

Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas

Continuous ethanol production from banana waste (peel and pulp) using immobilized cells

Zapata Ana María y Peláez Carlos *

Resumen. En el trabajo del que da cuenta el presente artículo se estudió la producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo utilizando células inmovilizadas en alginato de sodio. Se compararon las fermentaciones en *batch* con células libres e inmovilizadas (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizando medio estándar de fermentación y mosto de banano como sustrato. Las fermentaciones con mosto de banano presentaron un incremento del 31% en la producción de etanol durante las primeras 14 horas de fermentación, pasando de producir 33.78g/L de alcohol con células libres a 44.18g/L con células inmovilizadas.

Palabras clave: *Banano, Inmovilización, Producción de etanol, Proceso continuo, Saccharomyces cerevisiae.*

Abstract. In this paper we present results of our study of the continuous production of ethanol from banana waste using cells immobilized in sodium alginate. Experiments compared *batch* fermentation with free and immobilized cells, using fermentation standard medium and banana juice as substrate. The fermentations with banana juice showed a 25% increase in ethanol production during the first 14 hours of fermentation, the ethanol production was 33.78 g/L and 44.18 g/L with free and immobilized cells respectively.

Key words: *Banana, Immobilization, ethanol production, continuous production, Saccharomyces cerevisiae.*

* Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM, Instituto de Química-Universidad de Antioquia. Correo electrónico cpelaez@matematicas.udea.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la utilización de procesos biotecnológicos para la obtención de bienes y servicios se ha convertido en una gran alternativa que ofrece soluciones a problemas provenientes de la aplicación de tecnologías tradicionales. En Colombia se han obtenido avances tecnológicos y productivos importantes en la aplicación de la biotecnología en cuanto a la producción de biocombustibles se refiere. En la actualidad existen 5 plantas de biodisel y 5 plantas para la generación de bioetanol a partir de caña de azúcar. La producción de bioetanol se realiza mediante un proceso fermentativo en el cual se utilizan microorganismos capaces de convertir el azúcar en etanol. Usando levaduras *S. cerevisiae* para la producción de etanol en fermentaciones tradicionales en *batch*, la productividad está limitada entre 1.8 a 2.3 g/Lh, la cual es baja y resulta costosa para la producción de biocombustible. Sin embargo, el uso de fermentaciones en continuo puede duplicar dicha productividad (Vargas *et al.*, 2001; Baptista *et al.*, 2006) y más aun, si se utiliza retención celular, tal como en el caso de Brasil, en donde centrifugaciones continuas son usadas para reciclar biomasa (Baptista *et al.*, 2006).

Las estrategias para la retención celular incluyen la separación en la corriente de producto, seguida de un reciclo al fermentador o inmovilización dentro del fermentador. Esta última técnica ha sido previamente estudiada debido a los beneficios que presenta comparada con los procesos con células libres, ya que ayuda a mantener la actividad enzimática garantizando una buena actividad celular durante la fermentación, de modo que permite tener una reducción de los tiempos de proceso, entre otras ventajas (Kourkoutas *et al.*, 2004; Najafpoue *et al.*, 2004; Jianliang *et al.*, 2007).

El banano es una materia prima apta para la obtención de bioetanol. Presenta un alto contenido de carbohidratos (aproximadamente 20% de su peso) aptos para procesos fermentativos encaminados a la producción de alcohol lo cual constituye una característica importante que converge con el hecho de que en el país se generan cada año aproximadamente 800 mil toneladas de banano de rechazo y material lignocelulósico derivado del proceso (vástago y pseudotallo). Actualmente una tercera parte de la fruta que no se exporta (rechazo) se destina al consumo interno, otra tercera parte se emplea como materia prima en la producción de fertilizantes orgánicos (compost) para el cultivo de la misma fruta, y una tercera parte continúa considerándose como residuo. Son precisamente estos últimos dos tercios del residuo los que potencialmente se pueden usar en procesos de fermentación alcohólica (Sierra D. M., 2007; Augura, 2008).

