación para cada tipo y concentración de nutriente
Fuente: Elaboración propia.

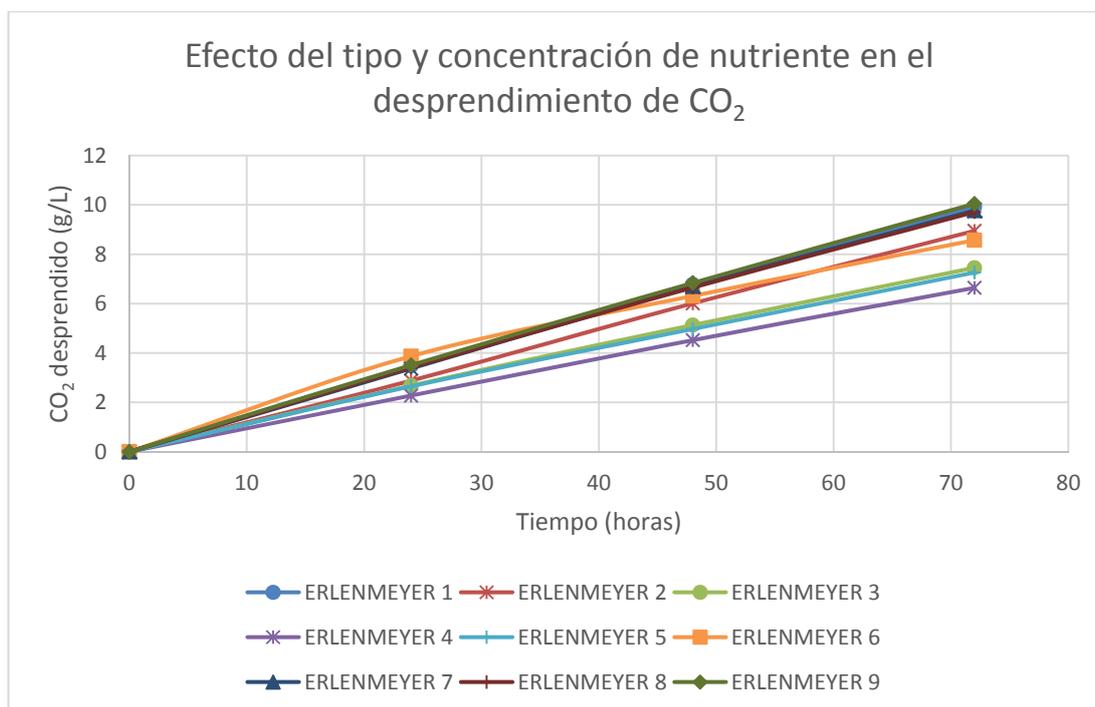


Figura 3.1: Efecto del tipo y concentración de nutriente en el desprendimiento de CO₂.
Fuente: Elaboración propia.

La figura 3.1 revela comportamientos muy similares para los nutrientes empleados, con un desprendimiento creciente de CO₂. El único punto a destacar se observa al emplear (NH₄)₂SO₄ con concentraciones de N de 260 ppm (Erlenmeyer 6), en este caso, el desprendimiento de CO₂ durante las primeras 24 horas es mayor que en el resto de los erlenmeyers, aunque al comparar la cinética de fermentación (recogida en la tabla 3.2) con la de otras muestras, ésta resulta incluso más baja que para otros tipos de nutrientes.

Observando la tabla 3.2, en las muestras donde se ha empleado KNO₃ como nutriente (erlenmeyers 1, 2 y 3) se aprecia una relación inversa entre la concentración de nutriente empleada y la cinética de fermentación, de tal forma que al aumentar su concentración la cinética se reduce. Para el (NH₄)₂SO₄ se aprecia el efecto contrario, mientras que para la combinación de amoníaco y ácido fosfórico el aumento de concentración no muestra ningún efecto significativo en la producción CO₂.

Se ha demostrado que el nitrógeno interviene tanto en la capacidad fermentativa de la levadura como en el aumento de población (Mas, y otros, 2013) resultando en ocasiones imposible distinguir entre ambas. En este sentido, el hecho de que no se observen grandes diferencias en la velocidad de fermentación al aumentar la concentración de nitrógeno (tanto en forma de amonio como de nitrato), podría deberse a que la materia prima de partida (*Nicotiana tabacum*) no es una fuente rica en azúcares fermentables, actuando éstos y no el nitrógeno aportado como factor limitante de la fermentación.

