

---

# Estudio experimental de la extracción de inulina y la obtención de etanol a partir de las piñas de henequén (*Agave fourcroydes*)

Milaidi Pérez Carballo<sup>1</sup>

Beatriz Zumalacárregui de Cárdenas<sup>2</sup>

Emilio Arcadio Sotolongo Valdés<sup>3</sup>

**E**n este trabajo se estudian las piñas de henequén cubano (*Agave Fourcroydes Lem*) como materia prima lignocelulósica de bajo impacto ambiental, para la obtención de etanol y la extracción de inulina. Se realiza la extracción de los azúcares contenidos en el material mediante un método químico, económico y rápido, la cocción con agua de las piñas troceadas, y su posterior molienda. Mediante este tratamiento térmico, que involucra rangos específicos de temperatura y tiempo, se transforma la inulina en fructosa y glucosa a través de su hidrólisis. A partir de este sustrato, mediante un proceso de fermentación alcohólica con el empleo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo la producción de etanol. Utilizando el mismo procedimiento de cocción bajo nuevas condiciones de temperatura y tiempo, se evita la ruptura de la inulina para su extracción y cuantificación. Durante el trabajo experimental se utilizan métodos analíticos para determinar

parámetros como el pH, porcentaje de cenizas, proteínas, humedad, sólidos solubles totales y azúcares, con el propósito de caracterizar el jugo extraído. Así como la Absorciometría para realizar las determinaciones cuantitativas de los azúcares totales y reductores. La presencia de inulina y azúcares fermentables, y sus concentraciones se determinan con el empleo de la Cromatografía de alta resolución (HPLC).

Con esta investigación se pretende crear las bases para el aprovechamiento de mostos residuales de agave, así como contribuir a la diversificación y desarrollo económico-tecnológico de la industria henequenera cubana.

## Introducción

El etanol puede producirse de dos formas. La mayor parte de la producción mundial se obtiene del procesamiento de materia biológica, en particular ciertas plantas con azúcares. El etanol así producido se conoce

---

<sup>1</sup> Especialista para la ciencia, la tecnología y el medio ambiente en el Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas (CIQ), La Habana, Cuba. Correo electrónico: milaidi@ciq.minem.cu

<sup>2</sup> Labora en el Instituto Superior Politécnico «José Antonio Echeverría». Correo electrónico: beatriz@quimica.cujae.edu.cu.

<sup>3</sup> Labora en el Instituto Superior Politécnico «José Antonio Echeverría». Correo electrónico: arcadio@quimica.cujae.edu.cu.

como bioetanol. Tradicionalmente se ha producido a partir de las mieles obtenidas de la caña de azúcar.

Brasil, mayor productor de caña de azúcar a nivel mundial en la actualidad, está aumentando la producción de etanol a partir de la misma, cuya producción ha disminuido en los últimos años. Mientras que en China, cuarto mayor productor, la cosecha está siendo perjudicada por una baja rentabilidad. Cuba, que hace muchos años era el mayor productor, hoy solo produce un 10% de lo que producía. En medio de este escenario, se encuentran los estudios del potencial del henequén para la obtención de etanol, que se remontan a principios del siglo pasado cuando el francés Charles Lassus, inicia la extracción del licor de henequén, con positivos resultados.

El henequén es una planta resistente, que presenta ventajas excepcionales como cultivo energético, pues no es alimento, no requiere de riego, ni fertilizantes y necesita de muy poca mano de obra, por lo que su costo de producción es muy bajo. Además de poder ser aprovechada integralmente, debido a sus múltiples usos. El principal consumo es industrial, en la fabricación de cuerdas, sogas, sacos, hilos, etc. También se utiliza para la elaboración de artesanías como alfombras, tapices, tapetes y hamacas. A partir de él se pueden elaborar también bebidas alcohólicas, como el mezcal y el tequila.

El henequén (*Agave fourcroydes*) es una planta monocotiledónea, del género de los agaves, perteneciente a la familia de las Agavaceae. México es el centro de origen de la familia Agavaceae, a la cual pertenecen ocho géneros, entre ellos el género *Agave*.

El henequén de México o fibra de sisal (aunque en España se le llama también henequén de Cuba donde fue introducida en el siglo XVIII) es una fibra dura de la hoja del *Agave fourcroydes*, cultivada principalmente en Yucatán.

