



'CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACION E INNOVACIÓN 2014"

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jugo de naranja con *Saccharomyces cerevisiae*.

Mendoza Hinojosa Carmina Ivette, Angulo Gallegos Omar, Lepe Cervantes Daniela, Lizárraga Rendón Raúl, Peinado Sandoval Anais, Rosas Mendivil Rubén.

Introducción. Una fermentación es un proceso de transformación química de las sustancias orgánicas, llevado a cabo por las enzimas producidas por los microorganismos y que, generalmente, va acompañado de un desprendimiento de gases y de un efecto calórico. Las enzimas o fermentos segregados por los microorganismos son poderosos catalizadores de naturaleza proteica que, sin embargo pueden actuar de forma independiente de la o de los respectivos microorganismos que los generan (Vincent y cols. 2006).

Un tipo de fermentación es la fermentación alcohólica, que es una reacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima. A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. (Vazquez, 2007).

En nuestra región es conocida la importancia de la producción de los cítricos, sin embargo existen razones económicas y de mercado que indican la necesidad de estudiar nuevas alternativas para su industrialización, que se ofrezcan productos novedosos al mercado. Una posibilidad es la transformación del jugo de naranja en una bebida alcohólica fermentada "Vino de Naranja" (Tejeda y cols., 2010). La calidad de los vinos elaborados de frutas cítricas, en general se caracteriza por el jugo, la levadura utilizada para su fermentación y su proceso de elaboración.

Objetivos. El objetivo del presente trabajo es producir etanol por medio de la fermentación alcohólica de jugo de naranja, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de comprobar que este sustrato es una alternativa viable de producción.

Materiales y métodos. Para la activación de la levadura se tomó aproximadamente 7 gramos de ésta y fue activada en 100 ml de agua destilada a 32°C en agitación por 5 minutos. Para la preparación del preinóculo se seleccionó jugo de naranja sin pulpa para llevar a cabo la fermentación. Se tomó 50 ml de jugo y se vació en un matraz de 250 ml, posteriormente a su esterilización, ya en temperatura adecuada se le adiciono 10 ml de la levadura previamente activada. Se incubó por 12 horas a 32°C y se tomó una muestra para realizar conteo celular. Posteriormente se llevó a cabo la inoculación para la cual se esterilizó en matraces de 500 ml, 200 ml de jugo y se inoculó con 10 ml del preinóculo previamente establecida su concentración celular en 5.03×10^7 mediante conteo celular en cámara



"CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACION E INNOVACIÓN 2014"

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Neubauer, realizando primeramente una dilución de 1:10. Se tomó muestra en tiempo cero y se dejó incubar por 4 días a 32°C, realizando muestreos el primer día cada 4 horas, el segundo día cada 8 horas, el tercer día cada 12 horas y el cuarto día cada 24 horas.

Para la determinación de biomasa se utilizó el método peso seco, el cual consistió en tomar 5 ml del jugo en fermentación, se le realizó centrifugado a 5000 rpm por 10 min y se tomó el sobrenadante para posteriores análisis. Se le agregó 5 ml de agua destilada al sedimento, para un primer lavado, se centrifugo en las mismas condiciones y se repitió el proceso una segunda vez, después de desechar el sobrenadante se agregó 2 ml de agua destilada, se agitó para homogenizar la mezcla y se vació en un pequeño vaso previamente pesado y etiquetado. Se colocó la muestra a secar en horno a 50 °C durante 24 horas. Una vez terminada de secar, se pesó de nuevo para determinar el peso seco de biomasa. Para cada muestra se realizó el mismo procedimiento.

Para la determinación de azúcares reductores se utilizó el método DNS, el cual se basa en que los azúcares reductores reaccionan con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, reduciéndolo bajo ciertas condiciones y generando un color rojizo-amarronado (Toma y cols., 1987). La reducción de azucares fue estudiada por medio de la técnica de DNS y calculada a partir de la curva de calibración (figura 1) previamente realizada con diferentes concentraciones de glucosa y

absorbancia medida a una longitud de onda de 540 nm. La lectura de las muestras se realizó simultáneamente en microplaca al finalizar el proceso fermentativo, tomando 100 µL del sobrenadante centrifugado.

