

FERMENTACION ACETOBUTILICA DE ALGUNAS VARIETADES DE SORGO (*Sorghum* Spp.) Y DE MOHA (*Setaria Italica*)

FRANCISCO T. POMAR

y

CARLOS A. MEINARDI

Dep. Biotecnología, Fac. Ing. Qca. (UNL)
Santiago del Estero 2829 (3000) Santa Fe
Argentina

RESUMEN

*Se consignan los resultados de ensayos de fermentación acetobutílica obtenidos en planta piloto luego del procesamiento de diversas variedades de sorgo granífero (*Sorghum* sp.) y una de moha (*Setaria italica*), efectuados de acuerdo a los criterios práctico-económicos que rigen a las industrias de este tipo. Los resultados logrados fueron satisfactorios, especialmente para algunas variedades híbridas, en las cuales la conversión del 33 al 36,7 % de almidón a solventes fue rápida, con una muy buena recuperación de las vinazas residuales, ricas en proteínas y lípidos y que dan un producto con aroma y sabor apetitosos.*

La moha mostró su buena aptitud para este procesamiento con una conversión promedio de almidón a solventes de casi el 35 %, dejando, de la recuperación de sus vinazas, un producto de excelentes cualidades.

SUMMARY

On acetobutylic fermentation of some varieties of sorghum (*Sorghum* spp.) and moha (*Setaria italica*).

The data on test of acetobutylic fermentation obtained at a pilot plant are given after processing several varieties of grain sorghum (*Sorghum* spp.) and one of moha (*Setaria italica*).

* Trabajo presentado en la Reunión de Comunicaciones Científicas del 29/X/77.

The work was performed according to the practical-economical criteria that are used in industries of this type, and satisfactory results were obtained, mainly for some hybrid varieties of *Sorghum* in which the conversion of starch to solvents was quick and about 33 to 36,7%, with a very good recuperation of residual vinaces, rich in proteins and lipids, giving up a product of good taste and smell, considering the soluble solids that were obtained.

The moha showed its good capacity with an average conversion from starch to solvents of almost 35%, giving the vinaces a product of excellent qualities.

INTRODUCCION

Habiéndose observado un creciente interés por parte de los productores de sorgo en la instalación de plantas industriales para el procesamiento de dicho grano, se ha estimado conveniente volver sobre un tema del que ya nos ocupáramos anteriormente (Pomar, 1967).

Dadas las crecientes dificultades surgidas últimamente en el abastecimiento de derivados del petróleo, el manejo de un material renovable y de fácil logro natural en nuestro país para producir solventes industriales como etanol, butanol y acetona, puede significar una perspectiva promisoría, que ofrece, paralelamente, la atractiva oportunidad de la obtención de concentrados proteico-lipídicos, de alto valor nutritivo.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima: En todas las series de ensayos (no menos de cinco para cada variedad) se usaron las siguientes variedades de sorgo provistas por la Estación Experimental de INTA de Manfredi (Córdoba): Early Kalo; Granador; Híbrido D.A. 54; Híbrido N. K. 300; Línea R. 978; Mancor; Minu; Pampeano y una variedad de moha provista por la Estación Experimental de INTA de Pergamino (Bs. As.).

Cepas de microorganismos: Para la realización de las fermentaciones se usó una cepa de *Clostridium acetobutlicum* perteneciente al Departamento de Bioingeniería (D4B.B. Nº VI) asociada a otra de *Bacillus subtilis* (D.B.B. Nº V) de acuerdo a experiencias anteriores (Pomar, 1968).

Conservación de los esporos: Se preparó una suspensión de esporos de los microorganismos mencionados la que fue secada al vacío, aditada en mezcla al soporte de tierra, arena y CO₃ Ca (60 : 40 : 1)

previamente esterilizado. Se preparó cantidad suficiente para asegurar la realización de las fermentaciones en condiciones similares a las efectuadas anteriormente (Pomar, 1968).

Germinación de los esporos: De acuerdo a experiencias realizadas en fermentaciones a escala de laboratorio, planta piloto e industrial, el medio más conveniente para hacer germinar los esporos fue el mosto al 6% (peso sobre volumen: p/v) de harina de lentejas, o una mezcla de leguminosas, siempre incluyendo aquéllas.

Para preparar este mosto, se realizó una suspensión de harina de las leguminosas en tubos de ensayo con agua (10-12 ml. c/u), dejando embeber completamente y agitando de vez en cuando.

Luego se precocinó en Bañomaria (b.m.) agitando los tubos frecuentemente por rotación (para evitar que el material se apelmazara en el fondo), calentando gradualmente hasta llegar a la temperatura de ebullición; así se logró la gelificación del material en el volumen total. Obtenido esto, los tubos convenientemente preparados, se esterilizaron en autoclave (30 min. a 120°C).

