

TRATAMIENTO Y VALORIZACIÓN DE EFLUENTES DE PLANTAS DE PRODUCCIÓN DE SIDRA

Constanza, Berrón

Cientibecaria

Dpto. de Medio Ambiente (FICH-UNL)

Área Temática: Ingeniería

Sub-área: Ambiental

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de sidra comprende la fermentación alcohólica de jugo de manzana, mediado por levaduras naturalmente presentes en la fruta o que se incorporan a través de un inóculo de cepas seleccionadas (Suárez Valles et al., 2007; Peng et al., 2008). Finalmente, el medio fermentado es endulzado a través del agregado de azúcares para obtener el producto final.

Se han identificado algunos efluentes líquidos como potenciales fuentes para la recuperación y/u obtención de productos de valor agregado. En particular se destacan: las mermas de fermentación, fraccionamiento y/o envasado de sidra, el producto que retorna del mercado por falta de gas o por estar próximo a la fecha de vencimiento y el producto descartado durante el proceso de fabricación y/o envasado por no satisfacer políticas de calidad.

Estos efluentes exhiben una elevada carga orgánica dado su contenido de azúcares y etanol, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) que puede alcanzar valores de 180.000 mgO₂/L. Esto hace necesario su tratamiento previo al vertido en un cuerpo receptor mediante procesos (por ejemplo, reactores anaeróbicos de alta carga, digestión anaeróbica, etc.) que conllevan un alto tiempo de residencia, requiriendo equipamientos costosos y de gran volumen.

El contenido de carbohidratos sugiere la posibilidad de utilizar los efluentes como materia prima para la producción de etanol adicional a través de una fermentación alcohólica utilizando levaduras (Barford et al, 2005). En trabajos previos se ha demostrado la factibilidad de producir bioetanol a partir de efluentes de gaseosas (Isla et al, 2013) y la factibilidad técnico-económica de producir bioetanol a partir de efluentes de cervecería (Seluy e Isla, 2014).

OBJETIVOS

Estudiar el efecto de diferentes fuentes de macro y micronutrientes, utilizando para esto un efluente con elevado contenido de compuestos nitrogenados, proveniente de la producción de almidón de maíz. Evaluar la producción de etanol en cada caso y la reducción de la DQO.

METODOLOGÍA

En los ensayos de fermentación se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Var. Windsor (Lallemand Brewing Co., Felixstowe, UK). Esta se mantuvo 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 propagó mensualmente.

Se utilizó sidra comercial para simular los efluentes.

Previo a la fermentación el inóculo se desarrolló con agitación constante durante 12 horas a 30 ± 2 °C en medios de cultivo YPG. 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. Previamente se ajustó el pH de los medios de fermentación y se suplementaron con extracto de levaduras, sales minerales y/o efluente de la producción de almidón de maíz, según el ensayo.

Los ensayos de fermentación alcohólica se realizaron en reactores de 500 mL, con sistemas de trampa de gases y toma de muestra para mantener esterilidad y anaerobiosis, en agitación y a temperatura de $30 \pm 0,1$ °C. Periódicamente se extrajo 1 mL de muestra, la cual se centrifugó a 6500 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se almacenó para las determinaciones de etanol, azúcares reductores, glicerol y DQO y el pellet se utilizó para determinar la concentración de biomasa. Éste último se resuspendió con agua destilada (1 mL), se realizó la dilución correspondiente y se determinó su absorbancia a 600 nm. El resultado se contrastó con una curva de calibrado construida previamente entre absorbancia y sólidos suspendidos volátiles determinados por técnicas estándar (Eaton et al, 2005). La concentración de etanol se midió con un equipo estático basado en un sensor de óxido de estaño (Isla et al, 2013). Al finalizar el ensayo, luego de separar la biomasa por centrifugación, el etanol también se determinó por picnometría. La concentración de azúcares reductores se determinó por el método del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) y la DQO por el método estándar (Eaton et al, 2005). Los compuestos nitrogenados alfa-amino libre (FAN) se determinaron por el método EBC-ninhidrina (Lie, 1973) y la concentración de glicerol se determinó a través de un kit enzimático. Estudios anteriores realizados por el grupo de trabajo, demostraron el efecto adverso de los conservantes presentes en sidra (dióxido de azufre y sorbato de potasio), el cual se minimizó ajustando el pH de la misma a 5 previo a la fermentación, por lo que ese valor de pH fue utilizado para todas las fermentaciones.

El efluente de almidón de maíz se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm y se caracterizó el sobrenadante, determinando la DQO y las concentraciones de azúcares reductores, glicerol, FAN, magnesio y fósforo.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los parámetros más relevantes de la caracterización de diferentes sidras y del efluente de almidón de maíz.

Tabla 1.