En Cuba el cultivo del henequén data desde hace muchos años en diferentes regiones del país; en la provincia de Artemisa, municipio de Mariel: Hene-

quenera «René Arcay», en la provincia de Matanzas, municipio Limonar: Granja Henequenera «Francisco Berdayes», en la provincia de Cienfuegos, municipio Juraguá: Henequenera «Francisco del Sol».

El avance de las fibras sintéticas derivadas del petróleo, con influencia galopante y costos en picada, puso en jaque en el mundo a las naturales, esas tejidas a partir de técnicas y tradiciones milenarias, muchas veces artesanales, transmitidas de generación en generación por quienes dedicaron su vida al oficio.

Cuba no escapó de esa corriente y los campos de las provincias productoras de henequén fueron testigos de cómo ese cultivo fue desvaneciéndose progresivamente, golpeado por sustitutos de importación y limitaciones financieras para mantenerlo con vida. Por ejemplo, si antes el camino al balneario de Varadero se acompañaba de vistas llenas de plantas espinosas que asemejaban coronas de piñas gigantes, con el tiempo prácticamente dejaron de verse, a no ser en espacios aislados y desatendidos.

En los años 80, en el país se llegaron a producir unas 14 000 toneladas de fibra de henequén y hoy, a partir de un programa de recuperación integral desde la parte agrícola hasta la industrial se espera alcanzar en 2016 apenas 570 toneladas, unas 10 más que en 2015, pero proyectando crecimientos progresivos para elevar la sustitución de importaciones.

De acuerdo con José Antonio Quintana, jefe de la rama henequenera del Ministerio de la Agricultura, el rescate integral previsto hasta 2030 comprende incrementar las tierras dedicadas al cultivo: a las 599 hectáreas en producción se les han incorporado otras 1,049 en desarrollo, con el propósito de sembrar cada año 134 hectáreas de henequén, como parte del programa de desarrollo encaminado a incrementar las cosechas y elevar las producciones.

Esta industria hasta 1990 solo aprovechaba la fibra, que mantiene alta demanda en el mercado por sus características, que la diferencian respecto a las de otros agaves. En este proceso de desfibrado se obtie-

nen determinados productos residuales que se desaprovechan, perdiendo importantes cantidades de jugo y pulpa, que representan 40% del volumen de henequén procesado.

Estos elementos se disponen en las costas o se acumulan en terrenos de la periferia y aportan toda su carga orgánica contaminante, afectando el manto freático u otros sistemas (Figura 1). Según los datos reportados por algunas henequeneras cubanas, se producen aproximadamente nueve toneladas de pulpa húmeda por tonelada de fibra procesada y dos litros de jugo por mazo de veinticinco hojas; sin contar las piñas que se dejan abandonadas en el campo después de haber cortado las hojas. La pulpa seca obtenida (fácilmente biodegradable puede ser utilizada como materia orgánica en el propio cultivo y como base en la alimentación animal), los jugos extraídos de las hojas

y las piñas pueden ser fermentados para la obtención de etanol.

Las piñas que se dejan abandonadas en los planteles sin ningún uso económico son consideradas en la actualidad como materia prima fundamentalmente para la obtención de etanol, producido por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas.

El bioetanol de primera generación es aquel que se genera a partir de la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de ciertas plantas. Es un alcohol de 2 carbonos, cuya fórmula es  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ . En este proceso se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible. Productos con alto contenido de sacarosa y almidón, como la remolacha, la caña de azúcar



Figura 1. Pulpa y jugo de henequén vertidos en la Henequenera «Francisco Berdayes» en el municipio Limonar, provincia de Matanzas.

y el maíz, respectivamente, son unas de las materias primas que se utilizan para la producción de etanol. Sin embargo, una de las desventajas más importantes de su uso para este fin, es el lugar que ocupan como parte de la cadena alimenticia del ser humano.

Así como también se conoce la presencia de inulina en este tipo de residual a partir de estudios realizados con el agave *A. americanae*, por investigadores de diferentes instituciones académicas de México. La inulina es un oligosacárido derivado de la sacarosa que se aísla de fuentes vegetales naturales. Básicamente una fibra soluble que promueve los movimientos del intestino, no es degradada por las enzimas humanas ptialina y amilasa, presentes en la saliva y secreción pancreática. De esta manera, este tipo de compuesto se comporta como fibra dietética.