La realización del choque térmico (para estimular la germinación de los esporos), se efectuó colocando los tubos, preparados de la manera indicada, en un b.m. frío calentando poco a poco hasta ebullición (asegurando la homogeneidad de la temperatura agitando frecuentemente los tubos por rotación). Logrado este punto, se agregó en cada tubo, asepticamente, una porción de tierra estéril conteniendo la mezcla de esporos. Se volvieron de inmediato los tubos al b.m. y se mantuvo en ebullición durante 90-120 seg. Luego de enfriar, se incubaron en estufa a 40 + — 1°C. Al cabo de unas 12 hs. de incubación se observó, en la superficie de los medios, la formación del velo característico del desarrollo del *B. subtilis*, el cual posteriormente se rompió al iniciarse el activo desprendimiento de burbujas de gas, indicador de la germinación y activa multiplicación de los clostridios, lo que sucedió entre las 18 y 24 hs. después del choque térmico.

Preparación del inóculo: Cuando se apreció la franca actividad fermentativa en los tubos "chocados" (por la formación del característico "sombbrero") el contenido se virtió en un erlenmeyer con 200 ml. de mosto de sorgo en concentración de 6-8% (p/v) el cual fue precocido a 50-60°C en b.m. y llevado, luego, a ebullición hasta gelificación, esterilizando finalmente en autoclave a 126-132°C (1,5—2 atm.) durante 30-40 min.

Comprobada nuevamente la actividad fermentativa del cultivo (12-14 hs. luego del trasiego), se los repicó una vez más, de modo de

lograr el volumen del inóculo necesario para la siembra de las fermentaciones (su optimización se investigó anteriormente, Pomar et al., 1964-65).

Preparación de mostos en planta piloto: Salvo la diferencia de la materia prima constituyente del mosto a fermentar, las pruebas fueron realizadas de acuerdo a lo especificado en trabajos anteriores (Pomar, 1967 1968 y Pomar, et al., 1964-65). Para su preparación se adoptó el uso de cantidades prácticas que aseguraran una concentración de almidón de 6% (p/v) o el valor más próximo posible, en función de los dosajes previos efectuados sobre las harinas de cada variedad de sorgo, ya que esta concentración permite fermentaciones rápidas y completas.

Con el objeto de asegurar la perfecta cocción y esterilización del material, se adoptó una temperatura de 130-135°C bajo agitación y durante un tiempo de no menos de 20 min. que pudo reducirse cuando se sustituyó parte del agua por vinazas de recirculación (V.R.) a 12-15 min. manteniendo la temperatura indicada.

En cuanto se refiere al sorgo, los mostos fueron preparados agregando a 23,5 litros de agua, 6 litros de V.R. y la cantidad de sorgo necesaria, según su dosaje, para producir un mosto con una concentración de almidón de 6 + — 0,1%, luego de precocer durante 30 min. a 50-60°C y cocer bajo agitación a 130-135°C durante 15-20 min.

El mosto así preparado, cuya sustancia seca (s.s.) correspondió a valores de 9,20 + — 0,3% con una viscosidad variable entre 270 centipoises (cp) a 40°C y 90 cp. a 70°C, fue inoculado con 2,5% v/v de precultivo preparado en el modo ya detallado, salvo en el caso de la variedad de sorgo Minu, que requirió 5% (v/v), incubando a 41 + — 1°C y neutralizando luego de 5—7 hs. después de la siembra, cuando el pH se halla entre 4,7—4,9 con el agregado del 0.06% (p/v) de CO₂ Ca respecto al mosto. Cuando a esta variedad de sorgo Minu se le sembró agregando precultivo en la proporción prescrita en anteriores trabajos (Pomar, 1967) la fermentación fue nula o deficiente, circunstancia que se superó aumentando la densidad de siembra.

Dado el más bajo tenor de almidón constatado en la moha, se aumentó correspondientemente su cantidad para asegurar el dosaje de almidón en el mosto (6% p/v), realizando un precocido a 50-60°C durante 30-40 min. y cociendo a 130-135°C durante 15-20 min. el grano molido y 30-35 min. el grano entero.

El pH de los mostos de moha osciló entre 5,6—5,2 cuando se prepararon naturalmente, descendiendo 0,1 cuando se recircularon vinazas, cuyo pH fue de 5,05-5,10.

Preparación de las vinazas: Efectuado el desflegado de los mostos fermentados de acuerdo a la tecnología conocida (Pomar, 1967) se obtuvo la vinaza que se adicionó a los mostos, en reemplazo de un 20-25% del volumen de agua que los integra. Estas vinazas se usaron sin tratamiento previo alguno pues no fue indispensable.

