

FERMENTACIÓN EXTRACTIVA DE MELAZAS

*Ing. Qco. M.Sc. Luis A. Caicedo; Ing. Qco. Omar González,
Q. M.Sc.; Yolanda Rico, Bact.;*

*Leonor de Correal, Facultad de Ingeniería, Departamento Ing. Química,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,
A.A. 35907, Santafé de Bogotá.*

RESUMEN

Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de levadura Fleishman, fue adaptada para fermentar melaza en presencia de solventes como Kerosene, destilados de gasolina y n-Heptano. Fueron realizados ensayos iniciales para seleccionar el solvente, observándose que el Kerosene presenta menor efecto inhibitorio. La fermentación de la melaza fue realizada con mezclas de solvente y mostró en relaciones 1 a 1 y 4 a 1 respectivamente y concentraciones iniciales de azúcar equivalentes a 12 y 16 grados Brix. Se corroboró el efecto inhibitorio que ejerce el producto (etanol) en la fermentación, debido a que concentraciones altas de solvente producen mayor conversión del azúcar y por consiguiente mayor rendimiento. Para altas concentraciones de azúcar la conversión está limitada por la solubilidad del alcohol en el solvente. Comparando los coeficientes de distribución de la mezcla etanol-agua-kerosene con los obtenidos en la mezcla mosto fermentado-kerosene, se pudo observar una mayor solubilidad del etanol en la fase orgánica de la última, debido probablemente a la presencia de sales en el medio.

INTRODUCCIÓN

La producción de solventes como etanol y otros productos por fermentación, requiere normalmente grandes consumos de energía y costosos equipos, para llevar a cabo la separación y tratamiento de las aguas residuales. Una alternativa para disminuir los volúmenes finales de residuos y los altos consumos de energía en estos procesos, es el empleo de la fermentación extractiva líquido-líquido. En ella, se combina la fermentación con la extracción líquido-líquido o extracción con solventes no miscibles con el medio de fermentación. A pesar de ser un sistema poco desarrollado y encontrarse a nivel de laboratorio, presenta grandes perspectivas en un futuro inmediato. Según Minier y Goma (1) en la producción de etanol puede lograrse la fermentación de mostos con con-

centración de azúcares mayores del 40%, sin que se presente inhibición.

Una de las principales dificultades para llevar a cabo la fermentación extractiva es la selección del solvente. Para esto deben tenerse en cuenta criterios fisicoquímicos, microbiológicos y económicos. Dentro de los primeros se encuentran: selectividad, coeficiente de distribución, factor de separación, insolubilidad, recuperabilidad, densidad, tensión superficial, reactividad química, presión de vapor y corrosión entre otros. Dentro del criterio microbiológico, la toxicidad del solvente frente a las células, es un factor decisivo para su selección. Su efecto puede estar entre ninguna y una total inhibición de la viabilidad celular y por consiguiente de la fermentación. Murphy, Blatch y Wilke (2), realizaron ensayos tendientes a clasificar los solventes a partir de su toxicidad respecto de la

levadura, encontrando como se observa en la Tabla 1 que los alcanos y el propilenglicol no presentan inhibición del crecimiento, mientras que el pentacloroetano inhibe totalmente el crecimiento celular en soluciones saturadas. De otro lado, Minier y Goma (3) realizaron ensayos de fermentación empleando como solventes alcoholes cuya estructura tenía entre tres y catorce carbonos y concluyeron que en alcoholes entre tres y doce carbonos no se presenta desarrollo celular. Munk (4) y Goma y Durand (5) en trabajos de fermentación con hidrocarburos mostraron que la *Candida lipolytica* crece en alcanos con más de nueve carbonos y en alquenos con más de diez carbonos. Gill y Ratledye (6), obtuvieron resultados similares con alcanos, alquenos, alcoholes y bromo-alquilamidas, explicando los efectos de toxicidad por solubilidad. Por el contrario, para Jain (7) la toxicidad es atribuida a la habilidad intrínseca de los alcoholes de cadena corta para disolver la capa lipídica de la célula.

Tabla 1. Toxicidad de algunos solventes con respecto a la levadura (2).