### **Estudios experimentales con las piñas de henequén cubano**

Desde 1992 el Grupo de Fibras Naturales y Tensioactivos del Centro de Estudio de Tecnologías Energéticas Renovables (CETER) y la Facultad de Ingeniería Química del Instituto Superior Politécnico «José Antonio Echeverría» (CUJAE), han desarrollado investigaciones sobre el henequén y su aprovechamiento integral, poniendo en marcha diferentes proyectos para determinar las propiedades de la pulpa y el jugo de las hojas, obteniendo como resultado para el primer caso: cenizas, calcio, magnesio, cloruro, fósforo, celulosa y proteínas, y en el segundo: carbohidratos, proteínas, saponinas, reductores, fosfatos, hierro, calcio y magnesio. Así como se realizaron estudios de fermentación del jugo de las hojas para la obtención de etanol. En el 2007, se incursiona en el estudio de las piñas del henequén, realizando pruebas experimentales para la obtención de etanol y la determinación de inulina a partir del tratamiento de este residuo agrícola.

«Piñas» de henequén le llaman al tallo alrededor del cual están las hojas del henequén. Cuando se quitan las hojas, lo que queda es una bola que parece una piña. La inulina, de cuya mayor parte está compuesta la piña, es el principal carbohidrato que contiene el agave. Es un polisacárido ramificado que actúa como fuente de energía de reserva, un polímero principalmente constituido por unidades de fructosa y un terminal de glucosa. Las unidades de fructosa se adjuntan por un enlace glicosídico<sup>4</sup>  $\beta$  (2→1).

Existen entre veinte y mil unidades de fructosa en las plantas que contienen inulina, siendo llamado los pequeños componentes como fructo-oligosacáridos, que son oligosacáridos naturales (fibra soluble) que contienen fructosa y se encuentran en variedad de plantas y frutos.

### **Obtención de etanol**

El modo de obtención de etanol es a través de fermentación anaeróbica, es decir, en ausencia de aire, generalmente llevada a cabo por bacterias como levaduras. Para este estudio se utilizaron piñas cultivadas en las plantaciones de la Granja Henequenera «René Arcay» del municipio Mariel y «Francisco Berdayes» del municipio Limonar. Se seleccionaron para su evaluación piñas de 7, 12 y 25 años de establecido el cultivo, con el objetivo de evaluar la influencia de la edad y procedencia de la materia prima en los resultados.

Se trocearon manualmente, se pesaron y fueron sometidas a cocción con agua a temperaturas desde 90 hasta 121<sup>o</sup> C por tiempos entre 80 y 100 minutos, con el objetivo de provocar la hidrólisis de la inulina, para su transformación en fructosa y glucosa, convirtiendo el material en piñas de azúcar, para la posterior molienda y extracción del jugo más rico en azúcares.

Los mayores volúmenes de jugo por kg de piña troceada fueron extraídos de las piñas de 25 años

<sup>4</sup> Un enlace glucosídico o glicosídico, es el enlace para unir monosacáridos con el fin de formar disacáridos o polisacáridos.

procedentes de la región de Limonar, lo que se interpreta como la respuesta del henequén al sistema de cultivo y a la época de cosecha (de escasas lluvias), que presenta un efecto muy marcado en la calidad de la materia prima en cuanto al volumen de jugo, así como se distingue un efecto significativo relacionado con la edad de establecido el cultivo, lo que se traduce en un favorable cuidado en su desarrollo, responsable de la riqueza en las plantas adultas.

Para la caracterización del jugo se emplearon métodos analíticos mediante los cuales se determinaron parámetros como el pH, porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas (Método de Weende), porcentaje de proteínas (Método de Biuret), sólidos solubles totales (SST) en  $^{\circ}$ Brix, y azúcares totales y reductores (Determinación cualitativa con el uso del reactivo de Tollens y de Fehling y Determinación cuantitativa utilizando el Método de Absorciometría).