De acuerdo con los resultados de análisis efectuados sobre las vinazas de destilería (V.D.) que no se afectaron a la recirculación (V.R.) resultó llamativa la calidad y cantidad de los productos obtenidos. De la vinaza total, se separaron los sólidos en suspensión de la parte fina y líquida, a través de tamiz de 40 a 60 mallas, procediendo a secar el insoluble y concentrando el líquido en evaporador de película descendente agitada con un $V t = 40-50^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de evaporación de 80°C hasta lograr un jarabe de aproximadamente 50% de sólido seco. Este concentrado se llevó a polvo seco en "spray" (Niro) con una temperatura en el aire de salida de $130-150^{\circ}\text{C}$ entrando a $260-280^{\circ}\text{C}$ de tal modo que el sólido nunca se encontrara a más de 80°C .

Temperatura de fermentación: En todas las series de ensayos fue de $41 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con lo que se aseguró fermentaciones rápidas, eficientes y sin mayor formación de productos secundarios.

Neutralización de los mostos: El pH de los mostos luego de 5-7 hs. de ser inoculados, descendió a un valor de 4,7-4,9 habiéndose neutralizado mediante el agregado del 0,06% de CO_3Ca estéril respecto al volumen del mosto, para asegurar un proceso eficiente y rápido.

Análisis químicos: Para las determinaciones de almidón, lípidos, proteínas y humedad en las harinas de sorgo y en las vinazas secadas, se adoptaron las normas aconsejadas en "Official Methods of Analysis" (Horwitz, 1960).

Los pH de los mostos se determinaron con un pH Meter Luftman.

Entre los solventes, la acetona se valoró según el tradicional método de Meissinger, adaptado prácticamente a nuestra necesidad. Para ello se colocó 1 ml de flema destilada y bien homogeneizada en matraz aforado de 200 ml. Esta flema se obtuvo de la destilación de un volumen bien determinado de mosto fermentado (1-1,5 litros) recogida en un matraz aforado de 500 ml, al que se completó el volumen con agua una vez agotada la destilación. Al volumen indicado, colocado en el matraz de 200 ml, se le agregaron 5 ml de solución de MnO_4K al 5% (p/v) y 5 ml de SO_4H_2 al 30% (p/v).

Luego de 45 min y ocasionales agitaciones, se destruyó el exceso de MnO_4K con H_2O_2 de 20 vol. agregada cuidadosamente gota a gota bajo agitación y retornando luego a color apenas rosado con solución de MnO_4K al 0,5% (p/v).

Se precipitó el MnO_2 coloidal por agregado de $NaOH$ en solución al 30% agregado cuidadosamente y con un ligero exceso al final. Se enrasó el matraz con agua destilada, se homogeneizó su contenido y se filtró por papel.

Se tomó una alícuota de 100 ml en cada caso y se agregaron 15-20 ml de solución de I_2 N/10 medidos en bureta. Luego de 10-15 min se acidificó con SO_4H_2 en solución al 30% p/v, titulando el exceso de I_2 con $S_2O_3Na_2$ N/10 usando almidón como indicador.

Los otros solventes, etanol y butanol, se dosaron con el destilador Piazza (Piazza, 1942) adoptando la técnica indicada por Rouzaut (1941).

RESULTADOS

Sorgo: Se constató que la primera fermentación correspondiente a cada variedad de sorgo fue 3-4 hs más lenta que las siguientes, verificándose el efecto positivo de la recirculación de vinazas (V.R.) ya estudiado (Pomar, et al, 1964-65).

En el cuadro N° 1 se consignan los resultados de los análisis de las harinas de las diversas variedades de sorgo (humedad: 10-12%) y de los mostos preparados y fermentados, promedio de cinco ensayos con cada muestra.

Los valores promedios obtenidos del procesamiento de las vinazas, correspondientes a las diversas variedades de sorgo, respecto a la cantidad puesta en juego, oscilaron entre 5 y 11% p/p para la cascarilla residual, en tanto que los sólidos solubles variaron entre 21 y 34% p/p.

Habiendo constatado que el contenido promedio de proteínas varió entre 20 y 22% para la cascarilla secada y entre 39-42% para el sólido soluble secado, no queda duda respecto a la necesidad de profundizar el conocimiento de estos subproductos desde el punto de vista de su posible valor biológico.

Moha: En el cuadro N° 2 se consignan los datos promedios de dos series de cinco fermentaciones realizadas con moha.

Cuadro Nº 1 — Resultados de la fermentación acetubiflica de 8 variedades de sorgo. Referencias: 1 = Early Kalo, 2 = Granador, 3 = Híbrido D.A. 54, 4 = Híbrido N.K. 300, 5 = Línea R 978, 6 = Maucoor, 7 = Minu, 8 = Pampeano.

