

PROCESO INNOVADOR PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES INDUSTRIALES CON ALTA CARGA ORGÁNICA Y PRODUCCIÓN SIMULTÁNEA DE BIOETANOL

Berrón, Constanza¹

¹Departamento de Medio Ambiente, Facultad de Ingeniería y Cs. Hídricas (FICH). UNL

Área: Ingeniería

Sub-Área: Ambiental

Grupo: Y

Palabras clave: Bebidas azucaradas, levadura, bioetanol

INTRODUCCIÓN

Los efluentes de la industria de bebidas azucaradas, en particular aquellos generados por operaciones de “descarte” (productos fuera de especificación durante producción, devolución desde góndola por vencimiento o calidad afectada, etc.) contienen azúcares simples en una concentración entre el 60 y 150 g/L, responsables de la alta carga orgánica de los efluentes. Los costos de almacenamiento y las operaciones de tratamiento previo a su disposición final representan un gran problema desde el punto de vista económico y ambiental. Como estrategia novedosa y de bajo impacto ambiental se visualizan estos efluentes como materias primas no convencionales, de bajo costo y renovables para la fermentación alcohólica mediada por levaduras (Isla y col., 2013; Comelli y col., 2016). Este proceso, permite reducir rápidamente la carga orgánica de los mismos y obtener productos con valor agregado tales como *bioetanol* y CO_2 de alta pureza, convirtiendo un proceso clásico de tratamiento en un proceso productivo rentable. Luego de remover la biomasa y el etanol se logra reducir en un 98% la carga orgánica inicial del efluente (Comelli y col., 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* var. Windsor, *S. bayanus* y *S. cerevisiae* var. Ethanol Red. Las mismas se mantuvieron a 4° C en medio sólido YPG (30 g/L de sacarosa, 3 g/L extracto de levaduras y 2 g/L de peptona de carne) y se propagaron mensualmente. Para los ensayos, se utilizó un medio sintético compuesto por un mix de gaseosa (65% de bebida gaseosa sabor cola, 28% sabor lima-limón y 7% sabor naranja, valores en función de los volúmenes de comercialización). Previo a la fermentación el inóculo se desarrolló con agitación constante durante 24 horas a $30 \pm 2^\circ$ C en medios de cultivo YPG líquido. La biomasa se separó por centrifugación, se realizaron lavados con agua destilada, se determinó la concentración y se resuspendió en un volumen adecuado del efluente a ensayar. Se ajustó el pH de los medios de fermentación y se suplementaron con diferentes nutrientes, en función del objetivo de cada ensayo: i) extracto de levaduras; ii) sales minerales o iii) un efluente de la producción de almidón de maíz rico en nitrógeno orgánico (licor de maceración), provisto por una empresa local de refinación de almidón de maíz. Los ensayos de fermentación alcohólica se realizaron en reactores de 100 mL, con sistemas de trampa de gases y toma de muestra para mantener esterilidad y anaerobiosis, en agitación y a temperatura de $30 \pm 0,1^\circ$ C. Periódicamente se extrajo 1 mL de muestra y se realizó un seguimiento en el tiempo de los siguientes parámetros: a) etanol, mediante el empleo de un equipo estático desarrollado por el grupo de trabajo sobre la base de un sensor de alcohol de óxido de estaño (marca

Proyecto: Obtención de productos de valor agregado como estrategia de bajo impacto ambiental para el tratamiento de efluentes de la industria de bebidas gaseosas

Director del proyecto: Raúl N. Comelli // Director del becario/tesista: Raúl N. Comelli

Figaro TGS 2620); b) azúcares, por métodos espectrofotométricos [azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959)]; c) biomasa, por espectrofotometría a 600 nm, relacionando esta medida con una curva patrón de sólidos suspendidos totales (SST), (APHA, 2005); d) glicerol, mediante utilización de kit enzimático, siguiendo las indicaciones del fabricante; y e) demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes tanto al inicio como luego de las fermentaciones y del efluente agotado y despojado del etanol mediante la técnica estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primera instancia, se estudió el impacto sobre las fermentaciones de diferentes fuentes de nitrógeno. Para los ensayos se utilizaron tanto fuentes de nitrógeno inorgánico (sales minerales) como orgánico (licor de maceración de maíz de una industria de refinación de almidón de maíz). Las fermentaciones se llevaron a cabo en nueve reactores utilizando las tres cepas de levaduras y suplementando el licor de maíz al 2,5; 5 y 10 %v/v. Se registró la evolución en el tiempo de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores y etanol. En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados para los reactores suplementados con 5 %v/v de efluente de licor de maíz. A tiempo final (22 horas), la producción de etanol había sido de 27,7 g/L para la cepa *S. cerevisiae* var. Windsor, 26,2 g/L para *S. bayanus* y 24 g/L para la var. Ethanol Red.