3.2 Determinación del grado alcohólico:

Al analizar las muestras mediante GPC-FID, se observaron diferentes picos correspondientes al contenido en acetato de etilo, acetaldehído, metanol y etanol. Los picos fueron integrados, calculadas sus áreas e interpoladas, éstas, en sus correspondientes rectas de calibrado. Los resultados de la cuantificación realizada se muestran en la tabla 3.3.

ERLENMEYER	ACETALDEHÍDO (g/L)	ACETATO DE ETILO (g/l)	METANOL (g/L)	ETANOL (% p/v)
1	0,3	0,006	0,03	0,06
2	0,08	0,006	0,03	0,05

3	0,4	0,02	0,04	0,05
4	0,5	****	0,05	0,02
5	0,5	0,02	0,04	0,08
6	0,5	0,06	0,05	0,1
7	0,5	0,06	0,04	0,02
8	0,4	0,06	0,04	0,02
9	0,5	****	0,05	0,03

Tabla 3.3: Composición de los destilados. (**** indica que no se ha detectado ningún pico significativo correspondiente a dicha especie química)

Fuente: Elaboración propia

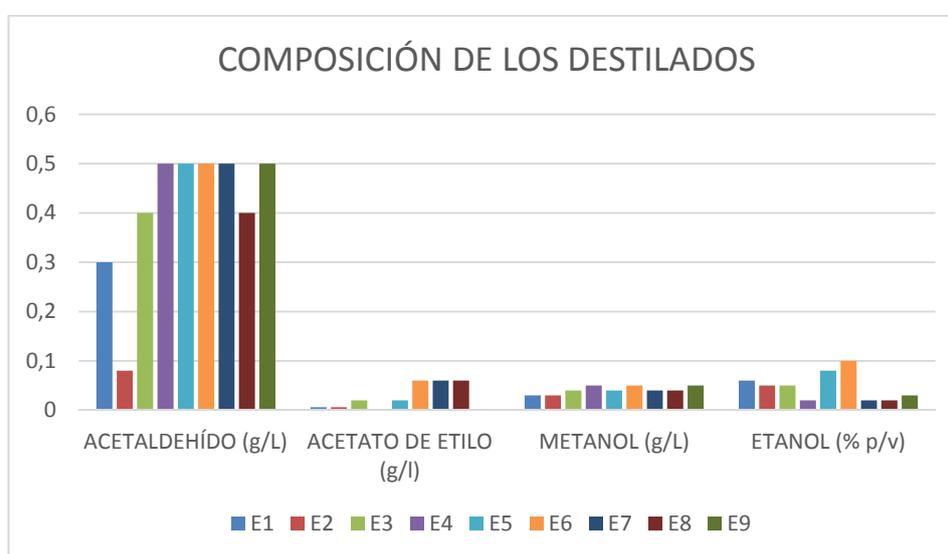


Figura 3.3: Representación gráfica de la tabla 3.4.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 3.2 puede apreciarse que en todas las muestras el contenido en etanol es muy bajo, siendo el Erlenmeyer 6 (tratado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con una concentración equivalente de N de 260 ppm) el que ha presentado una mayor concentración. Sin embargo en todas las muestras se han obtenido valores elevados de acetaldéhidido, este compuesto aparece en las últimas etapas de la fermentación alcohólica, justo en la etapa previa a la formación del etanol (ver figura 1.1) al igual que el acetato de etilo. La aparición de estas cantidades de acetato de etilo podría deberse a un exceso de aireación de las muestras o a una inhibición de la enzima alcohol deshidrogenasa (Parés & Juárez, 1997). Teniendo en cuenta que la planta de tabaco se caracteriza por un elevado contenido en nicotina, cabe la posibilidad de ser esta la causa

del bajo contenido en etanol obtenido, provocando una posible inhibición enzimática a causa de su toxicidad.

Pero observando las cantidades de acetaldehído existentes y siendo estas mayores a medida que se aumenta la cantidad de nutrientes en el medio, cabe la posibilidad de que la fermentación no haya sido total y el tiempo aplicado haya sido insuficiente.

Con el empleo de sulfato amónico se observan mayores cantidades de etanol obtenido e igualmente grandes cantidades de acetaldehído sin llegar a transformarse en etanol, por lo que este podría ser el mejor nutriente para este tipo de fermentación, aumentando el tiempo de la misma para asegurar una fermentación completa de todos los azúcares.

3 CONCLUSIONES

El tabaco se muestra como una materia prima pobre en azúcares fermentables pero investigaciones recientes se centran en o bien en modificar genéticamente la planta para aumentar su capacidad de acumulación de azúcares (Altuna Aldareguia, 2012), o combinar la producción de etanol con la extracción de proteínas de uso alimentario para conseguir rentabilizar el proceso (Cuadros Blázquez, 2013) (Wildman, 1983).