	VARIETADES DE SORGO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Almidón en la harina p/p %	66,7	73,5	62,0	60,7	67,5	65,8	59,8	66,7
pH del mosto preparado en V.R.	5,6	5,4	5,6	5,3	5,2	5,5	5,2	5,4
Tiempo de Fermentación, hs.	27,0	26,0	25,0	25,0	25,0	25,5	27,0	28,0
pH del mosto fermentado	4,9	5,25	5,2	4,9	4,8	4,9	5,1	4,9
Solventes *	20,7	24,7	22,8	20,8	23,8	22,3	19,6	20,3
Solventes **	31,0	33,7	36,7	34,3	35,2	33,9	33,0	30,5
Etanol ***	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Acetona ***	2,50	2,75	1,95	2,00	2,44	2,40	1,97	2,15
Butanol ***	4,64	5,26	3,74	4,04	4,85	4,44	3,72	4,51

* Rendimiento respecto a la cantidad de grano (p/p %)

** Rendimiento respecto a la cantidad de almidón (p/p %)

*** Relación p/p entre solventes producidos.

Cuadro Nº 2 — Resultados de la fermentación acetobutílica de granos de moha.

Referencias: ver cuadro Nº 1.

	M O H A	
	Grano molido	Grano entero
Almidón en la harina p/p %	57,0	57,0
pH del mosto preparado con VR.	5,5	5,5
Extracto seco del mosto cocido v/p %	10,0	10,0
Tiempo de fermentación, hs.	27,0	28,0
pH del mosto fermentado	5,35	5,25
Solventes *	21,36	21,36
Solventes **	34,74	34,74
Acetona ***	1,0	1,0
Etanol ***	1,98	1,98
Butanol ***	3,76	3,76

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El estudio de los resultados permite apreciar que:

- Las fermentaciones que produjeron los mejores valores de conversión de almidón en solventes, fueron las más rápidas y correspondieron a las variedades: híbrido D.A. 54, línea R.978, híbrido N. K.300, Granador y Mancor.
- La variedad Minu Inta ofreció inconvenientes en su fermentación, debido posiblemente a la existencia, en el grano, de sustancias inhibidoras de la actividad de nuestras cepas, hecho que se superó aumentando los inóculos. Esta variedad produjo la más alta proporción de butanol respecto a la acetona formada.
- Resultó elevado el tenor en almidón del sorgo Granador (7,3% p/p con 11% de humedad); pero según el rendimiento obtenido no parece ser exagerado el valor consignado.
- El contenido proteico (39-42%) de los sólidos solubles obtenidos de la V.D. representa el 28-43% del sorgo procesado.
- Los resultados obtenidos confirman que el sorgo, de cualquier variedad, es una excelente materia prima para la fermentación acetobutílica. Al mismo tiempo es de señalar la conveniencia de recuperar sus vinazas que, por lo común y parcialmente, se usan para la crianza de cerdos, pero que, tratadas convenientemente, producen un polvo rico en proteínas, con agradable aroma y sabor lo que justificaría profundizar el estudio de este material.
- Referente a moha, la intensificación de la cocción del grano entero permitió obtener resultados idénticos a los obtenidos con el sorgo en el rendimiento de solventes. Este hecho nos permite afirmar que la moha es un material de excelente calidad para este tipo de proceso.
- La recuperación de los sólidos solubles de moha, brindó un producto de color algo más claro y de aroma y sabor más agradables que los obtenidos con sorgo.
- Podemos concluir que si bien la moha es empleada principalmente en ganadería, tiene, además, buenas perspectivas en la Bioingeniería.

BIBLIOGRAFIA

- Horwitz, W. (Ed.) 1960. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, 9 Ed. Washington (832 p.).
- Plazza, J. - 1942. Dispositivo de contracorriente entre una fase líquida y una fase gaseosa. *An. Inst. Inv. Cient. y Tecn.; Fac. Ing. Quím.; U.N.L.*, 12-13: 81-89.
- Pomar F. T. - 1967. Sobre la fermentación acetobutilica del sorgo. *Rev. Fac. Ing. Quím.; UN.L.*, 36: 29-40.
- Pomar F. T. - 1978. Influencia del *Bacillus subtilis* sobre la fermentación acetobutilica. *Rev. Fac. Ing. Quím.; U.N.L.*, 37: 39-47.
- Pomar, F. T.; Emiliani, E.; Mascotti, N. J. V. y Pesado, A. F. - 1964/65. Sobre la fermentación acetobutilica de maíz y mijo. *Rev. Fac. Ing. Quím.* 33-34; 57-72.
- Pomar, F. T.; Emiliani, E. y Pesado, A. F. 1964/65. Estudio sobre la fermentación acetobutilica de maíz y mijo. Efecto de la recirculación de la vinaza. *Rev. Fac. Ing. Quím.*, 33-34: 72-85.
- Rouzaut, R. 1940-1941. Aplicaciones de laboratorio con el destilador Plazza. *An. Inst. Inv. Cient. y Tecn.; Fac. Ing. Quím. U.N.L.*, 10-11: 115-119.