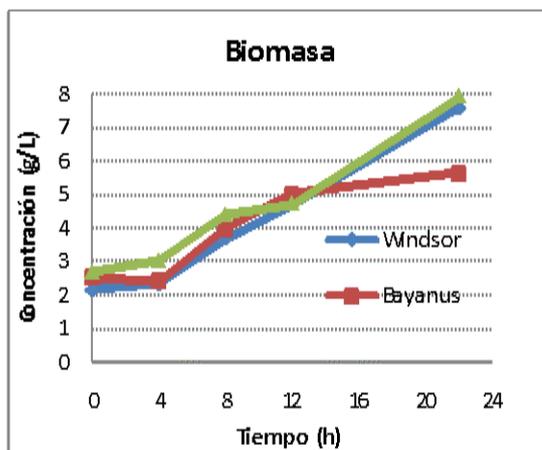


Figura 1. Evolución de la Biomasa utilizando licor de maíz al 5% como suplemento

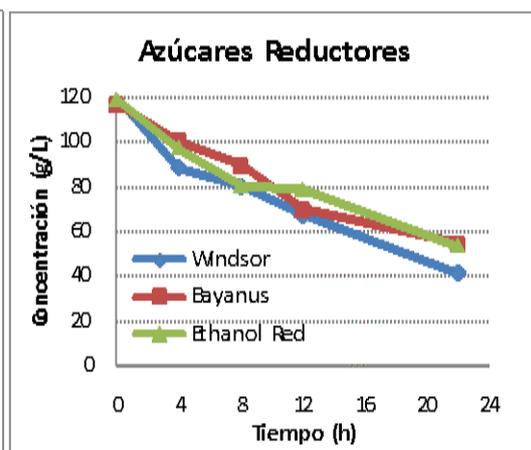


Figura 2. Evolución de los azúcares reductores utilizando licor de maíz al 5%

Luego, se estudió el efecto del autolisado de levaduras como suplemento, sobre el desempeño fermentativo de las levaduras y se compararon estos resultados con los obtenidos para el licor de maíz. Para la fermentación, se usaron seis reactores: un control negativo sin suplemento, un control positivo suplementado con 10 g/L de extracto de levadura, y los demás suplementados con el autolisado previamente caracterizado al 1; 2,5; 5 y 10% v/v. Para todos los casos, se registró la evolución en el tiempo de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores y etanol. Se observó que en el control negativo, si bien no hubo crecimiento notable en biomasa, debido a la falta de una fuente de nitrógeno, los azúcares fueron consumidos casi totalmente y hubo producción de etanol. En cambio, en el control positivo y en los reactores suplementados con el autolisado los azúcares fueron consumidos totalmente a las 24 hs (Figura 3). Posteriormente se utilizó una mezcla de sales (5 g/L fosfato de amonio, 2,5 g/L sulfato de magnesio y 2,5 mg/L sulfato de cinc) como suplemento de las fermentaciones. Se realizaron ensayos utilizando las tres cepas de levaduras. Como se observa en los gráficos siguientes, los azúcares reductores no fueron consumidos

totalmente al cabo de las 24 horas (Figura 4). Sin embargo, la producción de etanol para los tres casos fue de aproximadamente 35-37 g/L.

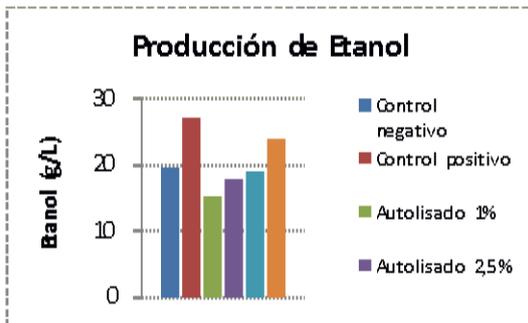


Figura 3. Producción de etanol, utilizando autolisado de levaduras como suplemento.

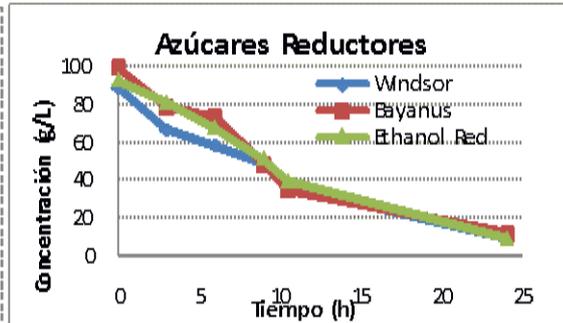


Figura 4. Evolución de los azúcares reductores utilizando mezcla de sales como

En segunda instancia se realizó una comparación de biomasa (cepa Windsor) proliferada sobre distintos medios: medio YPG (compuesto por 30 g/L de glucosa, 3 g/L de extracto de levadura y 2 g/L de peptona de carne); y medio compuesto por mix de gaseosas diluida 1/5 y suplementada con 10 g/L de extracto de levadura. Ambos medios fueron esterilizados en autoclave y luego de la siembra de levaduras, las mismas permanecieron en agitación y a 30 °C durante 36 horas. Para todos los ensayos realizados, la biomasa proliferada sobre mix de gaseosas con extracto de levadura creció entre un 15-30% más que la biomasa proliferada sobre medio YPG. Posteriormente, se estudió el efecto del sulfito de sodio y la aireación sobre la fase Lag de la fermentación. Se realizaron ensayos sobre mix de gaseosas en ocho reactores, utilizando la biomasa proliferada en las condiciones descritas anteriormente. Las características de cada reactor son las que se detallan en la siguiente tabla:

