

# RENDIMIENTOS DE BIOETANOL EN FERMENTACIONES REALIZADAS CON MOSTOS DE ALTA CONCENTRACION DE SOLIDOS

Romina A. Beltrán, Nadia Z. Comba

Tutor: Luis A. Toselli.

Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química -GISIQ - F. R. Villa María de la UTN Av. Universidad 450, X5900HLR, Villa María, Córdoba, Argentina.  
romibeltran@yahoo.com.ar

## Resumen

En el presente trabajo se desarrollaron experiencias de laboratorio a efectos producir bioetanol a partir de almidón de maíz mediante el desarrollo completo de la secuencia de operación que se corresponde con la tecnología de licuefacción con sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). Se propone como objetivos evaluar la eficiencia y el rendimiento en la producción de etanol utilizando mostos de alta concentración de sólidos (contenido en materia seca superior al 25%).

Para realizar los ensayos se utilizaron enzimas de uso industrial de última generación producidas por la empresa Danisco (Div. Genencor, alfa y glucoamilasa marca Spezyme Alpha™ y Distillase™ SSF), levaduras Ethanol Red™ de la empresa Fermentis (Division of S.I.Lessaffre) y antibacterianos tanto natural (IsoStab™) elaborado por la empresa BetaTec como también virginiamicina (Lactrol™) de Phibro Ethanol Performance Group a efectos de garantizar un control de contaminación de las bacterias Gran Positivas.

Se analizó cuantitativamente el rendimiento en bioetanol mediante un control indirecto tal como la evolución del descenso de peso de las muestras, por eliminación de dióxido de carbono y mediante análisis de variabilidad en °Brix, lo cual permitió un seguimiento del azúcar producido por hidrólisis y consumido durante la fermentación del mosto. Tales parámetros fueron evaluados frente a variaciones en la dosificación de enzimas y levadura y distintas granulometrías de molienda.

Se han alcanzado y evaluado distintos rendimiento de fermentación los cuales son analizados frente a las variaciones de los parámetros considerados y condiciones operativas. Se obtuvieron resultados que avalan la conveniencia de trabajar con concentraciones elevadas (del orden de 35% sólidos) y con granulometría fina para una mejor performance del proceso, evaluándose al mismo tiempo algunas dificultades que presenta el operar a tales concentraciones.

## Introducción

El proceso de obtención de etanol comienza con la conversión enzimática de almidón a glucosa usando mezclas de enzimas que actúan en diferentes etapas de su hidrólisis. Para la licuefacción se utiliza  $\alpha$ -amilasa, a fin de romper el almidón en dextrinas y reducir rápidamente la viscosidad del mosto. En la sacarificación se emplea glucoamilasas, transformando las dextrinas en azúcares fermentables, esta etapa ocurre de manera simultánea con la fermentación producida por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, que finalmente convierten a estos azúcares en etanol. La bioconversión óptima de azúcar a alcohol exige una cepa de levadura capaz de tolerar altas concentraciones de etanol, porque este inhibe la multiplicación y los procesos de fermentación.

Para realizar los ensayos se utilizaron enzimas de uso industrial de última generación, cepas de levadura que toleren elevada concentración de alcohol y presión osmótica y antibacterianos disponibles en el mercado a efectos de garantizar un control de contaminación de las bacterias gran positivas. Altos números de estas conducen a la disminución del crecimiento y del metabolismo de las levaduras debido a la competencia por los nutrientes disponibles y la excreción de metabolitos tóxicos como el ácido láctico. La evolución de los parámetros durante la licuefacción, sacarificación y fermentación fueron monitoreados durante el proceso y finalmente el rendimiento en etanol y consumos específicos fueron calculados para estimar la eficacia del proceso.

Las experiencias que se han desarrollado, a escala laboratorio fueron realizadas aplicando protocolos de ensayos que responden a metodologías semejantes a las propuestas por la empresa Fermentis (Division of S.I.Lessaffre).