Con estos análisis se obtuvo que la acidez expresada por el pH es superior en las muestras del Mariel, lo que responde a los factores ambientales y al tipo de suelo característico de la región, así como los porcentajes de humedad que se explican por la época del año, correspondiente a períodos de alta humedad relativa que influyen en la capacidad del agave para almacenar agua. En cuanto al porcentaje de cenizas, se observó la misma tendencia, que se atribuye a la riqueza en materia orgánica de los suelos del Mariel.

Sin embargo, el contenido de proteínas y sólidos solubles totales es significativamente mayor en las muestras procedentes de Limonar, aumentando el contenido de los últimos con la edad. Estos resultados se pueden explicar respectivamente, por el tipo de suelo característico de esta zona y la influencia del clima en los procesos fisiológicos básicos, como fotosíntesis y respiración, los cuales determinan en gran parte la cantidad de azúcares que se forman en las hojas y posteriormente se transportan y almacenan en la piña, riqueza que con un desarrollo favorable aumenta en las adultas.

La producción de etanol se llevó a cabo mediante la fermentación de los azúcares presentes y el proceso fermentativo se realizó empleando cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (L/25-7-12) y 1 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada (L/30-5-12). Se inocularon los medios compuestos por: Jugo extraído hidrolizado y diluido a 8  $^{\circ}$ Brix con agua destilada, pH ajustado a 4 y como fuente de nitrógeno 2,25 g/cm<sup>3</sup> de Sulfato de Amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se cultivó durante 18 – 20 horas a 30 ± 10C. Jugo extraído hidrolizado y diluido a 10  $^{\circ}$ Brix con agua destilada, pH ajustado a 4 y suplementado con miel final de caña clarificada hasta alcanzar 12 $^{\circ}$  Brix y 2,25 g/cm<sup>3</sup> de sulfato de amonio.

El tiempo de fermentación fue de 48 horas, sin agitación. Se tomaron muestras cada 8 horas y se determinó pH, azúcares reductores y producción de etanol. En este proceso fermentativo, se trabajó con un medio con las características necesarias para una conversión bioquímica satisfactoria.

Por esta razón es que dentro de la composición se incorporó el Sulfato de Amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como nutriente que contribuye al crecimiento del microorganismo y se garantizó la concentración adecuada de los carbohidratos (azúcares), con cuyo objetivo se realizó la mezcla jugo cocido–miel final de caña, así como las condiciones asépticas del medio, mediante la esterilización de las muestras.

El pH fue ajustado a cuatro debido a que por este valor oscila el adecuado para iniciar la fermentación, por requerimientos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleada, cuya selección fue debido a que se considera la más idónea para consumir todos los azúcares fermentables y por tanto asegurar el proceso. Todos estos, factores que pudieran limitar o detener el proceso.

El porcentaje de etanol (volumen de etanol en el cuerpo/volumen de mosto fermentado) y la concentración de los azúcares se determinaron mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Antes