Parámetros de Interés						
	Azúcares reductores (g/L)	FAN (mg/L)	DQO (mg O ₂ /L)	Glicerol (g/L)	Magnesio (mg/L)	Fosforo (mg/L)
Sidra 1	94,8	8,4	180000	13,5	101,2	14,1
Sidra 2	90,4	0,0	180000	15,6	59,3	2,0
Efluente	6,7	1190	137456	1,2	222	405

Se estudió el efecto de suplementar la sidra con sales minerales y extracto de levaduras como fuentes de nutrientes en 4 reactores. En el primero las sales se adicionaron a una concentración final de 10 g/L, 5 g/L y 5 mg/L, para (NH₄)₂HPO₄; MgSO₄; y ZnSO₄ respectivamente, mientras que en el segundo se agregaron las sales a la mitad de la concentración del primero. En el tercer reactor, se agregó extracto de levaduras a una concentración de 5 g/L y en el cuarto no se añadió ningún nutriente. En la

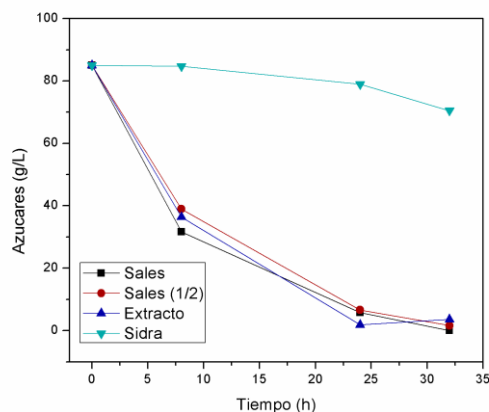


Figura 1. Consumo de azúcares en sidras con y sin nutrientes

figura 1 se muestra el consumo de azúcares para las experiencias realizadas.

En los reactores que fueron suplementados, se verificó un consumo total de los azúcares, en un tiempo de fermentación menor de 48 hs, mientras que, en el reactor que no se agregaron nutrientes no se observó un consumo significativo de los azúcares en ese tiempo. Considerando los resultados obtenidos en la caracterización de las sidras, se observa la importancia de suplementarla con fuentes de nutrientes, entre ellos, compuestos nitrogenados.

Dado su elevado contenido de FAN, se evaluó el efecto de utilizar el sobrenadante del efluente de almidón de maíz (ver Tabla 1) como fuente de nutrientes de la sidra. Se realizaron experiencias suplementando la sidra con 1, 5 y 10 %v/v del sobrenadante del efluente. En la figura 2 se muestra el crecimiento de la biomasa y el consumo de azúcares para las condiciones estudiadas.

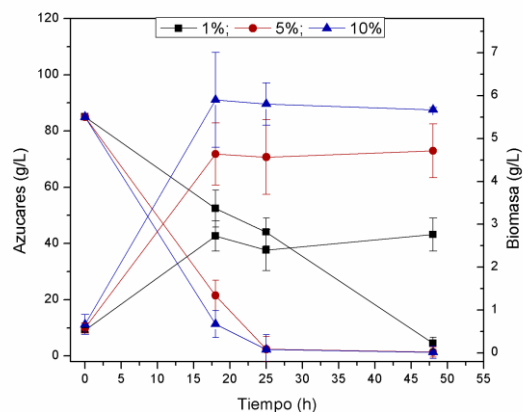


Figura 2. Evolución de biomasa y azúcares en sidras suplementadas con efluente de almidón de maíz

Teniendo en cuenta que cuanto más volumen se suplementa, la concentración de azúcares fermentables y así, la concentración final de etanol, disminuyen, se estudió el efecto de suplementar la sidra con volúmenes menores de sobrenadante: 1,25; 2,5; 3,75 y 5 %v/v. En la figura 3 se muestra el consumo de azúcares y el crecimiento de la biomasa para estas condiciones estudiadas.

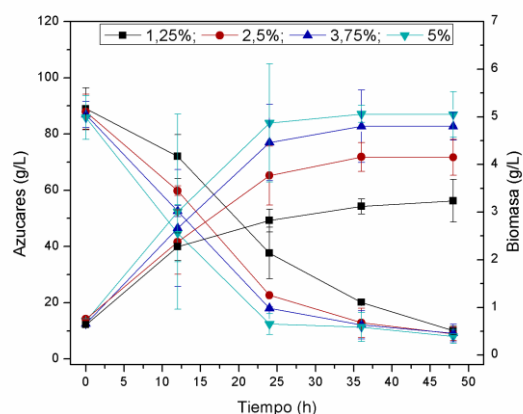


Figura 3. Evolución de biomasa y azúcares para menores concentraciones de efluente usado como suplemento

En todos los casos, los azúcares fueron consumidos totalmente y los rendimientos en etanol similares. Si bien la menor concentración permite lograr una fermentación completa, el tiempo de la misma podría extenderse más allá de las 48 hs. Es por esto que se adoptó la concentración de 2,5%v/v para las fermentaciones siguientes.