En la actualidad se está desarrollando las primeras experiencias en un bioreactor de escala piloto en donde se procederá a analizar el comportamiento para rangos de concentraciones semejantes, esto es de 25 a 35 % p/p de sólidos totales.

## Materiales y Métodos

Los pasos previos necesarios para comenzar con las experiencias consisten en la determinación del contenido de almidón, según método oficial AOAC 920.44 y 906.03 (AOAC, 1998) y de humedad (método gravimétrico) del maíz a utilizar. Una vez obtenidos los mismos se procedió con la molienda que tiene como propósito romper el grano llevándolo a una granulometría adecuada para facilitar la penetración posterior del agua en el proceso de cocción. Las distintas granulometrías alcanzadas en comparación con la detallada en bibliografía específica se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Granulometría recomendada vs. obtenida en distintos tipos de molinos.

Mallas	(Kelsall y Lyons, 2003).	Granulometría 1 (fino)	Granulometría 2 (grueso)
12	3.00	14.76	31.95
16	8.00	30.78	25.61
20	36.00	17.80	14.03
30	20.00	8.70	6.96
40	14.00	8.73	7.91
60	12.00	6.25	7.54
Fondo	7.00	12.97	6.00

La preparación del mosto consiste en la mezcla de agua, maíz molido y una dosis de enzima ( $\alpha$ -amilasa) que luego es cocida en un recipiente ligeramente presurizado alcanzando los parámetros de tiempo temperatura necesarios para producir la gelatinización del almidón, en donde los gránulos del mismo comienzan a absorber agua e hincharse perdiendo de esta manera su estructura cristalina. Una vez realizada la cocción se realiza un flasheo del mosto por un periodo corto de tiempo hasta ajustar el contenido de sólidos de acuerdo a necesidades de proceso (Kelsall y Lyons, 2003).

Los pasos siguientes consisten en el enfriamiento del mosto y agregado de la dosis restante de  $\alpha$ -amilasa, procediéndose a medir la concentración alcanzada en Brix como condición de partida del proceso SSF. Luego se continúa enfriando y ajustando el pH de manera de poder agregar la glucoamilasa y la levadura previamente hidratada. En la tabla 2 se puede observar las especificaciones de las enzimas y levadura utilizadas (Power, 2003).

Tabla 2: Especificaciones de las enzimas y levaduras.

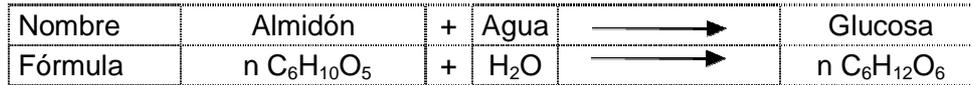
	Enzimas		Levadura
Tipo	$\alpha$ -amylase	Glucoamilasa	Saccharomyces cerevisiae
Marca	Genencor. A Danisco Division.		Fermentis
Tipo	Spezyme R Alpha	Distillase R SSF	Ethanol Red
Rango de pH	Entre 5 y 6	Entre 4 y 4.5	Entre 4 y 5
Rango de Temperatura	83 a 85 °C	28 a 35 °C	30 a 35 °C
Dosificación	0.020 a 0.024 % p/p	0.06 to 0.08 % p/p	de 0.25 a 0.5 g/L

Se registra el peso de los erlenmeyers vacíos, teniendo la precaución de secarlos bien, de forma tal de no registrar pesos que puedan interferir en las mediciones. Este constituye el punto cero. Una vez terminado el mosto se cargan con 250 y 300 g del mismo cerrando los recipientes con un

airlock con sello de aceite y se registra el peso final. El airlock permite así la salida de CO<sub>2</sub> generado en el proceso fermentativo.

Luego, se coloca los erlenmeyer en estufa a 32 °C en un agitador orbital por un tiempo aproximado de 96 hs, como se puede observar en la figura 1. Durante la incubación, se registra el peso de estos cada 24 horas verificándose que los mismos estén completamente secos. Este método de descenso de peso se basa en la pérdida de CO<sub>2</sub>, que permite estimar indirectamente la cantidad de etanol generada, ya que ambos son productos de la fermentación. Las reacciones que se producen son las siguientes:

En la primera etapa se debe convertir el almidón a glucosa por medio de las enzimas nombradas anteriormente.