Desde el año 2005 el Grupo GIEM de la Universidad de Antioquia ha venido investigando sobre la producción de biocombustibles de segunda generación (Arenas *et al.*, 2009). Uno de sus primeros acercamientos fue la construcción de una planta piloto para la producción de bioetanol a partir de banano de rechazo, que tiene una capacidad instalada para producir 5000L/día de etanol al 95%. La planta ha sido operada en lotes a partir de 500L de jugo de banano y se han obtenido rendimientos del 8% de alcohol (v/v) usando una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se plantea la necesidad de evaluar la producción en continuo de etanol, ya que de acuerdo con lo reportado en la literatura, esta forma de operación permite obtener altos rendimientos y presenta ventajas operativas como la recuperación celular y la estabilidad de los procesos (Najafpour *et al.*, 2004; Baptista *et al.*, 2006). Es por ello que se propone implementar un proceso de producción en continuo para la producción de etanol empleando células inmovilizadas y mosto a partir de banano.

2. METODOLOGÍA

Microorganismos. Se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ABG, que fue aislada y caracterizada en el Laboratorio de Microbiología del Grupo GIEM. Esta cepa se aisló de una única colonia de levaduras adaptadas para crecer en jugo de banano.

2.1 Medio de cultivo para fermentaciones

Como sustrato se utilizó mosto de banano, el cual fue procesado mediante un proceso de molienda y filtración con agua caliente (60°C) para garantizar una buena extracción de los azúcares fermentables, los cuales deben estar en una concentración entre 16 y 20° Brix en el mosto final.

Las fermentaciones realizadas con mosto de banano fueron comparadas con fermentaciones realizadas empleando un medio estándar, el cual contenía 100g de sacarosa, 2g de KH₂PO₄, 3g de (NH₄)₂SO₄, 1g de MgSO₄·7H₂O, 4g de extracto de levadura, 3.6g de peptona (valores por litro).

2.2 Inmovilización celular

Se realizó con una solución de alginato de sodio al 1.5% y una solución de CaCl₂ al 3% (Agudelo, 2007).

2.3 Métodos de análisis

La biomasa se cuantificó por peso seco, los azúcares por °Brix y el etanol por cromatografía gaseosa (Equipo Marca Agilent 6890 con detector FID, columna Carbowax 20M de 50m de longitud y 1 mm de diámetro interno, volumen de inyección 1 µL, Split de 1:50. Temperatura del inyector 200 °C y flujo de 20 mL/min de H₂).

Adicionalmente se determinó la viabilidad y vitalidad celular. Se entiende la viabilidad como el porcentaje de células que se encuentran vivas en un cultivo y la vitalidad como su capacidad para realizar todas sus funciones, especialmente la producción de alcohol. El seguimiento de la viabilidad se realizó por medio de tinción con azul de metileno y conteo celular en cámara de Neubauer. La vitalidad fue determinada por la medición del poder de acidificación, de acuerdo con el protocolo presentado por Smart K. (2000), que consiste en la medición del cambio de pH que la levadura es capaz de producir de manera espontánea o por la adición de un carbohidrato metabolizable (sustrato inductor).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Mosto de banano

En la siguiente tabla se muestran las principales características del mosto obtenido a partir de banano. El rendimiento de la extracción del mosto de banano fue de 0.96L/Kg.

Parámetro	Expresado como	Valores	Unidades
Nitrógeno	N total	0.52	g/L
Potasio	K ₂ O	8.34	g/L
Calcio	CaO	7.54	g/L
pH	pH	5.64	-
Carbono Orgánico	C.O	80.64	g/L
Relación C/N	No aplica	155.0	-
Densidad	Densidad	1.05	g/ml
Sólidos totales	No aplica	163.46	g/L
Azúcares	° Brix	15.5	Brix (g/100ml)

Tabla 1. Caracterización del jugo de banano.

Los resultados obtenidos muestran que el jugo de banano tiene un alto contenido de materia orgánica y azúcares, los cuales son considerados componentes principales en

un sustrato destinado a la producción de alcohol. Adicionalmente este jugo presenta un contenido de nutrientes necesarios para el crecimiento y funcionamiento de las levaduras, como el nitrógeno, el calcio y el potasio.

