

Estudio del proceso de fermentación alcohólica mediante la adición de una sal orgánica

L. López Zamora¹, D. Rivera Martínez¹, E. Bolaños Reynoso¹, M.G. Aguilar Uscanga²

¹Departamento de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba, Av. Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320, Orizaba Veracruz. México

²Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz, Miguel Ángel de Quevedo 2779, Formando Hogar, Veracruz, Ver. 91897, México

*llopezz02@yahoo.com.mx

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

El sorgo dulce es una materia prima atractiva para la producción de etanol, logrando ser una fuente de energía renovable para sustituir los combustibles fósiles. El objetivo de este trabajo fue maximizar la producción de etanol empleando la levadura *S. Cerevisiae* ITV-01, analizando el estudio cinético sobre la influencia del consumo del sustrato y la generación de producto por medio de la adición de un complejo orgánico (Urea) a diferentes cargas variando la concentración celular inicial a partir de un diseño factorial 2² con tres puntos centrales, el sustrato se suplementó con las siguientes sales inorgánicas KH₂PO₄ (2.92 g/L), MgSO₄ .7H₂O (0.75 g/L) y extracto de levadura (2 g/L). Se generó una concentración máxima de etanol en el jugo de sorgo dulce (JSD) de 58.30 g/L a las 18 h, con urea (3 g/L) y concentración celular (3x10⁶ cell/mL) obteniendo una productividad de Q= 3.23 g/Lh, un rendimiento etanol/sustrato Yp/s= 0.40 g/g.

Palabras clave: Fermentación, sales orgánicas, etanol, diseño factorial

Abstract

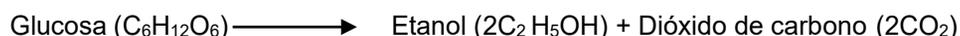
Sweet sorghum is an attractive raw material for ethanol production, making it a renewable energy source to replace fossil fuels. The objective of this work was to maximize ethanol production using *S. Cerevisiae* ITV-01 yeast, analyzing the kinetic study on the influence of substrate consumption and product generation through the addition of an organic complex (Urea) to different loads varying the initial cell concentration from a factorial design 2² with three central points, the substrate was supplemented with the following inorganic salts KH₂PO₄ (2.92 g/L), MgSO₄ .7H₂O (0.75 g/L) and yeast extract (2 g/L). A maximum concentration of ethanol in the sweet sorghum juice (JSD) of 58.30 g/L was generated at 18 h, with urea (3 g/L) and cell concentration (3x10⁶ cell/mL) obtaining a productivity of Q = 3.23 g/Lh, a yield ethanol/substrate Yp/s = 0.40 g/g

Key words: Fermentation, organic salt, ethanol, factorial design

Introducción

El bioetanol es una energía alternativa para sustituir los combustibles fósiles. Su producción se puede lograr a través de procesos de fermentación microbiana a partir de muchos residuos agrícolas que se producen localmente, son baratos y abundantes, el cual puede aliviar la crisis energética mundial debido que contiene 35% O₂, por lo cual reduce emisiones de hidrocarburos, monóxidos de carbono y oxinitruro [Thani y col 2017]. Dicho alcohol constituye alrededor del 90% del biocombustible producido a escala mundial [Bueno y col. 2009].

La reacción biológica que sucede para llevar a cabo la producción de etanol, que permite transformar los azúcares en alcohol y dióxido de carbono se representa mediante la siguiente reacción [Montes y col. 2017]:



La *Saccharomyces cerevisiae*, es una de las especies de levadura usada con más frecuencia. El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por un gramo de glucosa [Vázquez y Dacosta, 2007].

El bioetanol de segunda generación se produce a partir de una biomasa que es neutra en carbono o negativa en términos de su impacto en las concentraciones de CO₂ en la atmósfera. Es más probable que los materiales lignocelulósicos sean un sustrato renovable sustancial para la producción de bioetanol sin competir con la producción de alimentos y con la alimentación animal [Pandiyán y col. 2018].