La segunda y última etapa consiste en que la levadura convierta la glucosa en etanol y dióxido de carbono.

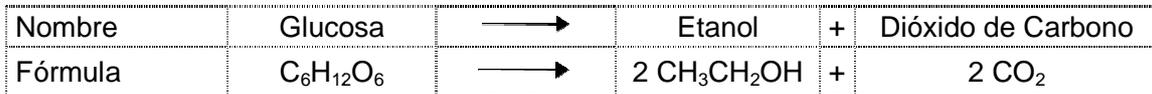


Figura 1: Sistema experimental utilizado para ensayos SSF.

Las bacterias en la fermentación alcohólica consumen glucosa que está disponible para producir subproductos indeseables como ácido láctico y ácido acético. Las más comunes en los medios de fermentación son las Gram Positivas. Estas infecciones son factor importante que afecta el rendimiento de alcohol, que a su vez tiene un impacto en la economía de la destilería. (Russell, 2003).

Tabla 3: Características de los antimicrobianos utilizados.

Producto	Estado de agregación	Dosificación
<b>IsoStab</b>	Líquido	Valores normales recomendados 30 ppm en los fermentadores. (Admite agregados parciales en propagadores).
<b>Lactrol</b>	Sólido (contenido en bolsas hidrosolubles biodegradables)	Dosis recomendadas es de 0.25 ppm a 2.0 ppm, dependiendo de la concentración de bacterias presentes.

Una vez preparado el mosto y agregada la levadura, se realizaron distintos ensayos con dosificación de dos tipos de antimicrobianos: IsoStab<sup>TM</sup> que es derivado natural del lúpulo (producido por la empresa BetaTec) y actúa reduciendo el pH en el interior de las bacterias, inhibiendo su capacidad para transferir glucosa a través de la pared celular. En esencia, las bacterias no pueden alimentarse, cesa su capacidad reproductiva y finalmente muere. El segundo producto en cuestión es Lactrol<sup>TM</sup>, de PhibroEthanol Performance Group, que está compuesto de virginiamicina y dex-

trosa, su efecto está basado en la acción combinada de estas moléculas que inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias provocando el cese de su capacidad de multiplicarse (bacteriostasis) y lisis posterior (ruptura y muerte celular). En la tabla 3 se detallan características de los antimicrobianos citados.

## Resultados

En las experiencias realizadas se obtuvo que el molido más fino alcanza un mayor descenso de peso, alrededor de 30% en comparación con un promedio de 25 % de descenso alcanzado frente al molido grueso, esto se debe a que el almidón está más expuesto y las enzimas pueden degradarlo rápidamente, en la figura 2 se muestran estos resultados. Se debe considerar que un exceso de finos puede resultar contraproducente, generando problemas para la recuperación de los subproductos. En la figura 3 se visualiza que el porcentaje de variación de pérdida de peso por día es mayor al inicio de la fermentación para el molido fino y la diferencia va disminuyendo a medida que avanza la fermentación.

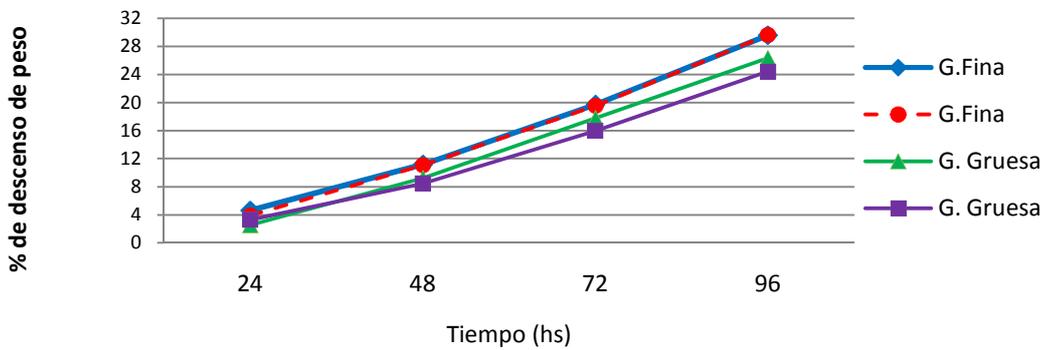


Figura 2: % de pérdida de peso en mostos con diferentes granulometrías.