Con el objetivo de establecer las ventajas del proceso de fermentación utilizando células inmovilizadas y jugo de banano como sustrato, se realizaron fermentaciones *batch* con células libres. Como lo ilustra la Figura 1, se obtuvieron aproximadamente 6 g/L más de etanol en las fermentaciones realizadas con mosto de banano. El rendimiento $Y_{p/S}$ ($\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$) fue de 0.3 para medio estándar y 0.48 para el jugo de banano, y las productividades 1.96 y 2.41g/Lh, respectivamente. Los valores de productividad reportados para glucosa en lote están entre 1.8 y 2.5 g/Lh (Jianliang *et al.*, 2007). El rendimiento de etanol fue de 0.040 L/Kg de banano. Hammond *et al.* (1996) reportaron un rendimiento de 0.081 L/Kg de banano en fermentaciones *batch*, mientras que en los experimentos realizados en el Laboratorio GIEM se han alcanzado rendimientos de 0.064 L/Kg de banano (Arenas *et al.*, 2009).

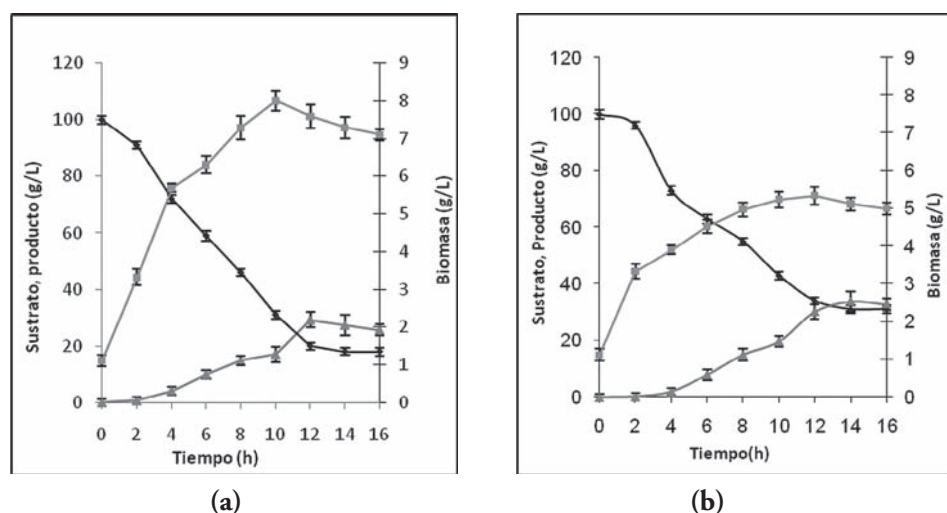


Figura 1. Cinéticas de fermentación *batch* de células libres. (a) Medio de cultivo estándar. (b) Jugo de banano. □ Biomasa, Δ etanol, ♦ sustrato.

En la Figura 2 se observa el seguimiento de la viabilidad y vitalidad celular para las fermentaciones en *batch* con células libres. Durante las primeras horas del proceso se presenta una pequeña disminución de la viabilidad en ambos cultivos, y posteriormente ésta se mantiene a lo largo de toda la fermentación. Por otra parte, las levaduras se mantienen vitales durante la fermentación. Los resultados encontrados

muestran que el jugo de banano no afecta de manera significativa la vitalidad ni la viabilidad de las células, y ambos sustratos presentan el mismo comportamiento. Las diferencias encontradas se presentan en la velocidad a la cual decrecen los parámetros, lo cual puede observarse en la pendiente de las gráficas.

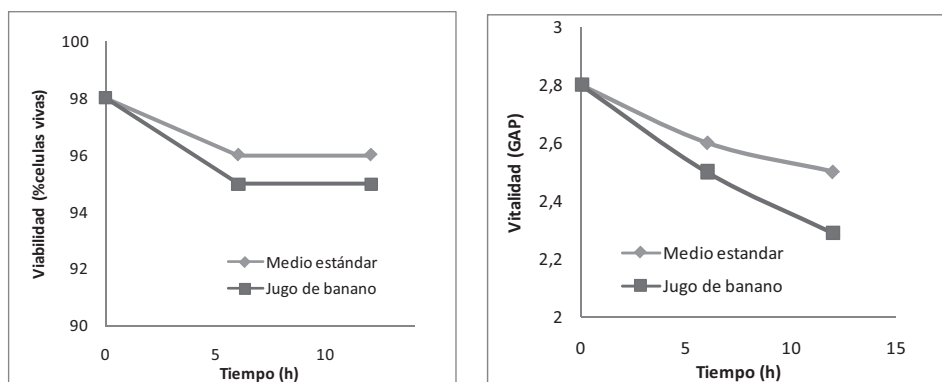


Figura 2. Viabilidad y vitalidad de levaduras durante las fermentaciones *batch*.