El jugo de sorgo dulce (JSD) se ha ocupado como sustrato para la obtención de etanol, debido a su alto contenido de nutrientes, el cual está alcanzando importancia a nivel mundial y es definido como un cultivo bioenergético promisorio, por su gran producción de masa verde, mínimos requerimientos generales y su tolerancia a enfermedades además de sequías e inundaciones que puede suplementar el uso de la caña de azúcar en la producción de etanol [Bueno y col. 2009]. El jugo que se obtiene de los tallos está compuesto básicamente por sacarosa, glucosa y fructuosa, cuyas proporciones dependen de la variedad, temporada de cosecha, etapa de madurez y las condiciones climáticas. Los azúcares simples en el jugo de sorgo dulce representan de 53 a 85% de sacarosa, de 9 a 33% de glucosa y de 6 a 21% de fructuosa. Los sólidos que se encuentran en el tallo del sorgo cuya composición de humedad se encuentra alrededor del 73% se dividen en carbohidratos estructurales y no estructurales. La composición de los carbohidratos estructurales, está dada por celulosa, hemicelulosa y lignina, que representan 12% del peso del tallo pudiendo ser hidrolizados y utilizados como sustrato para la producción de etanol [Chuck y col. 2011].

En términos generales la fermentación se puede definir como un proceso de biotransformación en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos conocidos como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores, en este caso capaces de convertir las hexosas del mosto en etanol cuando las condiciones son anaeróbicas [Agrowaste, 2013].

Para la fermentación alcohólica además del mosto se requiere un biocatalizador que sea capaz de afectar enzimáticamente determinados grupos químicos del sustrato. Los sustratos orgánicos sobre los que actúan los microorganismos tienen un doble papel: primero como fuente de nutrientes para dicho biocatalizador y el segundo como fuente de energía. Se logra la transformación de los azúcares en alcohol mediante transformaciones bioquímicas por la acción de levaduras, esto se debe bajo condiciones de crecimiento anaeróbico mediante la compleja vía de Embden-Meyerhof-Parnas, a través de esta vía, el piruvato producido durante el catabolismo es procesado por la piruvato descarboxilasa a acetaldehído y CO₂, se produce entonces el etanol a partir de acetaldehído mediante la reducción por la enzima alcohol deshidrogenasa [Agrowaste, 2013].

Se ha demostrado que el nitrógeno es uno de los micronutrientes más importantes para mantener el metabolismo de las levaduras. El nitrógeno es un elemento fundamental para la síntesis de aminoácidos, proteínas, y otros metabolitos fundamentales en la fisiología de las levaduras. Los iones amonio pueden ser aportados por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, sulfato de amonio, urea, peptona u otros derivados proteínicos solubles. Estas formas de nitrógeno orgánico son conocidas como nitrógeno asimilable por las levadura (NAL, o YAN por sus siglas en inglés) [Uribe, 2007].

El objetivo de esta investigación fue maximizar la producción de etanol, mediante la adición de una sal orgánica aplicando un método de superficie de respuesta (MSR)

Metodología

Materiales

Se empleó jugo de sorgo dulce proporcionado por el Instituto Tecnológico de Veracruz de la variedad "RB Cañero". Levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y urea marca Marbe.

Condiciones de precultivo

EL precultivo fue llevado a cabo en un matraz de 250 mL con un medio líquido de 100 mL enriquecido con sales orgánicas (KH_2PO_4 , 5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L) y extracto de levadura 1 g/L. Manteniéndolo con una agitación de 200 rpm, 30 °C durante 12 h.

Condiciones de cultivo

Las cinéticas de fermentación alcohólica se realizaron en matraces de 250 mL con un volumen de operación de 160 mL de azúcares fermentables a 30 °C, 200 rpm durante 18 h, para realizar las cinéticas se aplicó un diseño de experimento 2^2 con tres puntos centrales, siendo las variables independientes la urea (3, 4.5 y 6 g/L) y la concentración celular (3×10^6 , 6×10^6 y 9×10^6 Cell/mL). Los datos experimentales fueron evaluados a partir del análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de $P=0.001$, empleando el software estadístico NCSS Minitab 18

Metodos analiticos

La determinación de biomasa se realizó mediante análisis de densidad óptica (DO) evaluada a una longitud de onda de 620 nm mediante un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, USA) empleando celdas de cuarzo con una trayectoria óptica de 10 mm, realizando las diluciones necesarias para obtener lecturas de absorbancias por debajo de 0.8, que posteriormente se llevó a una correlación mediante un polinomio de primer orden reportando la biomasa generada en g/L.