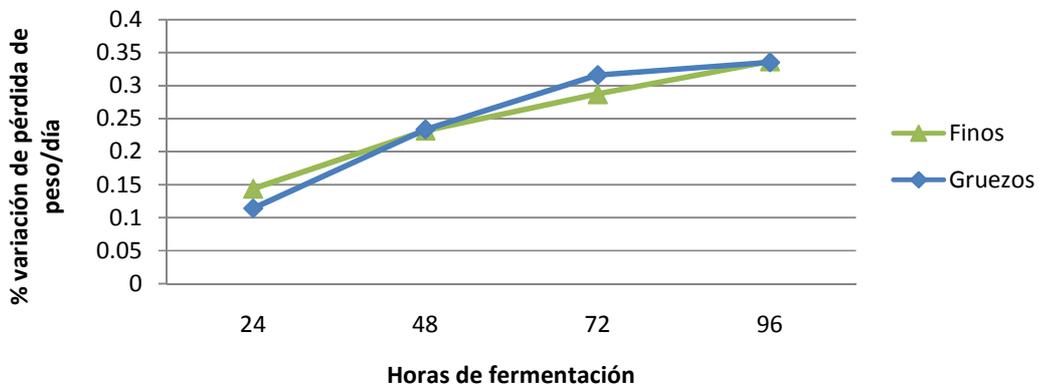


Figura 3: % de variación de pérdida de peso/día en mostos con distintas granulometrías.

Para concentraciones del 35 % se obtiene un mayor rendimiento de alcohol, con descensos de pesos de ~ 31%, frente a mostos menos concentrados. La figura 4 muestra la capacidad de las levaduras de trabajar en un medio, en donde aún cuando disponen de mayores cantidades totales de glucosa para el proceso fermentativo, deben responder a mayores condiciones de estrés, como es la mayor concentración de sólidos, velocidad de generación de dextrinas y azúcares fermentables, incrementos de la presión osmótica, entre otras. La figura 5 muestra la mayor variación de pérdida de peso para mostos concentrados hasta promediar la fermentación, luego de lo cual dicho comportamiento se atenúa.

Otros parámetros experimentales medidos: Brix del mosto inicial y final de la fermentación se muestran en la tabla 4. Actualmente se están realizando determinaciones en un equipo de arreglo de Diodos marca Perten 7200 para obtener valores de °Brix, DP4, DP3, Maltosa, Glucosa, ácido láctico, glicerol, ácido acético, entre otros, para un control más preciso de la SSF.

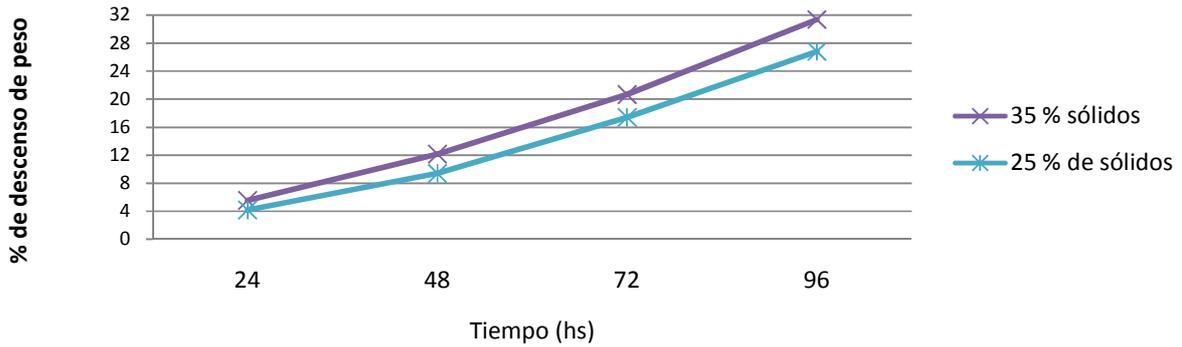


Figura 4: % de pérdida de peso de mostos con distinta concentración de sólidos.