3.2 Fermentaciones en *batch* alimentado con células inmovilizadas

Con el objetivo de estudiar el efecto en el tiempo de la fermentación sobre las células inmovilizadas, se realizaron experimentos en *batch* con cambio de medio de cultivo cada 24 horas. Estas fermentaciones fueron realizadas con medio estándar de fermentación y jugo de banano, para observar las diferencias entre los dos sustratos y los efectos que éstas podía tener sobre la vitalidad de las células inmovilizadas. Los resultados en las primeras horas fueron comparados con los obtenidos para células libres. Como se esperaba, la inmovilización tuvo un efecto positivo en la velocidad y producción de alcohol. Durante las primeras 14 horas las fermentaciones con medio estándar (Figura 3) pasaron de una producción de 27.47 g/L con una productividad de 1.96 g/L h a producir 36.18 g/L con una productividad de 2.48g/L h. En las fermentaciones con jugo de banano (Figura 4), se presentó un incremento del 25% en la producción de alcohol, pasando de 33.78g/L con células libres a 44.18g/L con células inmovilizadas. Este incremento en la productividad por efecto de la inmovilización ha sido reportado por varios autores que argumentan que el soporte de inmovilización puede actuar como un catalizador en el proceso producción de alcohol (Jianling, 2007; Najafpour, 2007; Swain, 2007).

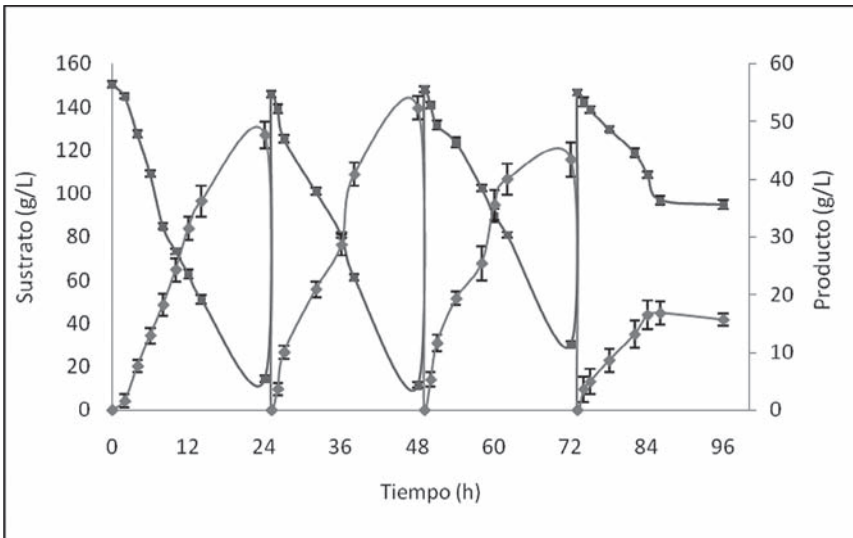


Figura 3. Cinéticas de fermentación en *batch*-alimentado utilizando células inmobilizadas con medio estándar. ♦ Producto (etanol), □ Sustrato.