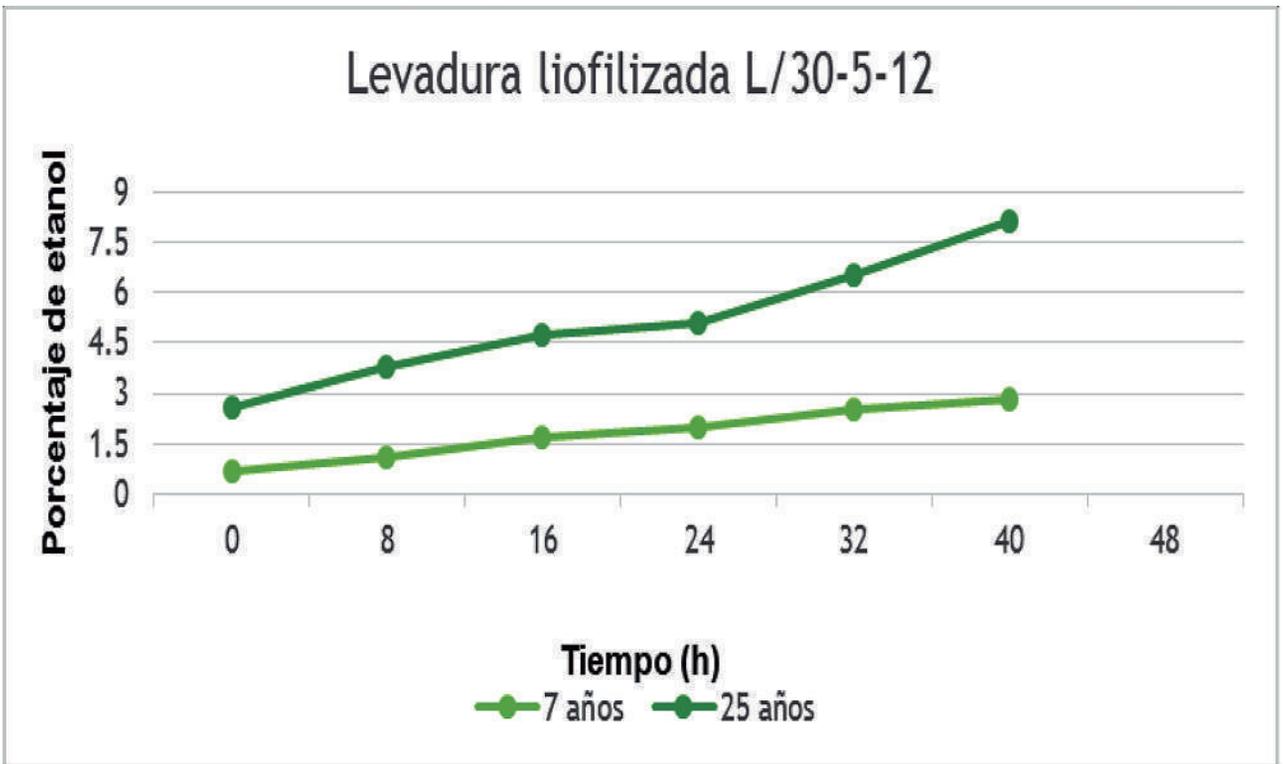
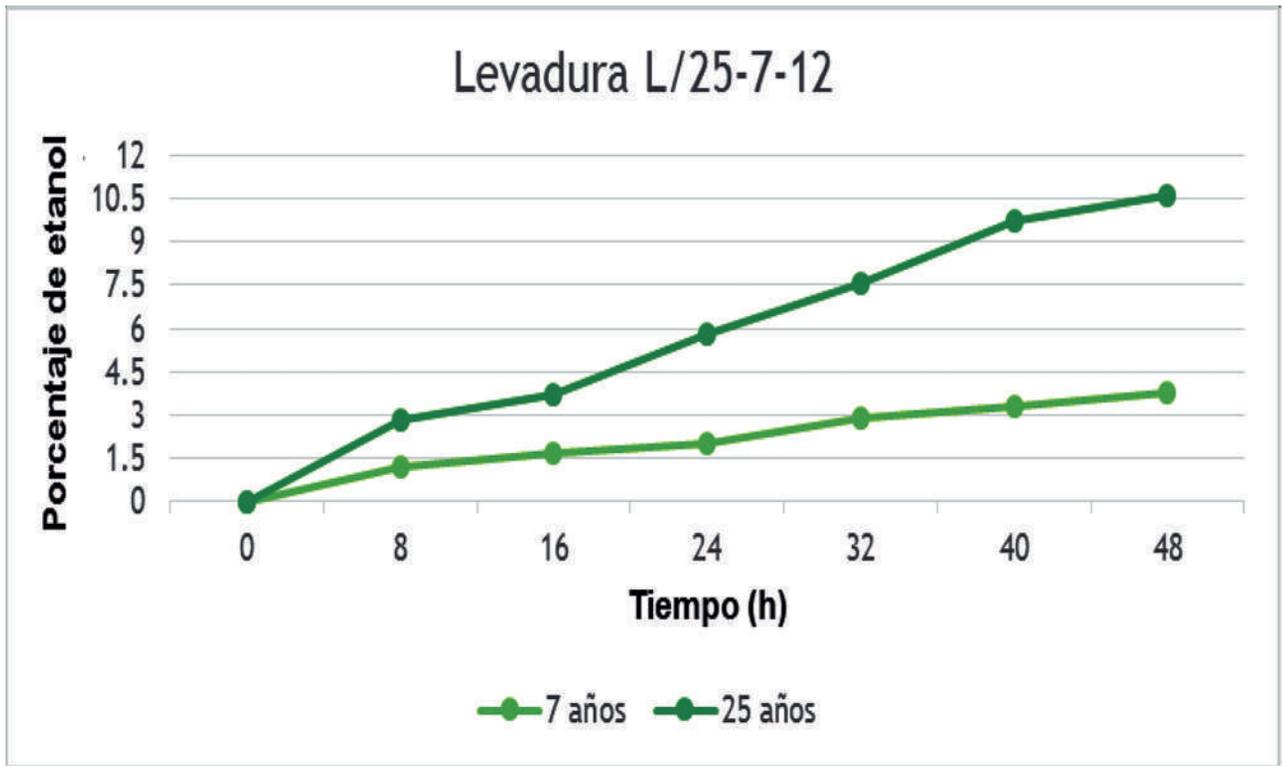


