

XVIII ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES

Área: Ciencias Biológicas

Sub-área: Biotecnología

Grupo X

PRODUCCION DE ETANOL A PARTIR DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DE LA SIDRA.

Spesot, Valeria Soledad

Dpto. de Medio Ambiente, Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

INTRODUCCION

El proceso de producción de sidra comprende la fermentación alcohólica de jugo de manzana, proceso biológico mediado por levaduras que se encuentran naturalmente presentes en la fruta o que se incorporan a través de un inóculo de cepas seleccionadas. Finalmente, el medio fermentado es endulzado a través del agregado de azúcares (normalmente jarabe de maíz de alta fructosa o sacarosa) para obtener el producto final.

Se han identificado algunos efluentes líquidos de fabricas de sidra como potenciales fuentes para la recuperación y/u obtención de productos de valor agregado. En particular se destacan: las mermas de fermentación, fraccionamiento y/o envasado de sidra, el producto que retorna del mercado por falta de gas o por estar próximo a la fecha de vencimiento y el producto descartado durante el proceso de fabricación y/o envasado por no satisfacer políticas de calidad.

Estos efluentes exhiben una elevada carga orgánica dado su contenido de azúcares y etanol, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) que puede alcanzar valores tan altos como 180.000 mgO₂/L. Esto hace necesario su tratamiento previo al vertido en un cuerpo receptor.

El contenido de carbohidratos sugiere la posibilidad de utilizar los efluentes como materia prima para la producción de etanol a través de una fermentación alcohólica utilizando levaduras. Si bien la naturaleza de los mismos es por su origen similar a la de los de la industria cervecera, la investigación de su aprovechamiento para la producción de etanol presenta algunas variantes y desafíos que no han sido abordados en la literatura.

Por ello, en el estudio de la posible utilización de efluentes de sidra como "materia prima" para la producción de etanol, resulta de interés investigar el efecto de suplementar los medios con diferentes fuentes de micro y macro nutrientes.

OBJETIVOS

Estudiar el efecto de suplementar los efluentes líquidos de fábricas de sidra con fuentes de macro y micronutrientes inorgánicos, a través de diseños experimentales. Establecer las concentraciones mínimas de biomasa, nutrientes, y tiempo de fermentación necesarios para llevar a cabo una fermentación exitosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los ensayos de fermentación se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Var. Windsor (Lallemand Brewing Co., Felixstowe, UK. Esta se mantuvo en medio sólido YPG (30 g/L de sacarosa, 3 g/L extracto de levaduras y 2 g/L de peptona de carne) y se propagó mensualmente.

Se utilizó como medio de fermentación sidra comercial adquirida en el comercio local.

Proyecto CAI+D: "Procesos de Tratamiento de Efluentes de Industrias de Bebidas con Obtención Simultánea de Bioetanol, Ácido Acético y Biomasa de Levaduras".

Director del proyecto: Islas, Miguel

Director del trabajo: Seluy, Lisandro

XVIII ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES

Área: Ciencias Biológicas

Sub-área: Biotecnología

Grupo X

Previo a la fermentación, el inóculo se desarrolló con agitación constante durante 12 horas a 30 ± 0.1 °C en medios de cultivo YPG. La biomasa se separó por centrifugación, se realizaron lavados con agua destilada, se determinó la concentración y se resuspendió en un volumen adecuado de medio de fermentación. Previamente se ajustó el pH del medio de fermentación y se suplementó según la experiencia con las siguientes sales minerales: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 y ZnSO_4 . Para establecer las concentraciones que influyen sobre la fermentación se plantearon diseños experimentales de cribado, factorial y Plackett-Burmann.

Los ensayos de fermentación alcohólica se realizaron en reactores de 100 mL con salida de gases, en agitación constante y a temperatura de $30 \pm 0,1$ °C. Se extrajo 1 mL de muestra a tiempo inicial y final, la cual se centrifugó a 6500 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se almacenó para las determinaciones de etanol, azúcares reductores, glicerol y el pellet se utilizó para determinar la concentración de biomasa. Éste último se resuspendió con agua destilada (1 mL), se realizó la dilución correspondiente y se determinó su absorbancia a 600 nm. El resultado se contrastó con una curva de calibrado construida previamente entre absorbancia y sólidos suspendidos volátiles determinados por técnicas estándar. La concentración de etanol se midió con un equipo estático basado en un sensor de óxido de estaño. Al finalizar el ensayo, luego de separar la biomasa por centrifugación, el etanol también se determinó por picnometría. La concentración de azúcares reductores se determinó por el método del ácido dinitrosalicílico y la concentración de glicerol se determinó a través de un kit enzimático.