Solvente	Inhibición del crecimiento	
	Saturación	10% Saturación
Alcanos	Ninguna	Ninguna
Alcoholes alto	Completa	Parcial o ninguna
Alquilbencenos	Parcial	Ninguna
Pentacloroetano	Completa	Ninguna
Tributilfosfato	Parcial	Parcial
Polipropilenglicol	Ninguna	Ninguna

Minier y Goma (3), trabajaron con dodecanol y mezclas de éste con tetradecanol y lograron productividades de 1.03 g/l-h con concentraciones de glucosa inicial de 409 g/l. Estos resultados muestran de una parte las ventajas del empleo de la fermentación extractiva, pero de otra la especificidad de los solventes que la limitan en su aplicación. Por lo anterior, el presente trabajo fijó como objetivos el estudio de la fermentación alcohólica con solventes de fácil consecución en nuestro medio y con microorganismos de uso corriente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada a partir de levadura Fleishman liofilizada, de acuerdo con el método descrito por Díaz y Mina (8). Se hicieron repiques en el medio con agar indicado por Díaz y Mina usando cajas de petri. Se hicieron perforaciones en el agar para colocar el solvente y se dejó incubando a 30°C por 72 horas. Después de cinco repiques se aisló la cepa de trabajo que dadas sus características de coloración se consideró como mejorada respecto a la inicial. Como solventes iniciales fueron seleccionados: n-heptano, Kerosene que es un derivado del petróleo con intervalo de ebullición entre 180 y 300°C, gasolina y destilados de la gasolina.

Se determinó el coeficiente de distribución del etanol en agua y kerosene poniendo en contacto las dos fases de acuerdo con el método de Daniels (9) y midiendo la concentración del etanol en cada una de ellas. Se hicieron ensayos a diferentes concentraciones de etanol y relaciones solvente agua. El análisis de los azúcares se hizo por el método de Aynon Lane y alcohol por el método del dicromato descrito por Díaz y Mina (8).

Para estudiar el efecto de los solventes sobre la fermentación y cuantificar el rendimiento alcohólico, se hizo un diseño de experimentos factorial 2x3. Los factores a considerar fueron: Concentración en grados Brix y relación solvente mosto. Las variables de respuesta fueron: concentración celular determinada como peso seco, concentración de azúcar determinado por el método de Aynon Lane (8) y concentraciones de etanol en el mosto y en el solvente, determinadas por el método del dicromato. En las fermentaciones se empleó un volumen total de 1.5 l., el inóculo se preparó tomando un 20% del volumen final, una concentración celular inicial de 1,8g/l y dejando fermentar por 14 horas. Esta etapa se denomina pre-fermentación. Al final de este tiempo fueron inoculados los 80% del mosto restante, se adicionó el solvente en la relación establecida y se dejó en baño agitado a 75 oscilaciones por minuto y 30°C. En el curso de la fermentación se siguió tomando muestras cada cinco horas para determinar la concentración celular, concentración de azúcar y producción de etanol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del solvente: Para conocer el comportamiento de las células frente a los diferentes solventes se hicieron fermentaciones en matraces agitados que contenían 250 ml de medio de fermentación y 10 ml del solvente. Se hizo el seguimiento de la reacción midiendo los grados Brix en función del tiempo. Los resultados se resumen en las figuras 1 y 2. Se observa en estas figuras que todos los solventes presentan efecto de inhibición, pero con el kerosene se logra mayor conversión de los azúcares y por consiguiente menor efecto inhibitorio. La concentración final alcanzada fue de 8.8 grados Brix cercana a la muestra sin solvente que fue de 8.5 grados Brix. La gasolina corriente presenta una gran inhibición debido probablemente a sustancias tóxicas presentes, pero el heptano es el que presenta la mayor inhibición de todos. Para corroborar lo anterior, se hicieron destilaciones de 100 ml de gasolina, recogiendo tres fracciones correspondientes a los primeros 25 ml de destilado, 25-50 ml y 50-75 ml y se realizaron las fermentaciones respectivas. La primera y segunda fracción muestran una mayor inhibición superando inclusive la del heptano. La tercera fracción presenta una inhibición muy semejante a la de la gasolina corriente, esto confirma los resultados de MUNK (4) y GOMA (5) según los cuales, hidrocarburos de bajo peso molecular presentan la mayor inhibición; de acuerdo con estos resultados se seleccionó el Kerosene como solvente de estudio.