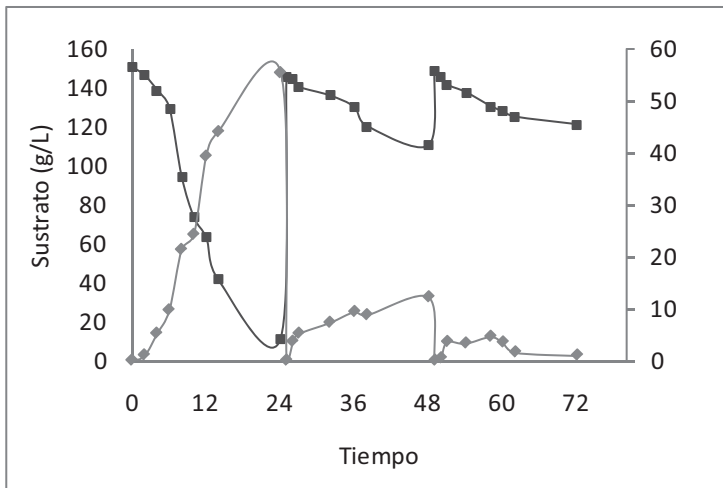
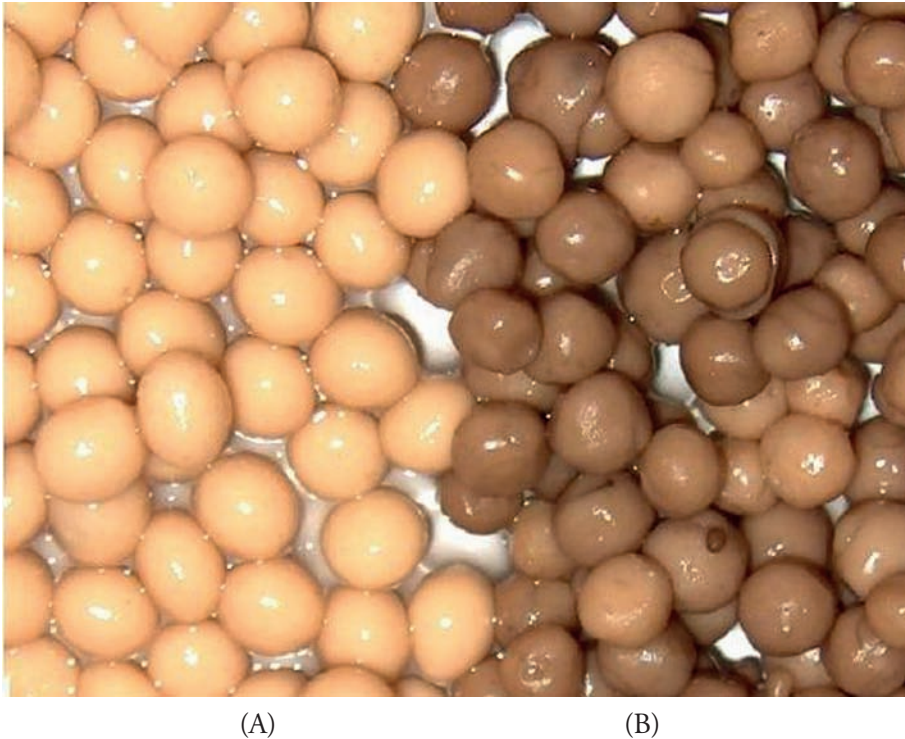


Figura 4. Cinéticas de fermentación en *batch*-alimentado utilizando células inmobilizadas con jugo de banano. ♦ Producto (etanol), □ Sustrato.

En las fermentaciones con jugo de banano no se obtuvieron los resultados esperados. Si bien en las primeras 14 horas del proceso el consumo de sustrato y la producción de alcohol llegaron a valores óptimos, la estabilidad de las esferas se vio afectada el

segundo día de fermentación, observándose fisuras en la superficie y deformaciones de la misma (Fotografía 1). La pérdida de estabilidad ocasionó una pérdida de vitalidad que se vio reflejada en la baja velocidad de consumo de sustrato y en la reducción de la producción de alcohol. En la Fotografía 1 se muestran las esferas de células inmovilizadas en alginato antes y después de las fermentaciones con jugo de banano.



Fotografía 1. Esferas de células de levaduras inmovilizadas en alginato de sodio antes (A) y después (B) de fermentaciones en *batch* alimentado.

La vitalidad de las células disminuyó considerablemente durante todo el tiempo de las fermentaciones en *batch*-alimentado en los procesos llevados a cabo con jugo de banano. En los procesos realizados con medio estándar, la vitalidad de las células se mantuvo prácticamente constante después de una leve disminución en las primeras 12 horas. En la Figura 5 se puede ver la disminución de la vitalidad de las levaduras.