Estudios anteriores realizados por el grupo de trabajo, demostraron el efecto adverso de los conservantes presentes en sidra (dióxido de azufre y sorbato de potasio), el cual se minimizó ajustando el pH de la misma a 5 previo a la fermentación, por lo que ese valor de pH fue utilizado para todas las fermentaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experiencias previas en el grupo de trabajo, demostraron que suplementando la sidra con sales en una concentración de 5 g/L ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2,5 g/L MgSO_4 y 5 mg/L ZnSO_4), es suficiente para llevar a cabo una fermentación exitosa de los azúcares de la sidra, inoculando la misma con 2 g/L de levaduras (Berron, et al. 2015).

Con el objeto de reducir los costos y de disposición final de la biomasa producida, se estudió el efecto de utilizar distintos valores de inóculo utilizando esta combinación de sales. Se llevaron a cabo cuatro fermentaciones, las cuales se inocularon con 0,25- 0,5- 0,75 y 1 g/L de levaduras.

Se observó un consumo total de los azúcares, con similares rendimientos en etanol, para los cuatro casos (Figura 2). Sin embargo, el tiempo de fermentación fue muy

Proyecto CAI+D: "Procesos de Tratamiento de Efluentes de Industrias de Bebidas con Obtención Simultánea de Bioetanol, Ácido Acético y Biomasa de Levaduras".

Director del proyecto: Islas, Miguel

Director del trabajo: Seluy, Lisandro

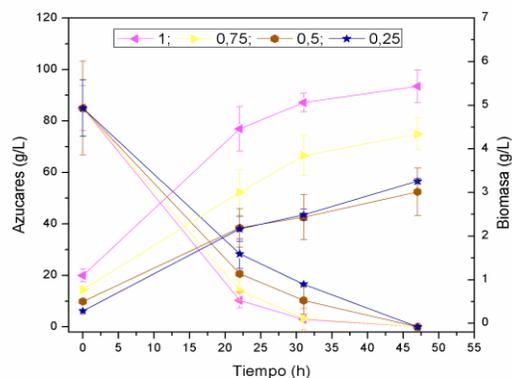


Figura 1. Efecto del inóculo inicial sobre el crecimiento de biomasa y consumo de azúcares

XVIII ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES

Área: Ciencias Biológicas

Sub-área: Biotecnología

Grupo X

superior en el reactor inoculado con 0,25 g/L, lo que podría ser perjudicial para la estabilidad microbiológica del proceso, en una escala industrial. Por esto se adoptó para los ensayos posteriores, una concentración de biomasa inicial de 0,5 g/L.

Tomando en consideración que la concentración de sales estudiada, permitió el consumo total de los azúcares, con excelente producción de etanol en el tiempo estudiado, y con el objeto de minimizar el consumo de nutrientes, se estudió el efecto individual de los principales macro y micronutrientes (N, P y Mg), a través de un diseño factorial, en un rango inferior de concentraciones. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,67-5 g/L); Na_2HPO_4 (1,52-4,55 g/L) y MgSO_4 (0,83-2,5 g/L). En la tabla 1 se presenta el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la producción de etanol.

Si bien los factores influyeron positivamente, ninguno lo hizo de forma significativa sobre la producción de etanol.

Considerando que este grupo de sales estudiadas fueron identificadas utilizando un medio sintético (Comelli et al, 2015), y dado que la sidra es un medio complejo, que contiene entre otros minerales, magnesio y fósforo,

se estudió la influencia a través de un diseño de placket-burmann, de éstas y otras sales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2HPO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 , K_2SO_4), reportadas por ejercer un efecto positivo sobre la fermentación alcohólica (Walker et al., 2004). La figura 2, muestra que los únicos factores que influyen significativamente sobre la producción de etanol son el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el ZnSO_4 . El FeSO_4 ejerce un efecto positivo importante, por lo que se lo incluyó en el análisis posterior.

Finalmente se realizó un estudio complementario, para confirmar el efecto de estos tres compuestos, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 y FeSO_4 , a los cuales se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Se realizaron 4 reactores, el primero con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ZnSO_4 , FeSO_4 , el segundo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 y FeSO_4 , el tercero con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 y el cuarto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Proyecto CAI+D: "Procesos de Tratamiento de Efluentes de Industrias de Bebidas con Obtención Simultánea de Bioetanol, Ácido Acético y Biomasa de Levaduras".

