

Producción de alcohol por fermentación con levaduras libres e inmovilizadas

Gabriel Jaime Vargas, Mariana Peñuela*, Mabel Echeverri*, María Elena Ortiz*, María Cecilia Escobar** y Juan Carlos Quintero****

Resumen

El presente trabajo evalúa la producción de etanol, en un sistema continuo, con células de levadura inmovilizadas, que opera a tasa de dilución de $0,36 \text{ h}^{-1}$ y se compara con un sistema en lote con células libres, utilizado tradicionalmente en la producción industrial de etanol. Los sistemas se evalúan con cuatro sustratos diferentes: glucosa, sacarosa, miel virgen y miel residual. El reactor se opera a temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$, con solución de concentración de 100 g/l de azúcares totales reductores y pH aproximado de $5,0$. La productividad para el sistema continuo presenta valores superiores a $9,42 \text{ g/l/h}$ a diferencia del sistema lote que alcanza productividad máxima de $3,39 \text{ g/l/h}$, lo cual hace del sistema continuo una buena alternativa para la producción de etanol a escala industrial.

----- *Palabras clave:* etanol, células inmovilizadas, sistema continuo.

Abstract

This work shows the results of a study of ethanol production in a continuous system with immobilized yeast cells. The system operates at a dilution rate of $0,36 \text{ h}^{-1}$ and its performance is compared with a batch system with free cell, which is the system typically used for the industrial production of ethanol. The system were tested with four substrates: glucose, sucrose and cane molasses (virgin and residual honey). The fermentor is operated at a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ with a solution containing 100 g/l total sugar and pH of about $5,0$. The productivity for the continuous system shows a higher value of $9,42 \text{ g/l/h}$ and the batch system reaches a maximum productivity value of $3,39 \text{ g/l/h}$. Therefore, the continuous system appears to be a good alternative for the industrial ethanol production.

----- *Key words:* ethanol, immobilized cells, continuous system.

* Grupo de Bioprocesos, Auxiliares de investigación, estudiantes de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia.

** Bacterióloga, estudiante de Doctorado en Biología, Universidad de Antioquia.

*** Profesor, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, jcquinte@udea.edu.co.

Introducción

El etanol es el producto más tradicional producido por fermentación en el mundo, se utiliza directamente para consumo humano y tiene gran potencial de aplicación como combustible limpio [1]; puede utilizarse como aditivo a otros combustibles obteniendo productos tan importantes como el gasohol. Actualmente en Colombia existe creciente aumento en las importaciones de etanol, que para 1997 alcanzaron un valor próximo a los 28 millones de litros. Este fenómeno se debe a la baja productividad de la fermentación clásica (aproximadamente 0,056 g/l/h) por la utilización de sistemas discontinuos y la aparición de inhibición por producto a determinadas concentraciones de etanol lo que lleva a fermentaciones de larga duración y altos costos de producción [1, 2].

Lo anterior hace necesario implementar procesos que aumenten la productividad de los biorreactores por medio de técnicas que permitan altas concentraciones de biomasa. La inmovilización en geles es uno de los procedimientos más empleados [3], que con aplicación en procesos de operación en continuo, prevé ser el sistema más eficiente en la producción de etanol ya que se logran mayores velocidades de fermentación por más tiempo [1], altas productividades volumétricas, mejor control del proceso [4], menor influencia de condiciones ambientales adversas como inhibidores, elimina el lavado de células durante la fermentación y reduce la inhibición por producto [2].

En este trabajo se evaluó la producción de etanol en un sistema continuo de células inmovilizadas, a escala de laboratorio, estableciendo una comparación con sistemas discontinuos para cuatro sustratos diferentes, glucosa, sacarosa, miel virgen y miel residual. Este proyecto se enmarca dentro de un macro proyecto en el que se busca utilizar sistemas de inmovilización para la producción de etanol hasta alcanzar una escala de planta piloto.