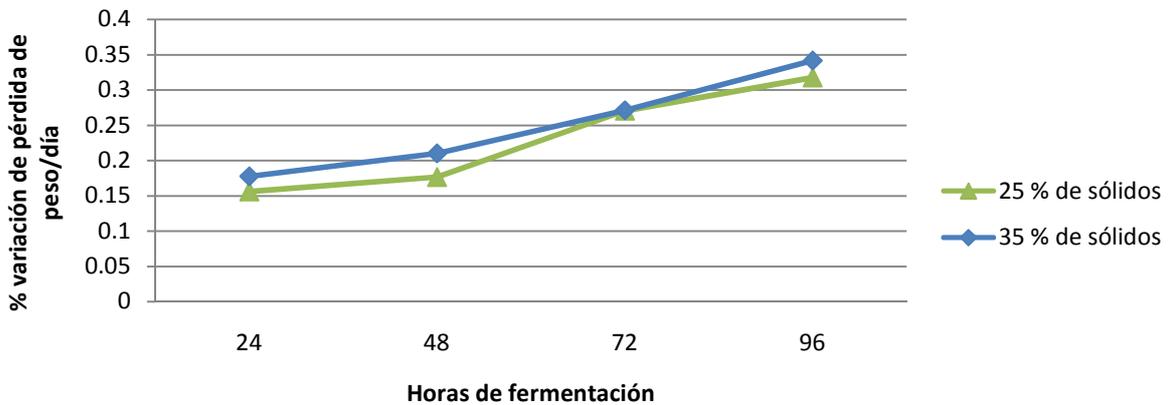


Figura 5: % de variación de pérdida de peso/día en mostos con distintas concentración de sólidos.

Tabla 4: Brix obtenidos en los distintos ensayos.

Tipo de ensayo	Finos	Gruesos	25 % de sólidos	35 % de sólidos
Brix Iniciales	15.5	16.7	15	13.6
Brix Finales	5.75	6.15	6.2	8.55

En la figura 6 se observan los resultados de aplicación de los antimicrobianos citados, verificándose que no existió una marcada diferencia en el comportamiento para las condiciones ensayadas, requiriendo entonces continuar con la evaluación de su comportamiento.

En la figura 7 se muestran resultados del proceso SSF para mostos tratados con doble dosis de enzimas y levaduras.

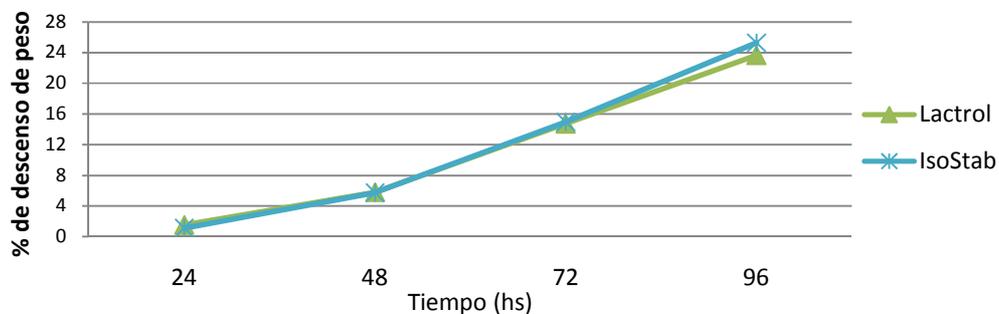


Figura 6: % de pérdida de peso utilizando distintos antibióticos en el mosto.