Director del proyecto: Islas, Miguel

Director del trabajo: Seluy, Lisandro

Tabla 1.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Amonio	0,588613	1	0,588613	0,13	0,7767
B:Fosforo	6,86351	1	6,86351	1,56	0,4297
C:Magnesio	3,11251	1	3,11251	0,71	0,5547
AB	4,66651	1	4,66651	1,06	0,4905
AC	2,77301	1	2,77301	0,63	0,5727
BC	25,5255	1	25,5255	5,81	0,2504
Error total	4,39561	1	4,39561		
Total (corr.)	47,9253	7			

R-cuadrada = 90,8282 por ciento; R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 35,7974 por ciento

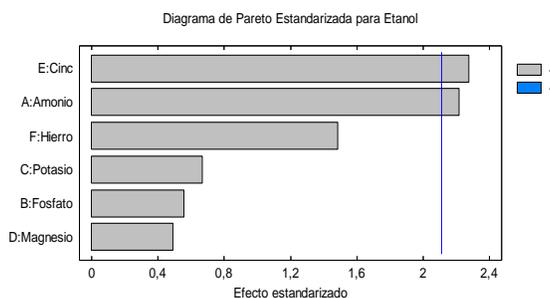


Figura 2. Diagrama de Pareto. Diseño Placket-Burmann

XVIII ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES

Área: Ciencias Biológicas

Sub-área: Biotecnología

Grupo X

La figura 3 muestra el promedio de la producción de etanol para todos los casos. Se observa que los reactores que contienen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 y FeSO_4 , presentan un rendimiento significativamente mayor al resto, indicando la influencia positiva de estos tres compuestos.

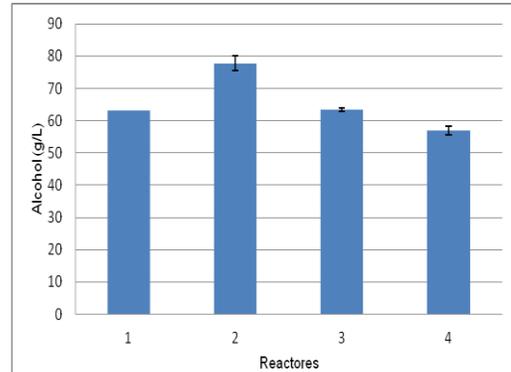


Figura 3. Efecto de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 , FeSO_4 , y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sobre la producción de etanol

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que es posible utilizar un proceso de fermentación alcohólica de los carbohidratos contenidos en ciertos efluentes de la industria de sidra, para producir bioetanol, previo ajuste de pH y agregado de nutrientes.

Se demostró que una concentración mínima de levaduras de 0,5 g/L, permite consumir los azúcares en menos de 48 h.

Se estudio el efecto sobre la fermentación alcohólica, de un amplio grupo de sales como nutrientes, observandose que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 y FeSO_4 ejercen un efecto significativo.

Como continuación de este trabajo se optimizarán las concentraciones de estos tres compuestos a través de la metodología de superficie de respuesta.

BIBLIOGRAFIA

AD, Clescerl LS, Greenberg AE., (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. New York: American Public Health Association.

Barford J.P., Johnston J.H., Mwesigye P.K., (1995). "Continuous culture study of transient behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* growing on glucose and fructose". J. Ferment. Bioeng. 79, 158-162.

Isla M.A., Comelli R.N., Seluy L.G., (2013). "Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production". Bioresour. Technol. 136 140–147.

Miller, G.L., (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428.

Peng B., Yue T., Yuan Y., (2008) "A fuzzy comprehensive evaluation for selecting yeast for cider Making". Int. J. Food Sci. Technol., 43, 140–144.

Suárez Valles B., Pando Bedriñana R., Fernández Tascón N., Querol Simón A., Rodríguez Madrera R., (2007). "Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider". Food Microbiol., 24(1), 25-31.

Proyecto CAI+D: "Procesos de Tratamiento de Efluentes de Industrias de Bebidas con Obtención Simultánea de Bioetanol, Ácido Acético y Biomasa de Levaduras".

Director del proyecto: Islas, Miguel

Director del trabajo: Seluy, Lisandro