La cuantificación de azúcares fermentables y etanol se realizaron mediante un HPLC (Waters 600 TSP Spectra System, Water, Milford MA, USA) usando una columna Shodex SH 1011 (8 x 300 mm), a 55 °C, con una fase móvil de ácido sulfúrico 5 mM, a una tasa de flujo de 0.6 mL min^{-1} y un detector de índice de refracción a 50 °C (Water 2414, TSP Refracto Monitor V, Waters, Milford MA, USA).

Resultados y discusión

Determinación de azúcares y pH

El JSD variedad RB-Cañero presentó un alto contenido de azúcares fermentables 150 g/L, encontrándose en el rango reportado por Partida [2017]. El pH del jugo obtenido fue de 5, este valor se encuentra dentro de los valores ideales para los procesos de fermentación, ya que para la obtención de etanol mediante *S. cerevisiae* ITV-01 los mejores resultados obtenidos para producir etanol con menores concentraciones residuales de azúcares se encuentran en un rango de pH de 3.5-5.5 reportado por Ortiz [2010]), siendo el pH de 5.5 el más óptimo para la levadura.

Producción de etanol

El efecto de las condiciones de validación se evaluaron con una concentración de urea de 3 g/L y la concentración inicial de inóculo 3×10^6 cell/mL en la producción de etanol generó una cinética producto-sustrato (Figura 1) que alcanzó una concentración de etanol de 58.30 g/L. Khalit y col. [2015] realizaron un estudio de producción de etanol a partir de cepas de *S. Cerevisiae* en JSD alcanzando una concentración de etanol de 48.8 g/L siendo 16.30 % menor a la concentración de alcohol obtenido por este trabajo

Las condiciones de maximización generaron un consumo de sustrato del 100% en la cinética, con una concentración inicial de azúcares fermentables de 148 g/L, permitiendo generar una máxima concentración de biomasa de 11.70 g/L cuyo comportamiento cinético se muestra en la Figura 2 y una concentración celular de 2.01×10^8 cell/mL ocurrida a las 12 h del proceso de fermentación, tiempo en el que se alcanza el mayor consumo de sustrato de 56.33% como se observa en la Figura 3.

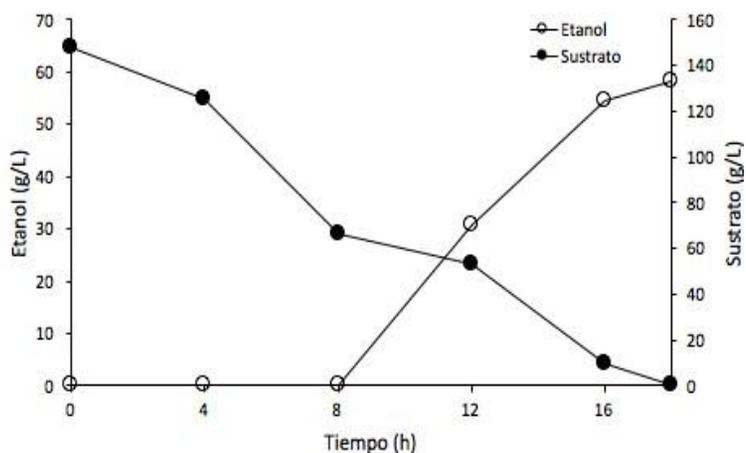


Figura 1. Cinética: suplementado por urea (3 g/L), KH_2PO_4 (2.92 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.75 g/L) y extracto de levadura (2 g/L)