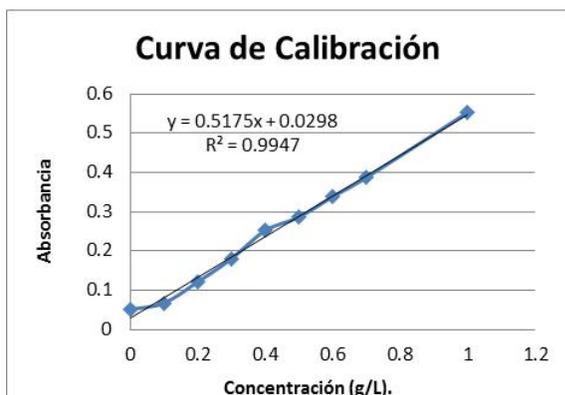
Figura 1. Curva de calibración.

Técnica de DNS para azúcares reductores. Se colocó 100 µl de muestra en un tubo eppendorf y se le adicionó 100 µl de DNS; posteriormente se calentó por 5 minutos a 100°C en baño maría y se dejó enfriar en agua fría por otros 5 minutos. Se le agregó 1 ml de agua destilada y se agitó en vórtex, de la mezcla se tomó 100 µL y se colocó en microplaca para llevar a cabo la lectura de absorbancia a 540 nm.

Para la determinación de producción de alcohol se utilizó un sensor para medir la concentración final al 4to día de la fermentación.

Resultados y Discusiones.

Los azúcares reductores presentaron comportamiento descendente conforme se llevó a cabo el proceso fermentativo tal y como se muestra en la figura 2. La reducción de la concentración de azúcares representó más del 50% a las 60 horas de iniciada la fermentación, para después continuar disminuyendo lentamente y mantenerse en una concentración de 0.050 g/L. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Hoyos y cols. (2010) donde se consumió más del 50% del azúcar contenido en las primeras 36 horas de proceso, en cuyo estudio la concentración de azúcares inicial empleada fue mucho mayor (20g/100ml) que el contenido inicial de azúcares en el presente estudio (0.32g/L) lo cual podría explicar la diferencia en la rapidez del consumo del sustrato.

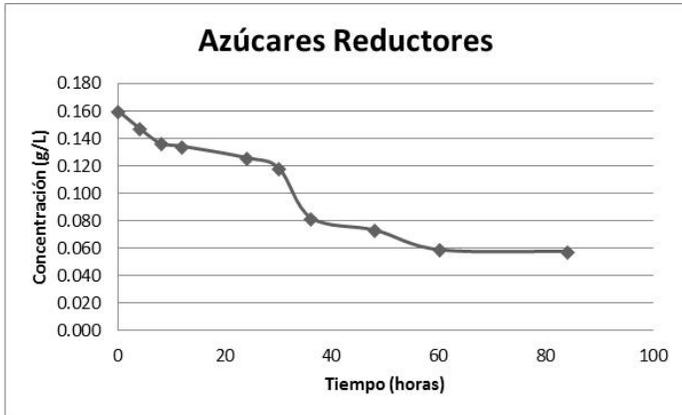




"CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACION E INNOVACIÓN 2014"
 Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635

Producción de Etanol. El comportamiento de la producción de etanol fue inversamente proporcional al consumo de azúcar, mostrando un aumento evidente a las 60

Producción de Biomasa. La formación de biomasa aumentó conforme a transcurría el tiempo, observándose un sedimento lo que genera una aglutinamiento celular en el fondo del matraz. Al igual que en los estudios de *Ferreira, y cols. (2009)* y *Hoyos y cols. (2010)* la biomasa fue en aumento en las primeras 36 horas del proceso y a partir de las 48 horas se hace evidente una reducción en cuanto a la formación de biomasa, lo cual es resultado de las afectaciones causadas por los cambios de pH, la producción de diversos metabolitos, la reducción de azúcares y el aumento en la concentración de alcohol. La figura 4 representa la formación de biomasa en el proceso de fermentación.



horas del proceso. Se obtuvo una concentración mayor a 15 g/L al finalizar la fermentación, resultado similar al reportado por *Tejeda y cols. (2010)* en un estudio donde se comparó la capacidad de producción de etanol a partir de cáscaras de naranja y piña, mostrando que la producción de etanol a partir de naranja representa una mejor alternativa por mayor obtención de etanol con respecto a la piña. En la figura 3 se puede apreciar la producción de etanol a partir de la fermentación de jugo de naranja.