Figura 2. Producción de etanol en el tiempo.  
Elaboración propia.

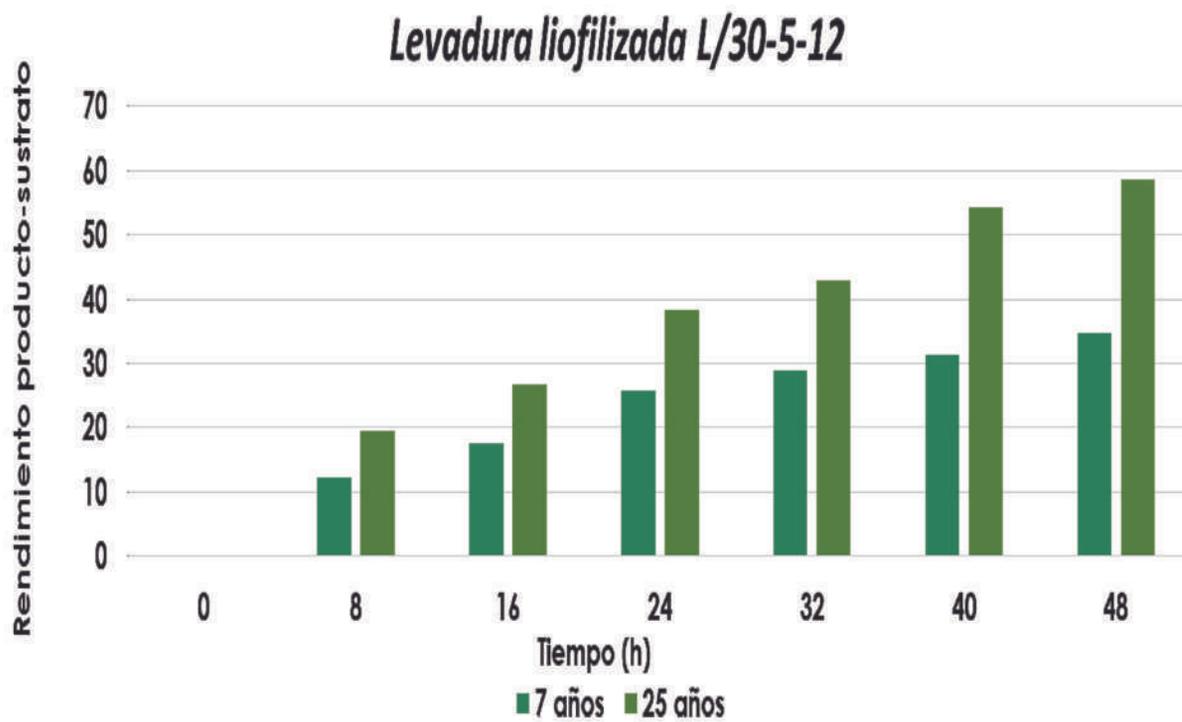
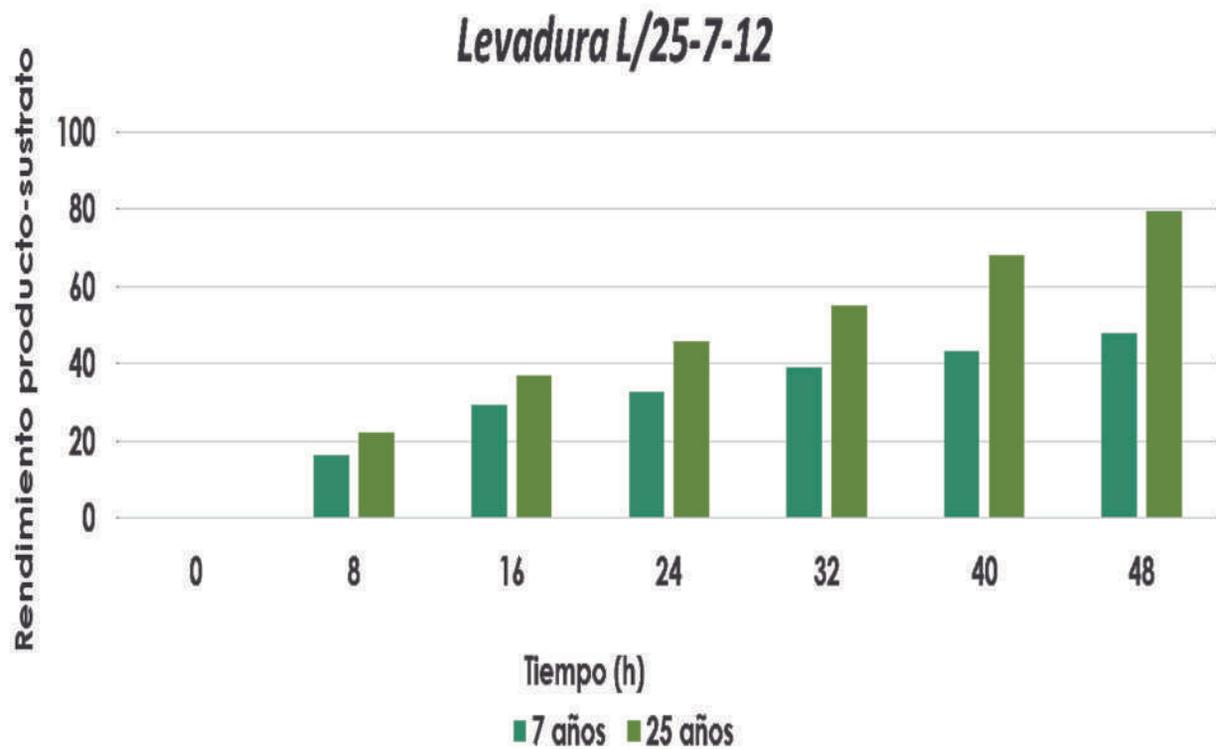