Materiales y métodos

- **El microorganismo.** Se utilizó una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* seca y activa, caracterizada mediante la prueba bioquímica del API, y conservada como stock en cultivos sobre placas de agar. Se hicieron repiques mensuales sobre "agar sabouraud" para garantizar la obtención de células jóvenes. El período de incubación a 37 °C fue de 72 horas, tiempo en el cual se observa la formación de colonias apropiadas para los diferentes ensayos experimentales los cuales se hicieron por duplicado.
 - **El medio de cultivo.** Se evaluaron cuatro tipos diferentes de sustrato: glucosa de alta pureza, sacarosa comercial, miel virgen y miel residual donadas por la Fábrica de Licores de Antioquia. Cada litro de medio contiene: 100 g de azúcares totales reductores (ATR) y complementado con 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de KH_2PO_4 , 3 g de $(NH_4)_2SO_4$, 4 g de extracto de levadura, y 3,6 g de peptona. El medio se ajustó a pH de 5 antes de esterilizar durante 15 min a 15 psi (121 °C). Antes de su utilización, la miel residual se clarificó sometiéndola a una dilución 1:2, se adicionó H_2SO_4 a una concentración de 0,3% v/v seguido de un calentamiento a 80 °C. El material insoluble generado, se centrifuga (Hettich eba 8s) a 5.000 rpm durante 30 min, separando el líquido sobrenadante para utilizarlo como sustrato en la experimentación.
- El desarrollo experimental se llevó a cabo en dos etapas: primero se realizaron las evaluaciones de las fermentaciones por lote con células libres, seguidas de las fermentaciones en continuo con las células inmovilizadas. En cada caso se hizo seguimiento a la biomasa, el sustrato y el producto.
- **Condiciones de los cultivos en lote.** Para la evaluación del sistema en lote se emplearon tres etapas, figura 1:

1. Preparación de un cultivo de activación mediante la siembra de una única colonia en volumen de 50 ml con una concentración de sustrato de 10 g/l de ATR y un período de incubación de siete horas.
2. Preparación del inóculo por la siembra de 10 ml de cultivo de activación a 90 ml del medio de cultivo de producción e incubando durante seis horas.
3. Preparación del cultivo de fermentación por inoculación de 50 ml del cultivo de inóculo a 450 ml de medio de producción.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura de 35 °C, pH 5,0 y agitación a 150 rpm.

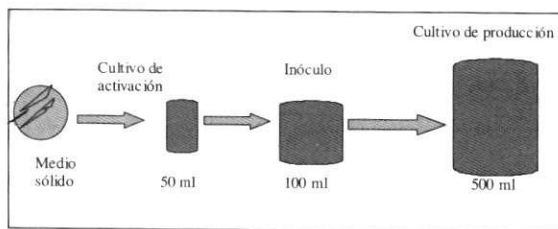


Figura 1 Esquema de trabajo proceso discontinuo

- **Condiciones del cultivo en continuo.** Las fermentaciones en continuo, figura 2, se realizaron en un equipo de vidrio de 40 cm de largo y 2,7 cm de diámetro interno, provisto de una chaqueta para el control de la temperatura del cultivo en 35 °C. El reactor se llenó hasta 70% de su capacidad con esferas de alginato de calcio, de 3 mm [5] aproximada-

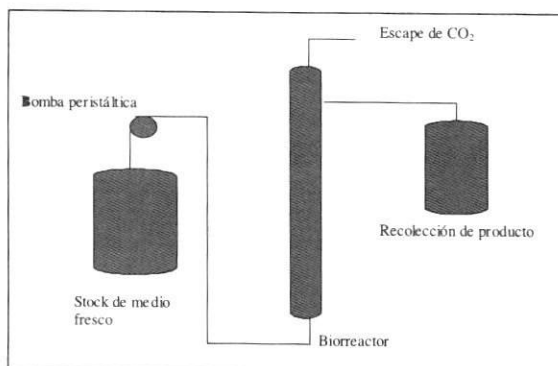


Figura 2 Esquema de proceso continuo

mente, que contenían las células de levadura en su interior. Para iniciar el cultivo continuo, se llenó el reactor con medio fresco y se dejó operar en modo *batch* una noche, luego de este período, se iniciaba la operación en continuo y se realizaba seguimiento por un período de seis tiempos de residencia ($0,36 \text{ h}^{-1}$) [6]. El flujo de operación fue 1,4 ml/min.