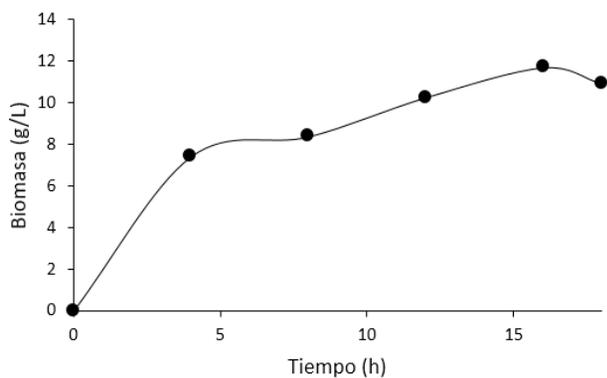


Figura 2. Comportamiento cinético de biomasa en JSD

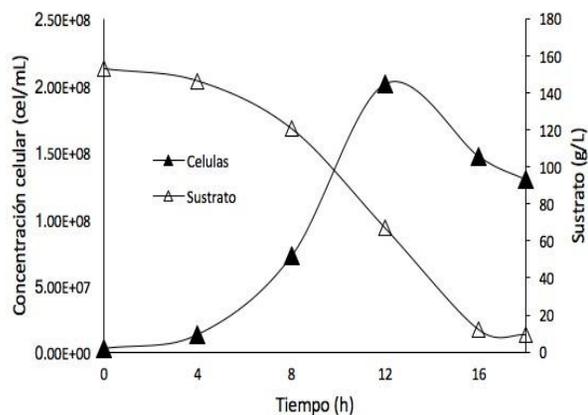


Figura 3. Cinética de consumo de sustrato y crecimiento celular durante el proceso de fermentación

Respecto a la formación de inhibidores la cinética, se formó glicerol alcanzando una concentración máxima de 7.75 g/L presente a la hora 16 (Figura 4). Wijaya y col. [2018] obtuvieron una concentración de glicerol de 12.40 g/L en cultivos de JSD a partir de cepas *S. Cerevisiae*, siendo 60 % mayor a la concentración de glicerol obtenido en este trabajo.

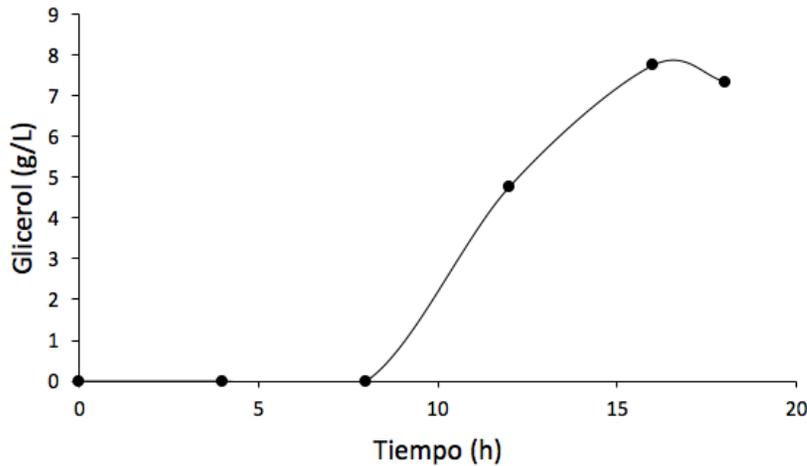


Figura 4. Cinética de formación de glicerol en cinética de validación

Los parámetros de la cinética de máxima producción de etanol, obtuvo una productividad de $Q=3.23$ g/Lh que supera en un 49.53% al valor reportado por Partida [2017] quien obtuvo una $Q=2.16$ g/Lh y a Ratnavathi y col. [2010] con una $Q=1.25$ g/Lh, mientras que el rendimiento etanol/sustrato (Y_p/s) de este trabajo fue de 0.40 g/g superando en un 2.56% al valor reportado por Ortiz (2010) de $Y_p/s=0.39$ g/g y en 8.1% a Wijaya y col. [2018] quien obtuvo $Y_p/s=0.37$ g/g.

Análisis de contornos

Se localizaron dos áreas máximas de obtención de etanol a partir del gráfico de contornos (Figura 5) se puede observar que la máxima producción de etanol ocurre en un intervalo de 3 a 3.37 g/L de urea mientras que la concentración de células va de 3×10^6 a 3.66×10^6 cell/mL alcanzando y asegurando una producción de etanol de 58.30 g/L siendo 2.84% mayor a la concentración de la segunda región máxima en un intervalo de 5.37 a 6 g/L de urea y 7.73×10^6 a 9×10^6 cell/mL con una concentración de etanol de 56.69 g/L, esto puede ser debido a que menor sea la concentración celular inicial, las levaduras tiene mayor aprovechamiento de reproducción en su fase exponencial a partir del abundante sustrato disponible.