Figura 3. Rendimiento producto – sustrato en el proceso fermentativo.

Elaboración propia

de la fermentación no se observa la presencia de etanol como consecuencia de que no se ha iniciado el proceso de conversión bioquímica y por la misma razón la concentración de azúcares es alta. Después de la fermentación, se evidencia la presencia del etanol producido con la disminución de la concentración de glucosa fundamentalmente, como consecuencia de su degradación en primer lugar durante el proceso fermentativo.

De forma gráfica, se presenta la producción de etanol en el tiempo y los rendimientos productosustrato para las muestras de 7 y 25 años correspondientes al municipio de Limonar, donde se obtuvieron los mejores resultados.

Atendiendo a la interpretación de los resultados cromatográficos obtenidos y la información brindada por los gráficos, las mejores producciones de etanol corresponden a la variante de jugo cocido de piñas de 25 años de la región de Limonar, fermentado con levadura L/25-7-12. Lo que indica que los porcentajes de etanol que se producen aumentan con la edad de la planta, debido a la característica del henequén de almacenar carbohidratos no estructurales de reserva en la piña. Por otra parte, la estacionalidad y la edad afectan la asimilación de CO<sub>2</sub> y la producción de azúcares no estructurales, ligada positivamente con la producción de etanol.

### **Determinación de inulina**

Las piñas troceadas fueron sometidas a cocción con agua, a temperatura de 80°C y durante 60 minutos, garantizando el tratamiento de la materia prima sin producir la hidrólisis o ruptura de la inulina. Mediante la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinó la presencia de inulina y su concentración, así como la de los azúcares fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y dextrana.

Siendo la inulina un polisacárido de gran masa molecular, menor debe ser su tiempo de retención. En cada cromatograma obtenido se observó que hay una coincidencia en cuanto a la señal a menor

tiempo de retención (5 minutos aproximadamente), que se asumió como característica de la inulina. Con fines comparativos se analizó una muestra de inulina pura donde se apreció la señal de manera similar. Tanto la inulina como los azúcares se cuantificaron mediante la determinación del área bajo la curva, a partir de los patrones correspondientes.

