

# **PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO DE SORGO EMPLEANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INOVILIZADA EN ÁCIDO POLIGALACTURÓNICO**

Ayala Sarmiento A. E.<sup>(2)</sup>; Escamilla Silva E.M.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro

<sup>(2)</sup>Facultad de Ingeniería Química del Instituto Tecnológico de Celaya

## **RESUMEN**

El presente trabajo tiene por objetivo producir etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en ácido poligalacturónico que permita manipular altas concentraciones celulares y de sustrato, reduciendo los tiempos de fermentación, mejorar la resistencia a la inhibición por sustrato y operar el biorreactor durante largos periodos de fermentación con buena estabilidad física de los biocatalizadores. Se propone el sorgo como materia prima para llevar a cabo la fermentación debido a que es un recurso renovable, presenta alto contenido de almidón, y las condiciones ambientales para su cultivo no son tan exigentes. La bebida obtenida de la fermentación del sorgo se denomina cerveza africana.

El proyecto consta de tres etapas: cultivo del microorganismo, hidrólisis del sorgo y la fermentación en el biorreactor.

Los resultados indicaron que la levadura aislada es más resistente a la inhibición por glucosa. Se realizó la inmovilización en ácido poligalacturónico con  $\text{CaCl}_2$  al 3% w/v. El sorgo requiere de 3 ciclos de molienda y 1% v/v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 45 minutos para la mayor recuperación de azúcares reductores totales. El esquema de fermentación con recirculación del medio fue con el cual se obtuvieron los mejores resultados, empleando concentraciones de glucosa de 158.82 g/l y 40% I/M; las concentraciones de etanol oscilaron en 60 g/l en tiempos de fermentación de 14 horas.

Se pudieron observar cambios morfológicos en el biocatalizador. Este trabajo pretende establecer las bases para su aplicación a un proceso continuo.

## **INTRODUCCIÓN**

El etanol es el común denominador de todas las bebidas alcohólicas, se obtiene durante la fermentación de azúcares mediante la acción de una levadura, generalmente, *Saccharomyces cerevisiae* (Zambonelli y col., 1989).

Las técnicas convencionales de fermentación, por lotes o continuas, que emplean células suspendidas proporcionan rendimientos bajos en la productividad (Black y col., 1984). El manejo de altas concentraciones celulares en los procesos de fermentación con células libres hace patente la necesidad del uso de un número grande de centrífugas en condiciones estériles para la separación y recirculación de la levadura, lo cual hace inviable económicamente el proceso debido al alto costo y a los requerimientos periódicos en mantenimientos además de un consumo energético considerable (Viegas y col., 2002).

La productividad puede incrementarse empleando células inmovilizadas, las cuales permiten operar el biorreactor con altas concentraciones celulares (Ferusaki, 1988). No se requiere del reciclo para mantener una densidad celular alta; esto permite que el bioproceso pueda operarse de forma eficiente y económica (Tzeng y col., 1991).

El grano de sorgo se propone como materia prima para la fermentación debido a que es un recurso renovable, presenta un alto contenido de almidón (Lorenz y Kulp, 1991) y las condiciones para su cultivo no son tan exigentes en comparación a otros cereales ( Fikret y col., 1985).

La mayoría de los estudios que se han realizado abordan la fermentación del grano de sorgo a nivel matraz y con la presencia de las partículas sólidas. Es indudable que el comportamiento de una fermentación a nivel matraz difiere del comportamiento obtenido en el biorreactor; además, la presencia de partículas del grano durante la fermentación con células libres impide la reutilización del microorganismo en fermentaciones posteriores.

El objetivo Principal de este proyecto es la producción de etanol a partir del hidrolizado de sorgo, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en Acido poligalacturónico; la técnica de inmovilización que se empleo inicialmente fue la reportada por Escamilla y col(2000). Esta acción permitirá operar el biorreactor Air lift a altas concentraciones celulares y de sustrato, incrementar la resistencia a la inhibición por sustrato y reducir los tiempos de fermentación.

## EXPERIMENTAL

Para el cultivo del microorganismo fue necesario propagar la cepa con el medio ATCC 1245 YEPD y se incubo durante 2 días a 27° C.