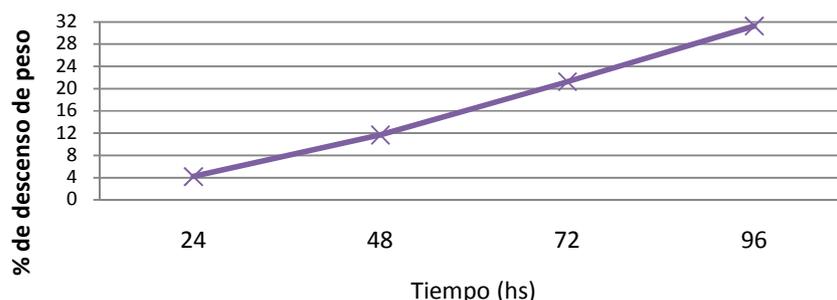


Figura 7: % de descenso de peso con mosto preparado con doble dosis de enzimas y levaduras.

## Conclusiones

De lo expuesto se puede concluir que:

- i) La menor granulometría permitió alcanzar una mayor eficiencia fermentativa, aun cuando deberá considerarse sus efectos en la posterior separación de subproductos.
- ii) La concentración de sólidos del 35 %, como era de esperar arrojó un mayor rendimiento de etanol, aun cuando deberá evaluarse su factibilidad de aplicación en procesos existentes como consecuencia de eventuales obstrucción en equipos y tuberías.
- iii) Para las condiciones evaluadas no existieron mayores diferencias de efectividad entre ambos agentes antimicrobianos.
- iv) Como se esperaba, el incremento en las dosis de enzimas y levaduras mejoró el rendimiento del proceso y se está trabajando en la búsqueda de un óptimo dado que el consumo de estos insumos incide en el costo de producción.
- v) Para aumentar el rendimiento de etanol en una planta se deberá ajustar sus parámetros de proceso a la modalidad de trabajo más favorable en función de su equipamiento.
- vi) A partir de la experiencias desarrolladas se avanzará, a futuro en el estudio de otras propiedades de interés para las etapas de separación de etanol y subproductos.

## Agradecimientos

A la SCyT de la FRVM de la UTN por el apoyo recibido para el desarrollo del presente trabajo y a la empresa Porta Hnos S.A. por sus aportes de insumos, equipamientos y disponibilidad de información técnica específica que permitieron la realización de los ensayos experimentales. Los cuales fueron recibidos en el contexto del convenio de vinculación tecnológica existente.

## Referencias

1. Kelsall D.R. and Lyons T.P.. The Alcohol Textbooks. Chapter 2: Grain dry milling and cooking procedures: extracting sugars in preparation for fermentation pág.9-21.
2. Kelsall D.R. and Lyons T.P.. The Alcohol Textbooks.Chapter 10: Practical management of yeast: conversion of sugars to etanol pag. 121-133. Alltech Inc., Nicholasville, Kentucky, US.
3. Power R. F.. The Alcohol Textbooks. Chapter 3: Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars pág. 22-32. North American Biosciences Center, Alltech Inc., Nicholasville, Kentucky, USA.
4. Russell I.. The Alcohol Textbooks. Chapter 9: Understanding yeast fundamentals Pág 85-119. International Centre for Brewing and Distilling, School of Life Sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh, UK.
6. Oficial Methods Of Analysis Of AOAC International. 16 th Edition. 4th Revision. 1998.
7. Begea M., Bâldea G., Cîmpeanu C., Stoicescu C., Begea P.; "Utilization of Last Generation Enzymes for Industrial Use in Orden to Obtain Bioethanol From Locally Available Agricultural Renewable Resources". Romanian Agricultural Reseach, No.27, (2010) Print ISSN 1222-4227; Online ISSN 2067-5720.
8. Rückle L., Senn T., "Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production". BetaTec Hopfenprodukte GmbH, Freiligrathstr. 7-9, 90489 Nuremberg, Germany.