A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, la obtención de etanol ha sido mínima. El sulfato de amonio con una concentración de N de 260 ppm se presenta como el nutriente que permite obtener un mayor contenido en etanol, aunque los elevados niveles de acetaldehído indican que el proceso se podría haber inhibido antes de ser transformado en etanol por lo que para posteriores estudios se propone prolongar los tiempos de fermentación e incluir una etapa previa de detoxificación de los jugos, para eliminar la nicotina existente en el medio.

A pesar de que se estén investigando formas de incrementar la cantidad de azúcares almacenados en la planta de tabaco, este cultivo por sí solo no se puede concebir como un cultivo energético. La obtención de bioetanol a partir de tabaco puede entenderse como un proceso complementario a la obtención de otras materias con interés económico como las proteínas empleadas en la industria alimentaria.

4. BIBLIOGRAFÍA

- ALTUNA ALDAREGUIA, A. (2012). Evaluación del uso de variedades comerciales de tabaco transformadas con el gen de la tioredoxina F como posible cultivo energético para la producción de etanol.
- ÁLVAREZ MACIEL, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*(359), 63-89.
- APPA. (2007). Obtenido de www.appa.es/03renovables08/03renovables18.
- BENEDICT, R. (1909). *A Reagent For the Detection of Reducing Sugars*.
- BESEL S.A. (2007). *Biomasa: Cultivos energéticos*. Madrid: Instituto para Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE).
- BIO OIL-ACOR. (2006). Principales cultivos energéticos destinados a la producción de biodiesel. *BIO-OIL Encuentro sectorial internacional de biodiesel*. Vigo.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*(72), 248-254.
- CANO MONTERO, E. (Julio-Agosto de 2006). El sector tabaquero español ante la reforma de la OCM y la Ley antitabaco. *Partida Doble*(179), 92-103.
- CHAVES SOLRERA, M. (2004). Etanol: Un biocombustible para el futuro. *Antecedentes y Capacidad Potencial de Cogenerar Energía y Producir Etanol por parte del Sector Azucarero Costarricense*. San José.
- CUADROS BLÁZQUEZ, F. (2013). ¿Una biorrefinería del tabaco? *I Encuentro Ibérico sobre Bioeconomía. Mesa: Bioprofesionales y Bioempresarios en España y Portugal*.
- GARCÍA CAMÚS, J. M., & GARCÍA LABORDA, J. Á. (2008). *Biocombustibles líquidos: biodiesel y bioetanol*. Madrid: Confederación Empresarial de Madrid-CEOE.
- HANH-HAGREDAL, B., M. GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, G., & ZACCHI, L. (2006). Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology*(24), 549-556.

- HERRERO GAMARRO, N., DE LA MACORRA GARCÍA, C., & RINCÓN ARÉVALO, P. (Marzo de 2015). Optimización de las condiciones de adsorción de vinazas de tabaco empleando cenizas como material adsorbente. *Tecnología y desarrollo*.
- IDAE. (2005). *PER 2005-2010*. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, Madrid.
- IDAE. (2007). *Biomasa: Cultivos energéticos*. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio., Madrid.
- IICA. (2007). *Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustibles*. San José.
- INGRAM, L., & VREELAND, N. (Noviembre de 1980). Differential effects of ethanol and hexanol on the Escherichia coli cell envelope. *Journal of bacteriology*, 144(2), 481-488.
- MAS, A., BELTRÁ, G., SANCHO, M., GUTIÉRREZ, A., CHIVA, R., & GUILLAMÓN, J. (2013). Metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación vinica. *Sociedad española de Bioquímica y Biología*(176).
- NISSEN, T., SCHULZE, U., NIELSEN, J., & VILLADSEN, J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*(143), 203-218.
- PARÉS, R., & JUÁREZ, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté S.A.
- SABLAYROLLES, J., BARRE, P., & GRENIER, P. (1987). Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal conditions. (1), 181-184.
- STICKLEN, M. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature reviews*(9), 433-443.
- VICENVELA, M., ÁLVAREZ BLANCO, S., & ZARAGOZÁ CARBONELL, J. L. (2006). *Química Industrial Orgánica*. Universidad Politécnica de Valencia.
- VON FEHLING, H. (1848). *Determinación cuantitativa de azúcar en la orina*.
- WILDMAN, S. (1983). An alternative use for tobacco agriculture: proteins for food plus a safer smoking. *Washington, D. C.: U.S. Congress*, (págs. 63-77).