- **Inmovilización.** Las células fueron colectadas de una fermentación discontinua que se detiene a una concentración de 6 g/l. La biomasa fue separada por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min y luego mezclada con alginato de sodio para obtener una solución al 1% en levadura y 2% en alginato de sodio; esta solución se gotea sobre una solución de CaCl_2 al 2% para obtener la cantidad de esferas necesarias para empaquetar 70% del volumen total del biorreactor.
- **Métodos analíticos.** En la determinación de ATR se utilizó el método colorimétrico del DNS (ácido dinitro salicílico) y lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Spectronic 20 Bush and Lamb) a 540 nm [7]. La concentración celular se determinó por densidad óptica a 600 nm y mediante una curva de calibración de peso seco. El alcohol se evaluó por cromatografía de gases en cromatógrafo Perkin-Elmer sigma 300 y columna DB-WAX de 30 m, 0,53 mm de diámetro interno y 1,0 micras de espesor de película. Se realizaron análisis de viabilidad (Test de acidificación) [8] y vitalidad (tinción con azul de metileno) [9] de las levaduras en los cultivos por lote a diferentes tiempos de cultivo.

Resultados y discusión

En la figura 3 (a, b, c, d) se muestran las cinéticas de fermentación para los cultivos por lote de cada uno de los sustratos empleados.

Si bien el comportamiento cinético de todos los cultivos es muy similar, se observa comportamiento atípico muy marcado en las fermentaciones con miel residual. Mientras que la vitalidad