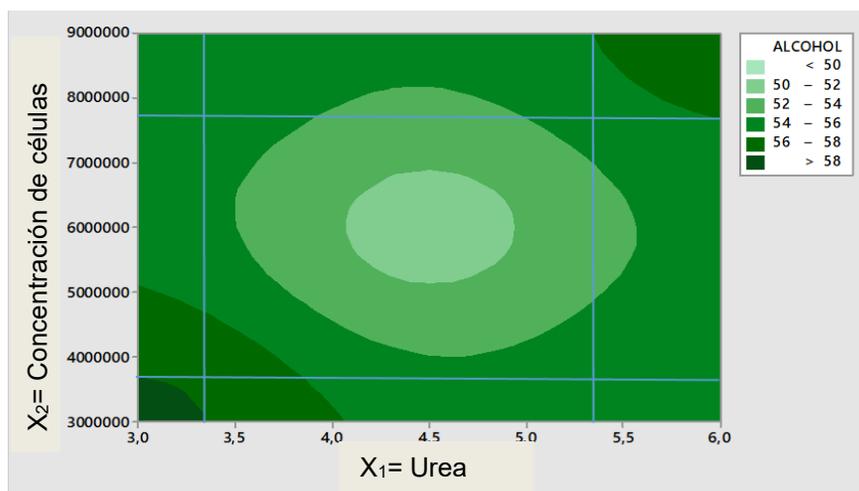


Figura 5. Gráfico de contornos: tendencia de optimización de las regiones de experimentación de diseño de 2^2 con tres puntos centrales para la producción de etanol

Análisis de gráficos de superficie de respuesta (GSR)

La maximización de la producción de etanol se encuentra en las regiones experimentales de los niveles bajos de la superficie de respuesta (Figura 6) (GSR) permitiendo localizar a la máxima producción de etanol se obtiene con una concentración de urea de 3 g/L y una concentración de células de 3×10^6 cell/mL, además se observó que el aumento progresivo de la concentración de ambos factores minimizaron la producción de etanol como ocurre en los puntos centrales.

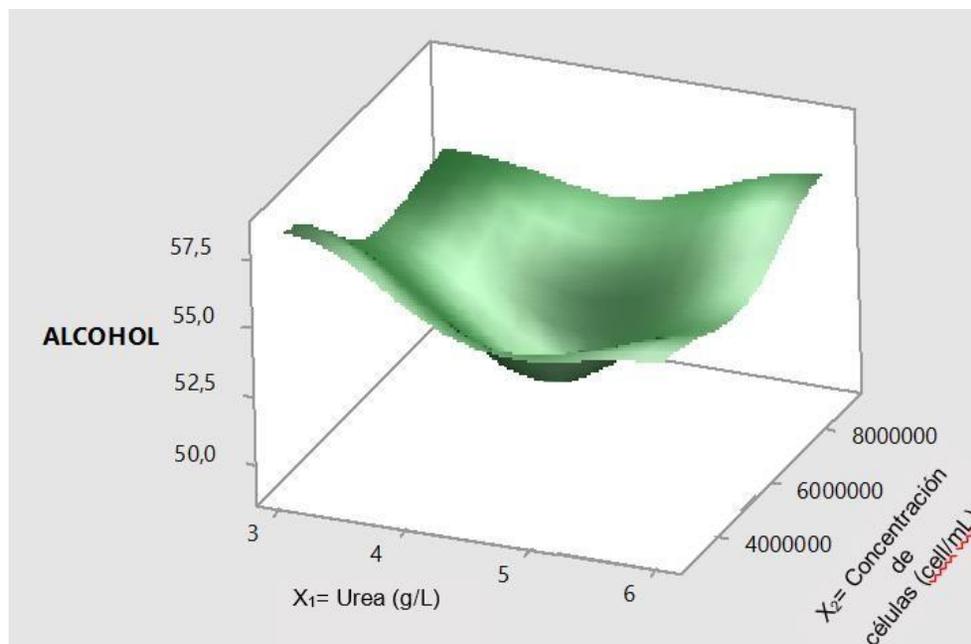


Figura 6 GSR de la producción de etanol a partir de 2^2 con tres puntos centrales

Yue y col. [2012], sugieren que la utilización de urea como fuente de nitrógeno tiene una gran influencia sobre el etanol puesto que cambia el metabolismo del carbono en comparación con otras sales como lo es $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ debido a que la urea propicia una mayor concentración celular y una mejor tolerancia al alcohol formado, sin embargo a concentraciones iniciales altas del complejo orgánico dan como resultado una producción de etanol muy baja.