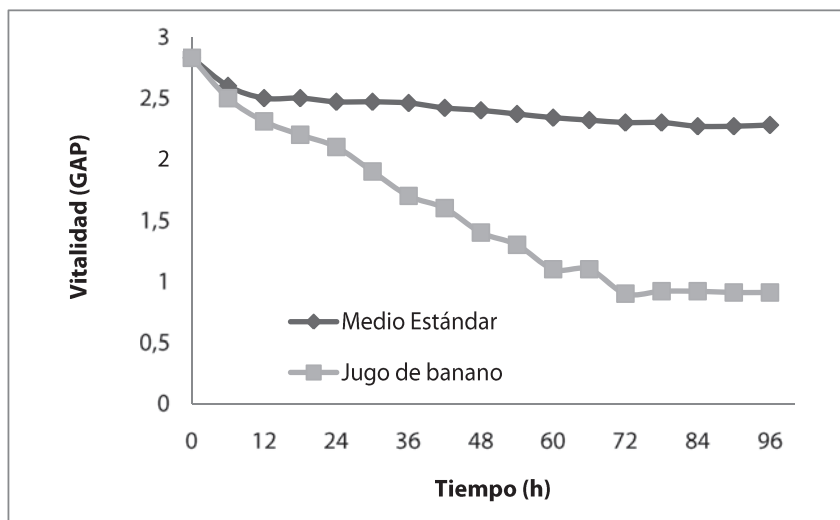


Figura 5. Variación de la vitalidad de células inmobilizadas durante las fermentaciones en *batch*-alimentado.

Para las fermentaciones con medio estándar, los efectos fueron menos pronunciados. Las esferas presentaron daños leves y la reducción en la producción de alcohol sólo fue significativa el cuarto día de fermentación (Figura 3). Los resultados con jugo de banano no indican que el sustrato no sea apto para producción de etanol. Como puede observarse en la figura 2, el jugo de banano no afectó la viabilidad ni la vitalidad de las levaduras en los procesos en *batch* con células libres, sin embargo no se puede descartar la presencia de sustancias o efectos secundarios que puedan afectar las células inmobilizadas, esto sumado a los efectos físicos mencionados anteriormente.

3.3 Fermentaciones en continuo con células inmobilizadas

Las fermentaciones en continuo se realizaron en el reactor piloto de 2L, con un caudal de operación de 7,0 ml/min, y un tiempo de residencia de 4 horas. En las Figura 6 y 7 se presentan las cinéticas del proceso continuo para la producción de alcohol por células inmobilizadas utilizando medio estándar y jugo de banano. Durante las primeras 14 horas de operación el sistema presentó un comportamiento similar al obtenido en el proceso en *batch*. Sin embargo, con el transcurso del tiempo se hicieron evidentes las consecuencias de la pérdida de estabilidad en las esferas de células inmobilizadas y se presentó una disminución en la producción de alcohol. Estos efectos fueron más pronunciados en los experimentos con jugo de banano.

El comportamiento de las cinéticas de las fermentaciones en continuo con medio estándar y mosto de banano fue significativamente diferente. Pasadas 45 horas de operación la producción de etanol con jugo de banano empezó a disminuir al tiempo que se incrementó la concentración de sustrato, lo que podría explicarse por la pérdida tanto de vitalidad como de viabilidad de las levaduras.

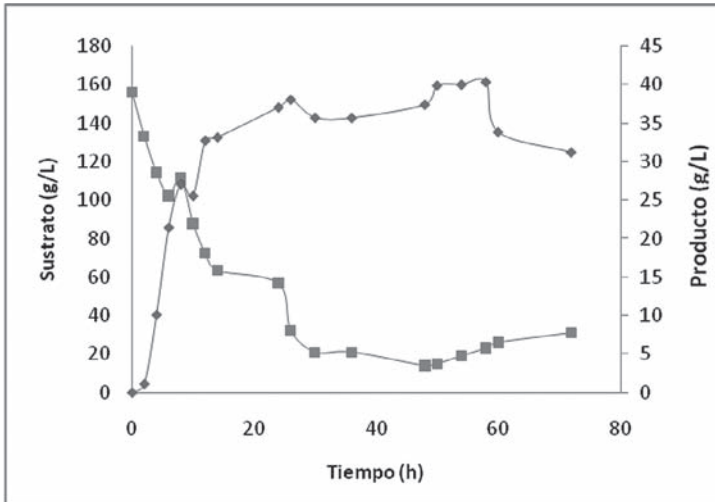


Figura 6. Proceso continuo para la producción de etanol con células inmobilizadas utilizando medio estándar. ♦ Producto (etanol), □ Sustrato.