Para la preparación del inóculo se utilizo el medio descrito por Thatipamala (1992). La preparación del inóculo se realiza en una campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad del lugar de inoculación y evitar contaminaciones. Se adicionaron 10ml de solución salina estéril a cada una de las cajas que contiene el microorganismo propagado y esté se suspende en la solución, con ayuda de un asa, a fin de obtener una suspensión turbia y homogénea. Esta solución con el microorganismo en suspensión se vierte en un matraz que contiene medio para el desarrollo del inóculo (Thatipamala y col., 1992) y se incubaba a 28° C con una agitación de 280 rpm durante 16 horas. La solución salina empleada es al 0.9%.

En la inmovilización de la levadura se centrifugo el inoculo, se decanto el sobrenadante, las pastillas obtenidas se fueron recolectando y estimando el volumen obtenido después de la centrifugación. Se mezclo el ácido poligalacturónico con el volumen del microorganismo en una relación 3:1 Acido- levadura y se hizo pasar por una bomba peristáltica hasta un matraz con una solución de CaCl<sub>2</sub> al 3%.

En la hidrólisis del sorgo se tuvo que obtener en primera parte la harina del sorgo moliendo este en un molino de cuña con 3 ciclos de molienda utilizando una malla del número 60 para el tamizaje.

Para poder hidrolizar el almidón obtenido, se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% con un alto contenido de sorgo de 240g/l.

El medio que se utilizó para alimentar el reactor fue el descrito por Gonzáles (2005) en relación a nutrientes para que se lleve a cabo un optimo crecimiento del organismo, la concentración de glucosa usada en el biorreactor es de 155g/l, con un 40% I/M, un flujo de aire de 15 ml/s con un tiempo de aireación de 2 horas, ph 4.5, temperatura de 30° C y con un volumen de trabajo de 3.4 l. El proceso de la fermentación se detenía a las 16 horas de trabajo del reactor.

Para analizar la biomasa externa se utilizo la técnica de peso seco. En el caso de A.R.T (azúcares reductores totales) se determino por el método del ácido dinitrosalicílico,DNS que sirve para determinar cuanta glucosa se va consumiendo en el proceso y para determinar la hidrólisis del sorgo obtenida.

La determinación de nitrógeno amoniacal fue realizada por el método de Kjeidahl modificado, para fosfatos la técnica usada fue la descrita por Committe Report (1958) y en la de magnesio la técnica usada fue la de Enviromental (1979).

Para la determinación de etanol se uso un cromatógrafo de gases marca Varian, en el que la muestra del biorreactor tuvo que ser previamente destilada para poder determinar el etanol.

## DISCUCIÓN DE RESULTADOS

Tabla 1. Pruebas generales de crecimiento de la levadura y consumo de nutrientes

Tiempo de trabajo (Horas)	Biomasa Externa (g/l)	Biomasa externa de levadura (g/l)	A.R.T. (g/l)	Nitrógeno Residual (g/l)	Fosfatos (g/l)	Magnesio (mg/l)
0	6.52	0	158.82	0.5393	1.34	68
3	6.68	0.16	148.01	0.4833	1.06	51
6	11.74	5.22	120.87	0.2451	0.85	45.5
9	12.22	5.70	75.987	0.1541	0.78	43
12	12.28	5.76	65.255	0.1401	0.71	38
16	15.92	9.4	64.222	0.1260	0.71	37

Se puede apreciar que todos los nutrientes fueron consumidos rápidamente hasta las 9 horas, a partir de ahí el consumo fue lento, incluso el de la glucosa que es el mas importante respecto a la fermentación alcohólica, ya que los otros nutrientes en su mayoría son para crecimiento que es en la parte aerobia del proceso.

En teoría la glucosa tenia que seguir bajando drásticamente por las condiciones anaeróbicas que se tenia al microorganismo.

La hidrólisis del almidón fue de 158 g/l que fue la se introdujo al biorreactor,

En la determinación de la biomasa externa se refiere a la cantidad de levadura en el reactor fuera de los pellets que es donde se encontraba aislada e inmovilizada la levadura, se toma como referencia el primer valor como 0 ya que al inicio no había biomasa de levadura por que toda la levadura se encontraba en los pellets y no circulando libremente por el medio (figura1). Se ve que en el transcurso del tiempo va aumentando la biomasa externa, esto debido a que los pellets se van rompiendo y liberando levaduras al medio directamente, el crecimiento es notable en las 16 horas que fue cuando la mayoría de los pellets se rompieron (figura2). Los pellets se rompieron por el flujo tan alto que se manejo de recirculación, ya que el reactor air lift tiene un principio de recirculación bastante bueno y permitir así una buena transferencia de nutrientes y verse reflejado en la producción de etanol y reduciendo el tiempo de fermentación.