Reactor N°	Biomasa proliferada sobre:	Aireación (durante fase Lag)	Sulfito de Sodio (50 ppm)
1	YPG clásico	SI	SI
2	YPG clásico	SI	NO
3	YPG clásico	NO	SI
4	YPG clásico	NO	NO
5	Mix diluido	SI	SI
6	Mix diluido	SI	NO
7	Mix diluido	NO	SI
8	Mix diluido	NO	NO

Tabla 2. Descripción de las condiciones de reacción

Inicialmente se utilizó la mezcla de sales como suplemento de las fermentaciones para todos los reactores y luego se realizó el mismo ensayo pero utilizando extracto de levadura (10 g/L) como nutriente. Se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 3, 4, 12 y 24 horas para realizar un estudio exhaustivo de la fase lag. Se midió la concentración de biomasa y azúcares reductores para todos los tiempos, etanol para las 12 y las 24 horas y glicerol a tiempo final. Para todas las condiciones estudiadas, se observa un efecto positivo de la aireación sobre el crecimiento de la biomasa, probablemente debido a la restauración del pool de lípidos y/o cofactores, que no afecta a los

rendimientos en etanol. Asimismo, la adición de sulfito de sodio en condiciones anaeróbicas genera un efecto positivo sobre el desempeño fermentativos de las levaduras con rendimientos en etanol de alrededor de un 10% superiores a los controles. Esto, podría deberse al papel detoxificador que juega el sulfito de sodio en la fermentación.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que es posible utilizar un proceso de fermentación alcohólica de los carbohidratos contenidos en ciertos efluentes de la industria de bebidas azucaradas, para producir bioetanol, previo ajuste de pH y agregado de fuentes nitrogenadas ya sean de origen orgánico o inorgánico.

Se demostró la factibilidad técnica de utilizar las siguientes fuentes de nutrientes:

- Autolisado de levaduras (5 - 10%v/v);
- Mezcla de sales inorgánicas de fosfato de amonio (5 g/L), sulfato de magnesio (2,5 g/L) y sulfato de cinc (2,5 mg/L)
- Efluente de la industria de almidón de maíz (5%v/v).

Para todas las condiciones estudiadas, se estableció que una concentración mínima de levaduras en el inóculo de 2 g/L, permite consumir los azúcares en aproximadamente 24 h (la mezcla de sales prolonga el tiempo de fermentación), con producción de etanol de entre 35 a 37 g/L logrando de esta manera una reducción de la DQO de los efluentes líquidos luego de separar el etanol producido por destilación.

BIBLIOGRAFÍA

- Comelli, R.N.; Seluy, L.G.; Isla, M.A. (2016). "Performance of several *Saccharomyces* strains for the alcoholic fermentation of sugar-sweetened high-strength wastewaters: comparative analysis and kinetic modeling". *New Biotechnology* 33:6, 874-882.
- Comelli, R.N.; Seluy, L.G.; Isla, M.A. (2016) "Optimization of a low-cost defined medium for alcoholic fermentation - A case study for potential application in bioethanol production from industrial wastewaters". *New Biotechnology* 33:1, 107-115.
- Comelli, R.N.; Seluy, L.G.; Grossmann, I; Isla, M.A. (2015) "Treatment of high-strength wastewater from the sugar-sweetened beverage industry by an alcoholic fermentation process". *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54:31, 7687-7693.
- Isla, M.A.; Comelli, R.N.; Seluy, L.G. (2013). "Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production". *Bioresource Technology* 136, 140-147.
- Miller, G.L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.* 31, 426-428.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la UNL (Proyecto de I+D "Obtención de productos de valor agregado como estrategia de bajo impacto ambiental para el tratamiento de efluentes de la industria de bebidas gaseosas", programa CAI+D 2011, dirigido por el Dr. Raúl Comelli) y por la Fundación del Nuevo Banco de Santa Fe, a través de una beca para proyectos de Innovación Tecnológica.

Agradecimiento

Se agradece a la Fundación del Nuevo Banco de Santa Fe por su aporte para la realización del proyecto, a la Universidad Nacional del Litoral y al equipo del Departamento de Medio Ambiente de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas de la UNL.