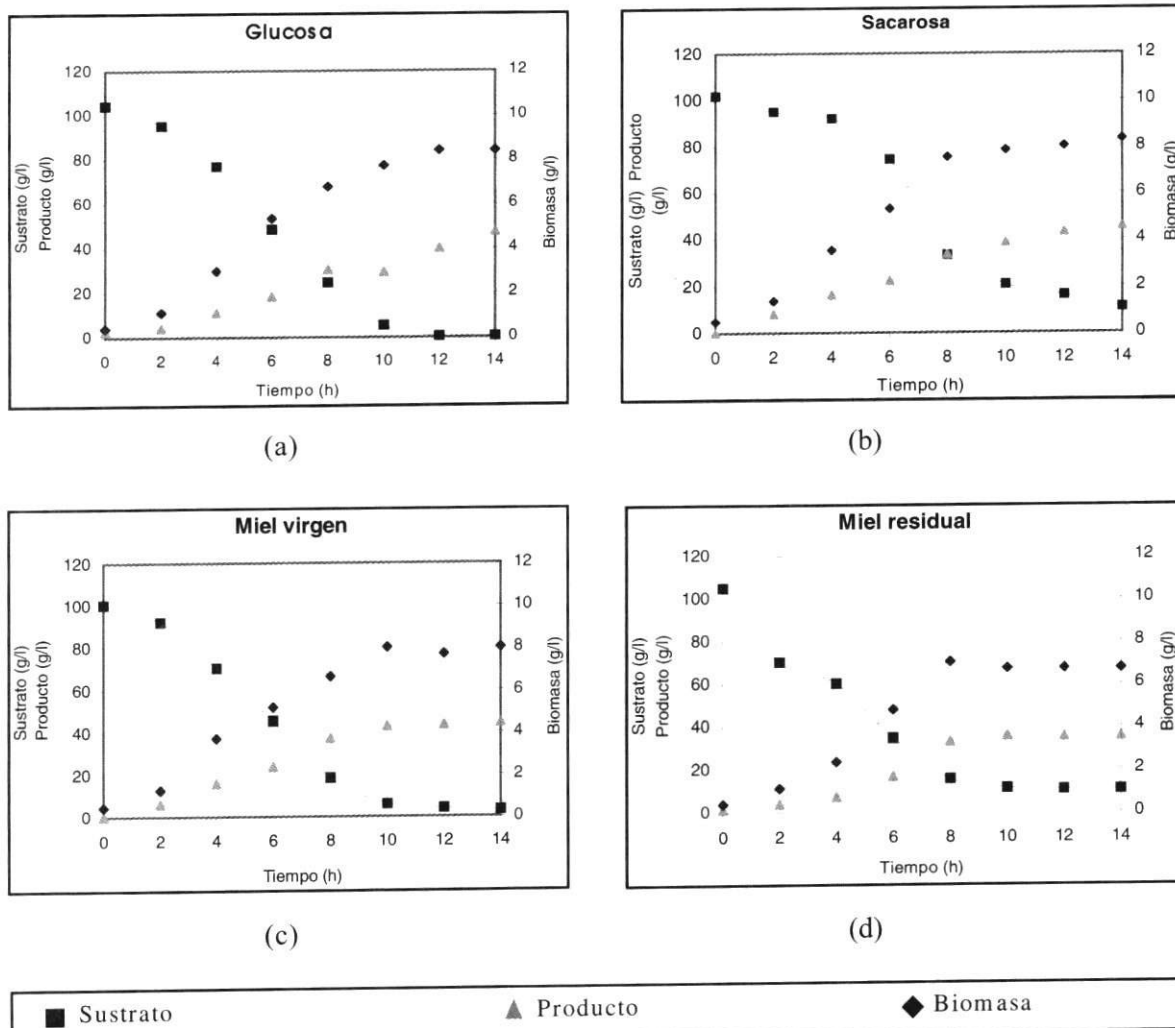


Figura 3 Cinética de fermentaciones por lote. Condiciones: 150 rpm y 35 °C

celular, la máxima concentración de biomasa, de producto formado y la productividad del proceso en los medios con glucosa, sacarosa y miel virgen estuvieron del orden de 95%, 8,5 g/l, 45 g/l y 3,3 g/l/h respectivamente; en cultivos con miel residual se observó una disminución de más del 20% en estas variables. Lo anterior está de acuerdo con la presencia de ATR no consumidos que representan el azúcar no fermentable de la miel residual, originando también menor formación de biomasa y por consiguiente valor bajo del rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{x/s}$), como se puede ver en la tabla 1.

Tabla 1 Resultados característicos de las fermentaciones por lote

	Glucosa	Sacarosa	Miel virgen	Miel residual
$X_{m\acute{a}x}$ (g/l)	8,420	8,630	8,320	6,730
P (g/l)	47,500	45,700	44,500	35,500
$Y_{x/s}$	0,077	0,089	0,081	0,067
$Y_{p/s}$	0,467	0,494	0,485	0,375
μ (h^{-1})	0,390	0,330	0,320	0,270
Prod. (g/l/h)	3,390	3,270	3,180	2,530

En las fermentaciones se obtiene un rendimiento de sustrato en producto muy cercano al estequiométrico reflejándose alta eficiencia de la conversión, mientras que con miel residual el rendimiento es cercano solamente al 70% del valor teórico. A pesar de esto, no se observa diferencia significativa de la velocidad de crecimiento en los cultivos con cada sustrato. De lo anterior se puede concluir que la miel residual genera los más bajos rendimientos y productividades de los cuatro sustratos estudiados.

En la evaluación de fermentaciones en continuo se realizó seguimiento de sustrato y producto a un intervalo de tiempo de tres horas, valor estimado como tiempo de retención. El período total de análisis fue de dieciocho horas, equivalente a seis tiempos de retención, valor que teóricamente duplica el tiempo de estabilización del sistema. La figura 4 (a, b, c, d) muestra la cinética de

fermentación para los cuatro sustratos en cultivo continuo.

La no presencia de sustrato en el tiempo cero, en las fermentaciones en continuo para todos los medios excepto la miel residual, para la cual se observa remanente debido a los azúcares no fermentables, y la alta concentración de alcohol de este mismo instante se debe a la correspondencia con la fase final del período *batch* previo a la operación en continuo.