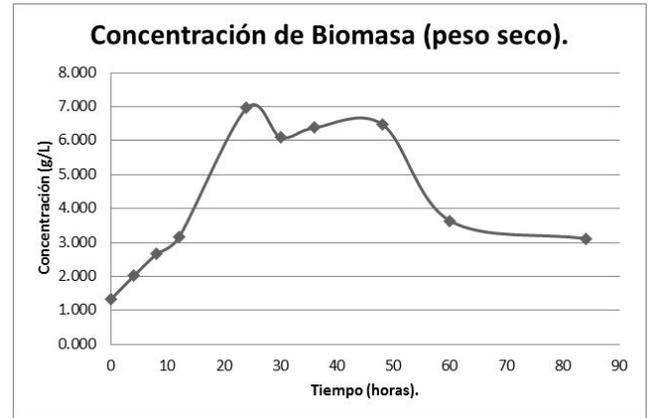


Figura 2. Grafica de azúcares reductores.

Figura 4. Producción de Biomasa.

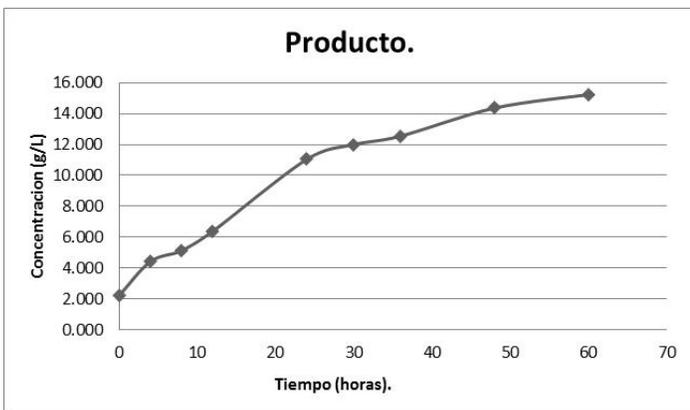


Figura 3. Producción de etanol.

Los rendimientos obtenidos de biomasa/sustrato y de producto/sustrato (tabla 1) muestran que el proceso de fermentación a partir de jugo de naranja es muy eficiente para la producción de etanol, debido a que el rendimiento con respecto a producto sustrato es del 98.610%; en la tabla 2 se muestran las velocidades específicas tanto de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto.

$Y_{x/s}$ (%)	$Y_{p/s}$ (%)
17.380	98.610



'CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACION E INNOVACIÓN 2014'

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Tabla 1. Rendimientos.

Tiempo (horas)	Velocidad específica (h ⁻¹)
12	$\mu=0.317$
12	$qp=0.388$
30	$qs=0.012$

Tabla 2. Velocidades específicas.

Conclusiones. El jugo de naranja resulta un eficiente medio para la obtención de etanol, representando una alternativa eficiente y sustentable debido a que presenta un alto rendimiento de producto/sustrato. Se pueden reutilizar desechos de naranja como sustrato para llevar a cabo una fermentación alcohólica y de ésta manera obtener etanol y al mismo tiempo contribuir al aprovechamiento de residuos agroindustriales. Con el presente estudio se demuestra que el jugo de naranja es una alternativa viable para la obtención de etanol empleando *Saccharomyces cerevisiae*.

Bibliografía.

- Ferreyra, M., M.C. Schwab, L. Gerard, L.M. Zapata, C.V. Davies, R.A. Hours, Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae*, Ciencia, docencia y tecnología: 39, 143-158 (2009).
- Lesly P. Tejada, Candelaria Tejada, Ángel Villabona, Mario R. Alvear, Carlos R. Castillo, Daniela L. Henao, Wilfredo Marimón, Natali Madariaga, Arnulfo Tarón. Determinación de parámetros fermentativos para la formulación y obtención de vino de naranja (*Citrus sinensis*). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 8, No. 1, 2010.

- Lesly P. Tejada, Candelaria Tejada, Ángel Villabona, Mario R. Alvear, Carlos R. Castillo, Daniela L. Henao, Wilfredo Marimón, Natali Madariaga, Arnulfo Tarón. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. Universidad de Cartajena, Cartajena de Indias (Colombia). Revista Educación en Ingeniería. No. 10. Pp. 120 – 125. ISSN 1900-8260. 2010.
- Toma, R.B.; Leung, H.K. Food Chemistry vol. 23 issue 1 1987. Determination of reducing sugars in French fried potatoes by 3,5-dinitrosalicylic acid.
- Vázquez H. J., Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas (2007).
- Vincent María C, Álvarez Silvia, Zaragoza José L. Química industrial orgánica (2006) págs. 60-70.