Fermentación alcohólica: En general se observó que las cinéticas presentan las características propias

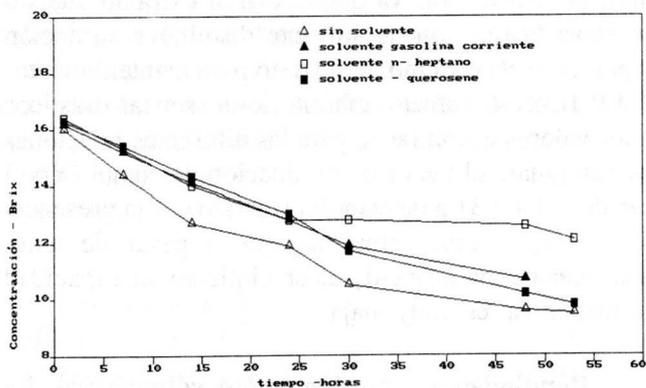


Figura 1. Variación de la concentración de azúcares como grados Brix durante la fermentación con diferentes solventes.

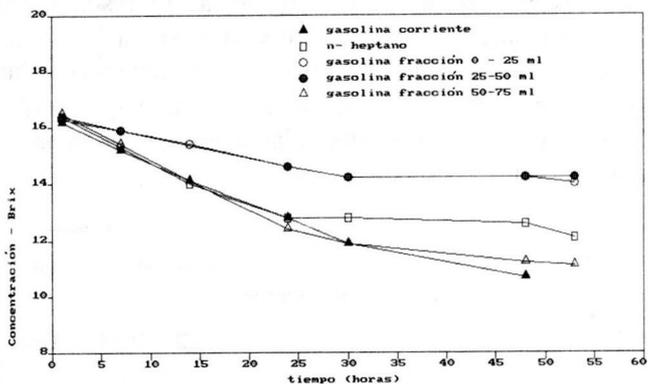


Figura 2. Variación de la concentración de azúcares como grados Brix durante la fermentación con diferentes destilados de gasolina.

de estos procesos, donde la velocidad de formación de producto está asociada a la velocidad de crecimiento celular. Un ejemplo tomado de la fermentación con 12° Brix y relación volumétrica solvente a mosto de 4 a 1 se aprecia en la figura 3.

Una característica común en todas las fermentaciones fue la ausencia de fase "lag" o de adaptación, debido probablemente a la buena adecuación de la célula durante la etapa de prefermentación. Aunque las fermentaciones lograron su máxima concentración de células y producto entre 25-45 horas, el seguimiento

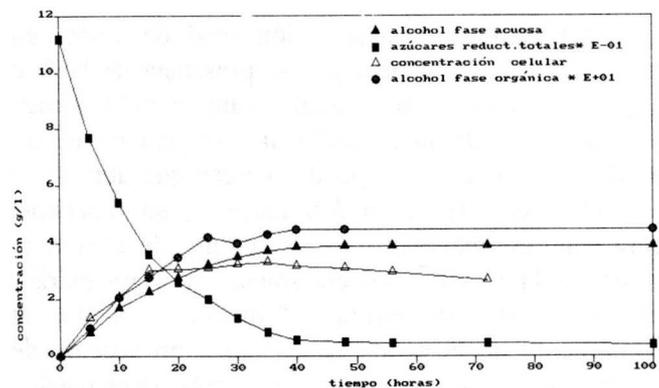


Figura 3. Concentración de azúcares, células y etanol en la fase acuosa y orgánica en función del tiempo para fermentación extractiva de 12 grados Brix y relación 1:4.

se siguió hasta las 100 horas para detectar efecto del solvente sobre la fase endógena. El resumen de las fermentaciones puede apreciarse en la Tabla 2. Para 12° Brix iniciales la concentración máxima celular se ve poco afectada por la presencia del solvente, lo que indica una buena adaptación de la cepa al medio con Kerosene.

ceso se mantiene para las diferentes relaciones. El factor de producción celular se conserva entre 0.027 y 0.033 g de célula/g sustrato para todas las fermentaciones. A 16 grados Brix y relación 1 a 1 se obtiene el menor valor que es 0.027 g/g ello puede indicar un efecto inhibitorio debido al etanol presente y al solvente. El efecto total se ve disminuido cuando

Tabla 2A. Resultados de la Fermentación alcohólica extractiva a diferentes condiciones.