Al comparar el cultivo continuo con respecto al cultivo en lote, se observan diferencias considerables en las variables principales como lo es la productividad, en la cual se evidencia notorio aumento. Así, la productividad para glucosa pasa de 3,39 g/l/h para el sistema en lote, a 9,42 g/l/h en el continuo, tabla 2, lo cual indica que la productividad se triplica con respecto al cultivo en

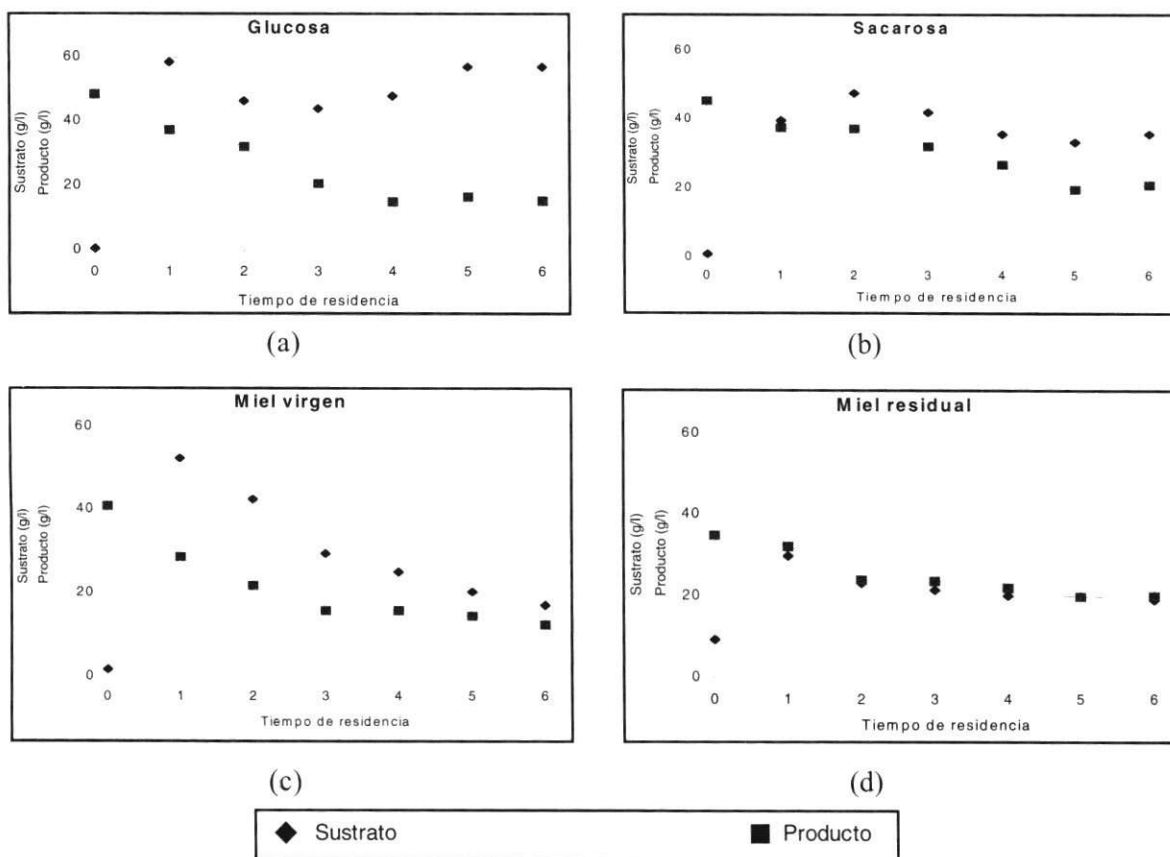


Figura 4 Cinética de fermentaciones en continuo. Condiciones: 0,36 h⁻¹ y 35 °C

lote; a su vez la sacarosa presenta un cambio de 3,27 g/l/h a 12 g/l/h; en miel virgen de 3,18 g/l/h a 9,54 g/l/h y para miel residual un incremento de 2,53 g/l/h a 11,94 g/l/h. El valor para la productividad del sistema continuo está evaluada con base en el volumen de líquido contenido en el reactor durante la operación del sistema.

Tabla 2 Resultados característicos de las fermentaciones en continuo

	<i>Glucosa</i>	<i>Sacarosa</i>	<i>Miel virgen</i>	<i>Miel residual</i>
P (g/l)	15,700	20,000	15,900	19,900
Yp/s	0,349	0,340	0,182	0,247
Prod. (g/l/h)	9,420	12,000	9,540	11,940

La miel residual se presenta como sustrato de interés en la producción de etanol bajo el sistema utilizado, no solo por el gran aumento en la productividad, sino también por ser un material residuo de los ingenios azucareros con características muy contaminantes, lo cual solucionaría un problema ambiental y se lograrían rendimientos importantes a nivel fermentativo.