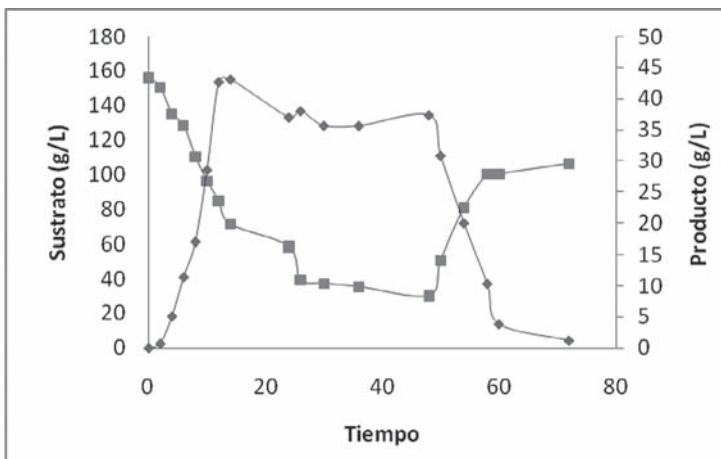


Figura 7. Proceso continuo para la producción de etanol con células inmobilizadas utilizando jugo de banano. ♦ Producto (etanol), □ Sustrato.

Los resultados permiten concluir que si bien el proceso de inmovilización en alginato de sodio es muy eficiente en cuanto a la retención de células, a la difusión del sustrato y al incremento de productividad, los efectos negativos sobre la estabilidad de las esferas a lo largo del tiempo hacen que no sea viable el escalamiento del proceso de producción de alcohol con células inmovilizadas en alginato de sodio usando como sustrato mosto de banano.

4. CONCLUSIONES

El jugo de banano presenta un alto potencial de uso como sustrato en los procesos fermentativos para la producción de alcohol. Con este sustrato se lograron altos rendimientos y una conversión del 90% con respecto a los valores teóricos reportados, lo que lo convierte en un sustrato promisorio para las fermentaciones alcohólicas.


No se obtuvieron resultados positivos en el proceso de producción de etanol en continuo con células inmovilizadas en alginato de sodio y utilizando jugo de banano como sustrato de fermentación. Cada uno de los procesos por separado arrojó buenos resultados, permitiendo concluir que el jugo de banano es un sustrato promisorio para la producción de etanol, y que los procesos de inmovilización permiten incrementar la productividad de etanol. Sin embargo en el caso de la inmovilización se requiere considerar otro tipo de sustratos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias y a la Universidad de Antioquia la financiación del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas A., Villa V., Acevedo J. M., Arroyave C., Guevara C., Mejía A., Peñaloza G.C., Zapata A., Peláez C. (2009). Producción de bioetanol a partir de banano de rechazo en publicación.
- Agudelo L. 2007. Escalado de un biorreactor con células inmovilizadas para la producción de etanol. Trabajo de grado de la maestría en Biotecnología. Inédito. Universidad de Antioquia.
- Baptista C. M. S. G., C'óias J. M. A., Oliveira A. C. M., Oliveira N. M. C., Rocha J. M. S., Dempsey M. J., Lannigan K. C., Benson P. S. (2006). Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 40:127 – 131.

- Jianliang Y., Xu Z., Tianwei T. (2007). A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotech.* 129:415-420.
- Hammond J. B., Egg R., Diggins D., Coble C. G. (1996). Alcohol from bananas. *Bioresource Technology.* 56: 125-130.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banar, I. M., Marchant, R., Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology.* 21: 377-397.
- Najafpour G., Younesi H., Ismail K. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology.* 92: 251- 260.
- Sierra D. M. (2007). Informe presentado en el comité Plan Puebla Panamá. Medellín. Gobernación de Antioquia. Inédito
- Smart K. (2000). *Brewing yeast fermentation performance.* Oxford Brookes University Oxford. Blackwell Science.
- Swain R. M., Kar S., Sahoo A. K., Ray R. C. (2007). Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research.* 162:93-97. 

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Zapata Ana María y Peláez Carlos. Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cascara y pulpa) empleando células inmovilizadas. Revista <i>Tumbaga</i> (2010), 5, 49-60	Día/mes/año 14/05/2010	Día/mes/año 24/05/2010