Concentración	12 Grados Brix		
	0	1:1	4:1
Relación volumétrica Solvente/mosto			
Concentración celular max. (g/L)	3.5	3.21	3.32
Azúcar inic. (g/L)	112	115	112
Azúcar final (g/L)	1	3	1
Concentración etan. fase acuosa (g/L)	44.4	34.25	34.8
Concentración etan. fase orgánica (g/L)	-	0.39	0.46
Etanol total (g/L)	44.4	34.64	36.6
Rendimiento alcohólico	78.17	60.92	66.24
Y _{x/s} (g/g)	0.03	0.029	0.03
Y _{p/s} (g/g)	0.4	0.31	0.33
Y _{x/s} factor estequiométrico (g células/g sustrato)			
Y _{p/s} factor estequiométrico (g producto/g sustrato)			

Tabla 2B. Resultados de la fermentación alcohólica extractiva a diferentes condiciones.

Concentración	16 Grados Brix		
	0	1:1	4:1
Relación volumétrica solvente/mosto			
Concentración celular max. (g/L)	4.67	4.02	4.96
Azúcar inicial (g/L)	155	158	156
Azúcar final (g/L)	6.0	7.5	6.2
Concentración etan. fase acuosa (g/L)	59.6	46.1	46.4
Concentración etan. fase orgánica (g/L)	-	0.55	0.648
Etanol total g/L	59.6	46.65	48.9
Rendimiento alcohólico	77.97	59.70	64.79
Y _{x/x} (g/g)	0.031	0.027	0.033
Y _{p/s} (g/g)	0.40	0.31	0.33

Asímismo la concentración final de etanol en la fase acuosa disminuye por la presencia de la fase orgánica, aunque el efecto total al aumentar el volumen de ésta es el de incrementar la cantidad de etanol producido. Lo anterior puede indicar que aunque el solvente afecta la célula disminuyendo su capacidad para soportar mayores concentraciones de etanol, al aumentar la relación solvente/mosto se logra extraer mayor cantidad de etanol del medio y mejorar el rendimiento de la célula en cuanto a producción de alcohol. Esto hace pensar que altas relaciones pueden llegar a superar la inhibición presentada por el solvente; para 16 grados Brix iniciales se repite el comportamiento. Aunque la concentración celular máxima y etanol producido aumentan, el rendimiento del pro-

se incrementa la cantidad de solvente llegando a valores de 0.033 (g/g) que pone de manifiesto el efecto inhibitorio del etanol, ya que el etanol extraído cuando se eleva la relación de solvente disminuye su acción y por tanto el consumo de sustrato para mantenimiento. A 12° Brix estos efectos inhibitorios no son tan drásticos y los valores encontrados para las diferentes relaciones es casi igual. El factor de producción de etanol (Y_{p/s}) cae de 0.4 a 0.31 g de etanol/g sustrato por la presencia del solvente, esto demuestra que a pesar de tener una buena cepa adaptada al crecimiento su capacidad fermentativa es muy baja.

Rendimiento y productividad volumétrica: La variación del rendimiento en la producción de etanol se aprecia en la Tabla 2. El mayor valor se presenta a 12 grados Brix iniciales y una relación solvente mosto

de 4 a 0. Para 16 grados Brix, los valores son menores en relación con los obtenidos a 12 Brix aunque las concentraciones finales de etanol sean mayores.

Las productividades, referidas al volumen de mosto y al volumen total se observan en la figura 4. Para su cálculo se toma como tiempo cero el momento de inocular y como tiempo final 50 horas cuando se alcanza la máxima concentración de etanol en casi todas las fermentaciones. La máxima productividad referida al volumen de mosto y al volumen total se alcanza para 16 grados Brix y relación solvente mosto de 0:1.

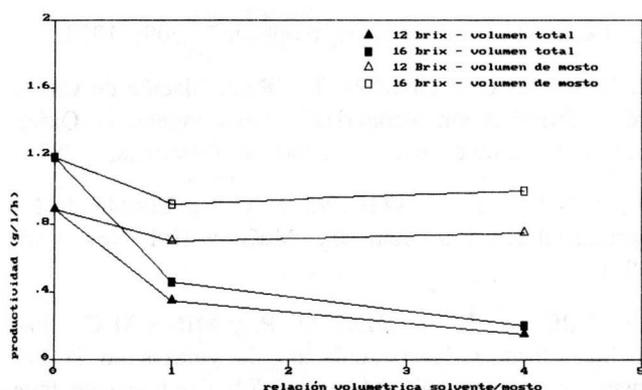


Figura 4. Variación de la productividad referida al volumen de mosto y volumen total con la relación solvente a mosto para diferentes concentraciones iniciales.