Deesuth y col. [2015] realizaron estudios en cultivos de JSD con concentraciones de nitrógeno de 9 g/L para la obtención de etanol, pero no encontró efectos significativos al aumentar la carga amoniacal, obteniendo una producción máxima de etanol de 47.7 g/L, con lo cual se confirma que en altas concentraciones de nitrógeno inhiben la producción de etanol al igual que la concentración celular.

Conclusiones

Concentraciones altas de urea y cargas grandes de inóculo no favorecieron la producción de etanol. La maximización de la producción de etanol se alcanzó considerando los niveles bajos de experimentación para ambos factores (urea= 3 g/L y concentración de células= 3×10^6 cell/mL), obteniéndose una concentración máxima de etanol de 58.30 g/L a las 18 h, con una productividad de $Q = 3.23$ g/Lh un rendimiento etanol sustrato $Y_{p/s} = 0.40$ y una eficiencia de fermentación del 78 %.

Agradecimientos

A la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga del laboratorio de bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz por la accesibilidad a sus instalaciones para poder llevar a cabo pruebas experimentales.

Referencias

1. Agrowaste., (2013). Fermentación alcohólica-bioetanol. *Informe Técnico*.
2. Bueno G., Cordovés M., Delgado D., (2009). Sorgo dulce: sus potencialidades productivas. *Revista ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, **43(3)**, 15-21.
3. Chuck H.C., Pérez C.E., Heredia O.E., Serna S.S.O., (2011). Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *RMIQ*, **10(3)**, 529-549
4. Deesuth O., Laopaiboon P., Klarit P., Laopaiboon L., (2015). Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: effects of nutriente supplementation and aeration. *Industrial Crops and Products*. **74(15)**, 95-102
5. Khalil S.R.A, Abdelhafez A.A., Amer E.A.M., (2015). Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. *Annals of Agricultural Sciences*. **60(2)**, 317-324
6. Montes G.N., Salinas G. J.R., González J.A. Loredo P.R., Días P.G., (2010). Guía técnica de producción de sorgo dulce sorghum bicolor (L.) moench en Tamaulipas. *Guía Técnica de SAGARPA*. **49**, 1-8
7. Ortiz M.B., Carvajal Z.O., Torrestiana S.B., Aguilar U.M.G., (2010). Kinetic study on ethanol production using saccharomyces cerevisiae ITV-01 yeas isolated from sugar cane molasses. *J Chem Technol Biotechnol*. **85**, 1361-1367
8. Pandiyan K., Singh A., Singh S., Kumar S.A., Nain L., (2018). Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. *Renewable Energy*. **132**, 723-741
9. Partida S.G., (2017). Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) mejorado genéticamente. *Tesis de Doctorado*. Instituto Tecnológico de Veracruz.
10. Ratnavathi C.V., Suresh K., Kumar B.S.V., Pallavi M., Komola V.V., Seetharma N., (2010). Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice. *Biomass and Bioenergy*. **34(7)**, 947-952
11. Thani A., Laopaiboon P., Laopaiboon L., (2017). Improvement of a continuous ethanol fermentation from sweet sorghum stem juice using a cell reciclen system. *Journal of Biotechnology*. **251(10)**, 21-29
12. Uribe G.A.L., (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. *Tesis de Licenciatura*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
13. Vázquez H.J., Dacosta O., (2007). Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues. *Revista Ingeniería, investigación y tecnología*, **8(4)**, 249-259
14. Wijaya H., Sasaki K., Kahar P., Yopi., Kawaguchi H., Sasuka T., Ogino C., Prasetya B., Kondo A., (2018). Repeated ethanol fermentation from membrane-concentrated sweet sorghum juice using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* F118 strain. *Bioresource Technology*. **265**, 542-547
15. Yue G., Yu J., Zhang X., Tan T., (2012). The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated swee sorghum juice. *Biomass and Bioenergy*. **39**, 48-52