En la figura 4, se observa que la DQO del medio, finalizada la fermentación y separado el etanol, disminuyó en un 75-80% para todas las condiciones analizadas.

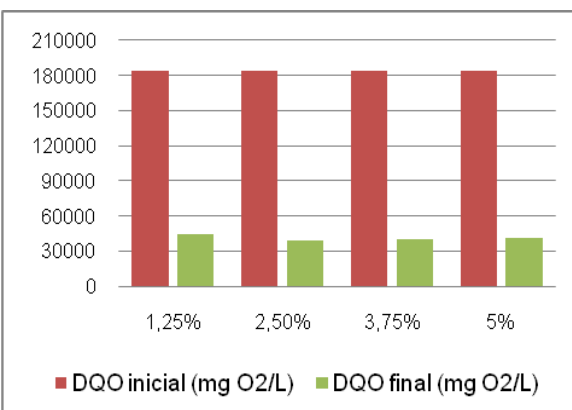


Figura 4. DQO inicial de la sidra y final, luego de fermentar los azúcares y separar el etanol, utilizando efluente como suplemento

Finalmente, a fin de estudiar la factibilidad de reutilizar la biomasa final de una fermentación como inóculo de la siguiente, se llevó a cabo una serie de 5 fermentaciones continuadas (de 48 hs

cada una). De esta forma, la biomasa producida en primera fermentación, se inoculó en la siguiente y así sucesivamente. Las cinco experiencias se inocularon con 0,5 g/L de levadura y se suplementaron con 2,5 %v/v de efluente. Para la primera y la última fermentación se realizó un seguimiento en el tiempo cada 6 hs, mientras que para los repiques intermedios sólo se tomaron muestras iniciales y finales. Como se observa en la figura 5, el consumo de azúcares de la última fermentación es más lento que en la primera. Esto podría deberse a la disminución del pool de ergosterol y otros lípidos, que juegan un papel fundamental en el funcionamiento de la membrana celular de las levaduras, ya que las mismas requieren la presencia de oxígeno para su biosíntesis (Dickinson y Schweizer, 2004).

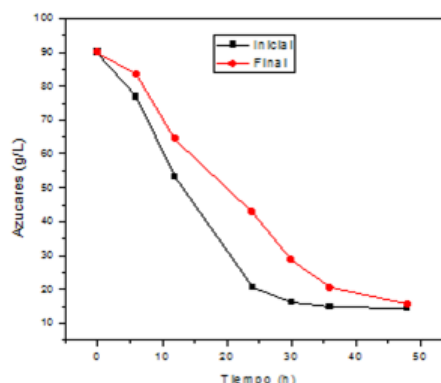


Figura 5. Consumo de azúcares para las fermentaciones inicial y final de una serie, con reutilización de biomasa.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que es posible utilizar un proceso de fermentación alcohólica de los carbohidratos contenidos en de ciertos efluentes de la industria de sidra, para producir bioetanol, previo ajuste de pH y agregado de nutrientes.

La suplementación con 5 g/L de extracto de levaduras, una mezcla de sales inorgánicas de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; MgSO_4 ; y ZnSO_4 , (5 g/L, 2,5 g/L y 2,5 mg/L) respectivamente permiten obtener una fermentación completa de los carbohidratos. Éstos nutrientes pueden reemplazarse exitosamente por un efluente agroindustrial suplementándose el mismo con 2,5 %v/v.

Con un inóculo de 0,5 g/L, los azúcares se consumen en menos de 48 h, con rendimientos en etanol superiores al 85% del valor teórico. Una vez separado el etanol producido, el proceso reduce la DQO de estos efluentes en un 80%.

REFERENCIAS

- Barford J.P., Johnston J.H., Mwesigye P.K.**, 1995. Continuous culture study of transient behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* growing on glucose and fructose. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 158-162.
- Dickinson, J.R., Schweizer, M.**, 2004. *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*, second ed. CRC Press, USA.
- Eaton A.D., Clescerli L.S., Greenberg A.E.**, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. New York: American Public Health Association.
- Isla M.A., Comelli R.N., Seluy L.G.**, 2013. Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 136 140–147.
- Lie S.**, 1973. The ebc-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *J. Inst. Brew.* 79, 37-41.
- Miller, G.L.**, 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Peng B., Yue T., Yuan Y.**, 2008. A fuzzy comprehensive evaluation for selecting yeast for cider Making. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 140–144.
- Seluy L.G, Isla M.A.**, 2014. A process to treat high-strength brewery wastewater via ethanol recovery and vinasse fermentation. *Ind. Eng. Chem. Res.* Article ASAP (As Soon As Publishable) (2014). DOI: 10.1021/ie500438j
- Suárez Valles B., Pando Bedriñana R., Fernández Tascón N., Querol Simón A., Rodríguez Madrera R.**, 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.*, 24(1), 25-31.