Se realizó un diseño experimental factorial multinivel 2<sup>1</sup>\*3<sup>1</sup> para el estudio del efecto de los factores, Edad (7, 12 y 25 años) y Procedencia de las piñas (Henequenera de Limonar y del Mariel), con dos variables respuesta, Porcentaje de etanol y Contenido de inulina, utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. Los resultados obtenidos del procesamiento estadístico indican que la variable que influyó tanto en el contenido de inulina como en la producción de etanol es la edad de la planta. Se evaluó la calidad de cada uno de los modelos para lo cual se realizó el análisis de la varianza, que demostró que presentaron un buen ajuste a los datos experimentales, para un 95% de confiabilidad.

### **Conclusiones**

Los mayores volúmenes de jugo por kg de piña troceada fueron extraídos de las piñas de 25 años procedentes de la región de Limonar. De la caracterización de estos jugos se puede concluir que en respuesta a los factores ambientales, como períodos de alta humedad relativa, la época del año, el tipo de suelo y su riqueza en materia orgánica, en las muestras procedentes de la henequenera del municipio del Mariel se obtuvieron los mayores valores de pH, porcentaje de humedad y cenizas. Mientras el contenido de proteínas y sólidos solubles totales significativamente mayor en las muestras de la granja del municipio Limonar. Con tendencia a un aumento en los valores de estos parámetros con la edad, se explica por el tipo de suelo característico de esta zona y la influencia del clima en los procesos fisiológicos básicos, como fotosíntesis y respiración, que determinan en gran parte la riqueza en azú-

cares de las piñas adultas. Para completar el estudio de la composición química del jugo de las piñas, se recomienda determinar el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina, grasas y minerales.

Los resultados obtenidos con el método de cocción con agua a temperatura de 80<sup>0</sup> C y tiempo de 60 minutos, indican que es posible evitar la ruptura de la inulina y realizar su extracción. Mediante su cuantificación se concluye que en las muestras de las piñas de 25 años provenientes del municipio de Limonar se obtienen las mayores concentraciones. Se sugieren futuras investigaciones, aplicando el método de cocción utilizando otras soluciones.

Los mejores resultados de producción de etanol y rendimiento producto–sustrato mediante la fermentación de los azúcares presentes en el material cocido, fueron los correspondientes a la variante de 25 años de la región de Limonar con el empleo de la cepa *Saccharomyse cerevisiae* L/25-7-12, cepa pura, que se conoce es capaz de producir altas concentraciones de etanol en el medio. Sin embargo, sería conveniente estudiar este proceso fermentativo con el empleo de otras levaduras o combinaciones de estas, en busca de incrementar la producción de etanol. Así como escalar a nivel de Planta Piloto, los resultados obtenidos a nivel de laboratorio y continuar con los estudios para el aprovechamiento integral del henequén cubano.

### Referencias bibliográficas

- Cáceres Farfán, Mirbella. P. L. (2004). Producción de etanol a partir de jugo de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y melaza utilizando una mezcla de levaduras. Obtenido de XIII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería: <http://www.smbb.com.mx>
- Colunga, Patricia. M. G. (2008). El futuro de lo ancestral. Obtenido de <http://www.ecosu.academia.edu>
- Gómez Ayala, Rocío del Carmen. J. A. (2010). *Aprovechamiento integral del Agave*. Obtenido de <http://www.infotecnia.com.mx>
- Gómez Ayala, Rocío del Carmen. J. A. (2004). Extracción de la inulina y azúcares del agave con métodos químicos. Obtenido de *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. Edición especial No. 1: <http://www.respyn.uanl.mx>
- Lagorreta, P. (2002). Method for processing agave, the compositions obtained and uses thereof: Preparation of inulin products. Obtenido de WIPO Patent Application WO/2002/066517: <http://www.sumobrain.com>
- Sierra, R. (2016). El regreso de un viejo amigo. Obtenido de *Semanario Económico y Financiero de Cuba*: <http://www.juventudrebelde.cu>
- Vázquez, H. J. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Obtenido de *Revista Científica Ingeniería, Investigación y Tecnología*: <http://www.revistas.unam.mx>