La utilización de la inmovilización en alginato de calcio permite un mejor manejo de la levadura, lo que hace más fácil el control de lecho activo en el reactor durante el proceso continuo; a la vez la membrana que envuelve el microorganismo no permite que sustancias tóxicas que puedan presentarse en el medio, interfieran con el proceso fermentativo.

Los procesos de fermentación que operan bajo los sistemas en lote presentan períodos de proceso en los cuales no se desarrolla producción de alcohol, estos tiempos obedecen principalmente a los trabajos de vaciado, limpieza y llenado de los fermentadores; procedimientos que industrialmente generan grandes pérdidas. A pesar que los sistemas continuos requieren una etapa preliminar para la obtención de biomasa necesaria en la inmovilización, un proceso continuo con

células inmovilizadas permite períodos de producción de mayor duración que pueden alcanzar tiempos de ocho días, disminuyendo ostensiblemente los tiempos improductivos de los sistemas en lote.

El sistema continuo con células inmovilizadas para la producción de etanol, permite realizar fermentaciones con valores de productividad hasta cuatro veces por encima de los valores obtenidos a partir de los sistemas tradicionales o sistemas en lote; esto hace de gran interés la profundización en el estudio de esta tecnología y su factibilidad a un nivel comercial de producción.

Para próximos estudios se debe optimizar el sistema operativo de la fermentación en continuo involucrando un análisis directo de variables de gran influencia en el rendimiento del proceso como lo son la concentración celular en el lecho del reactor, la relación de empaque que se va a utilizar, la concentración de sustrato en el medio fresco y la relación de flujo de alimentación, variables que presentan relaciones directas entre sí y que hacen el desarrollo experimental dependiente de las variables que se parametrizan. Existen además otras variables indirectas que influyen en la operación de este sistema y no deben determinarse a la ligera: relaciones dimensionales del reactor y el diámetro de las esferas de alginato de calcio. El determinar los valores óptimos para estas variables es la fase preliminar para desarrollar un diseño que permita el proceso de escalado del sistema.

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo se convierten en la base del estudio de optimización del sistema diseñado y la evaluación del proceso continuo con células de levadura inmovilizadas, análisis experimental posterior a este, dentro del macro proyecto.

Agradecimientos

Al CODI por la financiación del proyecto y a la Fábrica de Licores de Antioquia por facilitarnos su infraestructura y compartir con nosotros sus conocimientos.

Referencias

1. Taylor, F. *et al.* "Kinetics of continuous fermentation and stripping of ethanol". En: *Biotechnology letters*. Vol. 20. No 1. January 1998. pp. 67-72.
2. Martínez, Nieto, L. *et al.* "Fermentación etanólica continua anaeróbica con *Saccharomyces cerevisiae* resistente al alcohol". En: *Anales de química*. Vol. 89, 1993. pp. 579-583.
3. Sanromán, A. *et al.* "Mejora de la técnica de inmovilización celular: aplicación del diseño factorial". En: *Afinidad*. Vol. XLVIII. No. 436, noviembre-diciembre, 1991. pp. 373-376.
4. Fumi, M. D. *et al.* "Living immobilized acetobacter in Ca-alginate in Viniegra production: preliminary study on optimum conditions for immobilization". En: *Biotechnology letters*. Vol. 14. No. 7. July, 1992. pp. 605-608.
5. Yadav, B. S. *et al.* "Process optimization for continuous ethanol fermentation by alginate-immobilized cell of *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1". En: *J. Basic microbiol.* Vol. 36. No. 3. 1996. pp. 205-210.
6. Sheoran, A. *et al.* "Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1". En: *J. Basic microbiol.* Vol. 38. No. 2. 1998. pp. 123-128.
7. Miller, G. L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". En: *Anal. Chem.* Vol. 31, 1959. p. 426.
8. Mochaba, F. *et al.* "Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching". En: *J. american society of brewing chemists, Inc.* Vol. 56. No. 1, 1998. pp. 1-6.
9. Pelczar, M. J. *et al.* *Microbiología*. 4ª. edición. McGraw-Hill. 1982. México.