**Figura 1**



**Figura 2**

Las concentraciones de etanol iban de los 30 a los 60g/l, las pruebas de etanol se hacían solo al final de la corrida debido a que se tenía que destilar las muestras y se utilizaba un volumen considerable para meterlas al destilador y el reactor no podía disminuir su volumen a menos de 3 litros, las altas concentraciones de etanol nos dieron con un 40% de I/M que aparte reducía los tiempos de fermentación y menos rompimiento de pellets.

## CONCLUSIONES

La concentración máxima de etanol que se obtuvo fue de 63.10g/l, se esperaba que se obtuviera mas etanol pero quizás el tiempo de fermentación tenía que ser mas largo, pero no se alargó debido a que los pellets pasando las 15 o 16 horas se rompían, se podía seguir dejando recircular el medio con la levadura libre, pero se estaría perdiendo el principio de la inmovilización, que es recuperar el paquete de pellets introducidos con la levadura ya activada y meterlas en otra corrida con altas concentraciones de glucosa y así optimizar la obtención y recolección de etanol.

Como recomendaciones se podría incrementar la concentración de glucosa evaporando el agua de la solución de hidrolizado de sorgo que se obtuvo y así poder aumentar la glucosa al reactor y reducir aun mas el tiempo de la fermentación como también aumentar la concentración de alcohol y no tener tantos rompimientos de pellets para recuperar el lote de levadura introducida.

Se debe buscar mas óptimos con otros reactores ya que hay una variedad de ellos y elegir el de las condiciones mas apropiadas para hacer muy redituable la producción de alcohol que aunque siempre ha sido vista con muy buenos ojos por fines comerciales se debe aprovechar por el auge que se ha dado con relación a los biocombustibles y utilizar el sorgo como fuente alterna para obtenerlos además que el sorgo es muy barato en México en relación a otras fuentes de las que se están obteniendo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Black, G.M., Webb, C., Mattews, T.M., Atkinson, T., 1984. Practical reactor systems for yeast cell immobilization using biomass support particles. *Biotechnol. Bioeng.* 26:134-141.

Committee report. 1958. The determination of orthophosphate, hydrolysable phosphate and total phosphate in surface waters. *J. Awwa* 50:1563.

Environmental monitoring and support laboratory. 1979. Methods for chemical analysis of water and wastes. Office of research and development U.S. environmental protection agency. Cincinnati, Ohio 45268.219.2-1,236.1-1,242.1-1,243.1.

Escamilla, S.E.M., Dendooven, L., Magaña, I.P., Parra, S.R. De la Torre, M.M., 2000. Optimization of Gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactor. *J. Biotechnol.* Vol. 76, Issue2-3, 147-155.

Fikret, K., James, A.C., John, J. S., 1985. Solid- state fermentation of sweet sorghum to ethanol.

Furusaki, S., 1988. Engineering aspects of immobilized biocatalysts. *J. Chem. Eng. Jpm.* 21:219-230.

González,S., 2005. Producción de etanol a partir del hidrolizado de sorgo empleando *Saccharomyces cerevisiae*.pág.35.

Lorenz, K.L., y Kulp, K. 1991. Handbook of cereal science and technology. New York, USA: Marcel Dekker inc. 882 Pp.

Thatipamala, S. Rohani, y G.A. Hill, 1992. Effects of high products and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 40, no. 2, June 20.

Tzeng, J.M., Fan L.S., Gan Y.R., Hu, T.T., 1991. Ethanol Fermentation using immobilized cells in a multistage fluidized bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 38, Pp. 1253-1258.

Viegas, M.C., Andrietta, S.R., Andrietta, M.G.S., 2002. Use of tower reactors for continuous ethanol production. *Brazilian journal of chemical engineering*. Vol. 19, No. 02, Pp. 167-173.

Zambonelli C., Romano P. y Suzzi G., 1989. Microorganisms of wine. Biotechnology applications in beverage production. Cantarrelli C. and Lanzarini G. Elsevier Applied Science, New york. 17-28.