El valor obtenido de productividad comparado con los reportados para otros procesos y por otros autores como se muestran en la Tabla 3 es muy bajo e indica una menor velocidad de fermentación. Comparando el valor obtenido con esta cepa mejorada y el reportado en trabajo anterior por Caicedo y col (10) para la cepa no mejorada, puede concluirse que aunque la primera puede crecer en medios con Kerosene, la velocidad de producción de etanol es menor que la cepa no mejorada.

Coefficientes de partición: Los resultados del coeficiente de partición del etanol en agua - kerosene y en medio de fermentación 12° Brix-Kerosene pueden observarse en la Tabla 4. Se nota un incremento del coeficiente de partición por la presencia de los sólidos en el medio. Comparando los valores encontrados res-

Tabla 3. Productividad volumétrica de algunos sistemas de fermentación.

SISTEMA	Productividad (g/L/h)	T.D.	Ref.
Fermentación flash	80	ls	11
Continua, al vacío y reciclo	80	ls	11
Continua al vacío	40	ls	11
Continua con reciclo	40	c	11
Lotes con reciclo	15	c	11
Continua multietapas	12	c	11
Extractiva	90	ls	3
Continua	5	c	11
Lotes	2	c	11
Extractiva	0.7-0.9	ls	*
Lotes	2.2	ls	10

T.D. Tecnología disponible
c comercial
ls laboratorio demostración
* este trabajo

Tabla 4. Coeficientes de partición para etanol en agua, medio de fermentación y solventes.

Medio	Solvente	Coefficiente	Temper. C	Ref.
Agua	Alcanos	0.005-0.008	25	2
Agua	Aromáticos	0.02-0.01	25	2
Agua	Esteres	0.1-0.3	25	2
Agua	Cetonas	0.1-0.3	25	2
Agua	Alquil. Fosfat.	0.7	25	2
Agua	Alcohol Alto P.M.	0.1-0.15	25	2
Agua	Kerosene	0.009	30	*
Medio 12 Brix	Kerosene	0.012	30	*

pecto a los reportados en la literatura para otras sustancias, se observa que corresponden a hidrocarburos.

CONCLUSIONES

Aunque el solvente afecta la célula y por consiguiente la productividad del proceso de fermentación extractiva (líquido-líquido), se logra aumentar el rendimiento y productividad referido al volumen de mosto de la fermentación alcohólica cuando se utilizan altas relaciones solvente-mosto. Sin embargo, la productividad volumétrica referida al volumen total se hace mucho menor a medida que se aumenta dicha relación.

Una posible utilización industrial del proceso requiere el empleo de un solvente con un alto coeficiente de distribución para garantizar una baja relación solvente-mosto y una cepa con resistencia al solvente y alta velocidad de fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. MINIER M. y GOMA G. "Production of Ethanol by coupling fermentation and solvent extraction", *Biotechnology letters*, 3, 405, 1981.
2. MURPHY T., BLANCH H. y WILKE C. "Water recycling in extractive fermentation", *Process Biochemistry*, Nov. 1982.
3. MINIER M. y GOMA G. "Ethanol production by extractive fermentation", *Biotechnology Bioengineering*, 26 (2), 420, 1984.
4. MUNK V. VOLFOVA O. y MOSTECKY J. "Cultivation of the yeast *Candida lipolytica* on hydrocarbon-iii" *J. Folia Microbiology*, 14, 334, 1969.
5. GOMA G., PAREILLEUX A. y DURAN G. "Cinetique de degradation des hydrocarbures par *Candida lipolytica*", *Arch. Microbiology*, 88, 97, 1972.
6. GILL C. y RATLEDGE C. "Toxicity of n-alkanes, n-alkenes-1, n-alcan-1-oles and n-alkyl-1-bromides towards yeast"; *J. Gen. Microbiology*, 72, 165, 1972.
7. JAIN M. "Biotechnolgy biophysic", 509, 1978.
8. MINA M. C. y DÍAZ M. P. "Recirculación de vinazas en la fermentación alcohólica", Tesis Ingeniería Química-Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 1987.
9. DANIELS F.; MATHEWS J. y WILLIAMS J. *Experimental Physical Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1941.
10. CAICEDO L. A.; DÍAZ M. P. y MINA M.C. "Facilidad técnica de recirculación de vinazas en la Fermentación alcohólica", *Memorias XV Congreso de Ingeniería Química*, 307, 1987.
11. TOFIÑO CARLOS J. "Estudio de la aclimatación de un inóculo a las vinazas", Tesis, Ingeniería Química, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 1987.