

**ESTUDIO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLUCOSA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LEVADURAS NATIVAS.**

MAGALY GALVIS JACOME

**BUCARAMANGA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
GRUPO DE INVESTIGACION EN BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA
QUÍMICA
2009**

**ESTUDIO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLUCOSA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LEVADURAS NATIVAS.**

MAGALY GALVIS JACOME

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Química.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE GRADO
DANIEL RICARDO MOLINA VELASCO, PhD
Escuela de Química

CODIRECTOR DEL PROYECTO
CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LOPEZ, PhD
Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

**BUCARAMANGA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
GRUPO DE INVESTIGACION EN BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA
QUÍMICA
2009**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO	4
1.1. Biocombustibles, fuente alternativa de energía	4
1.2. Proceso de fermentación para la obtención de bioetanol	5
1.3. Sustratos naturales para la obtención de bioetanol	6
1.4. Almidón como sustrato para la producción de bioetanol	7
1.5. Nutrientes y condiciones ambientales necesarias para el crecimiento y metabolismo microbiano	10
1.5.1. Principales nutrientes requeridos para los microorganismos	10
1.5.2. Crecimiento microbiano	11
1.5.3. Efectos de las condiciones ambientales	14
1.5.4. Microorganismos en la producción de etanol	16
1.6. Ruta metabólica para la producción de bioetanol	17
1.7. Condiciones adversas para los microorganismos durante la producción de etanol	21
1.8. Etanol y su importancia en la nueva industria	22
2. METODOLOGÍA	24
2.1. Materiales	24
2.1.1. Medios de cultivo	24
2.1.2. Preparación del hidrolizado del almidón de yuca	24
2.2. Metodología experimental	25
2.2.1. Aislamiento de microorganismos nativos	25
2.2.2. Selección del microorganismo	26
2.2.3. Estudio preliminar de producción de etanol en medio de cultivo modificado	27

2.2.4. Estudio del efecto de las condiciones del medio de cultivo en la producción de bioetanol	28
2.2.5. Estudio preliminar de producción de etanol, utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado	29
2.2.6. Parámetros cinéticos	30
2.3. Métodos analíticos	30
2.3.1. Identificación de levaduras	30
2.3.1.1. Tinción de Gram	30
2.3.1.2. Prueba API 20 AUX	31
2.3.2. Determinación de la concentración de glucosa	31
2.3.3. Determinación de la concentración de biomasa	32
2.3.4. Determinación de la concentración de etanol	32
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	34
3.1. Características macro y microscópicas de las levaduras presuntivas productoras de etanol	34
3.2. Selección del microorganismo mayor productor de bioetanol	35
3.3. Identificación de la levadura nativa seleccionada	42
3.4. Cinética de crecimiento y producción de etanol utilizando la cepa seleccionada	43
3.5. Comportamiento del pH durante la fermentación alcohólica	47
3.6. Estudio del efecto de las condiciones del medio de cultivo en la producción de bioetanol	48
3.6.1. Diseño estadístico de experimentos	48
3.6.2. Estadístico P	50
3.6.3. Gráfico de Pareto	51
3.6.4. Gráfico de efectos principales	51
3.6.5. Contorno de superficie de respuesta	54
3.6.6. Factores que pueden maximizar la productividad de etanol	54

3.7. Estudio del proceso de fermentación utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado	57
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la amilopectina	9
Figura 2	Estructura de la amilosa	9
Figura 3	Curva de crecimiento típica de una población bacteriana	13
Figura 4	Ruta metabólica para la fermentación utilizando <i>S.cerevisiae</i>	20
Figura 5	Metodología de selección	26
Figura 6	Producción de etanol para cada una de las levaduras presuntivas productoras de etanol en el medio YPG	40
Figura 7	Características macroscópicas y microscópicas de la colonia de la levadura aislada del zumo de caña	43
Figura 8	Cinética de fermentación. Medio YPG utilizando la levadura nativa seleccionada como mayor productora de etanol	45
Figura 9	Cinética de fermentación. Medio YG utilizando la levadura nativa seleccionada como mayor productora de etanol	45
Figura 10	Comportamiento del pH en el medio de fermentación YG	47
Figura 11	Diagrama de pareto para los efectos estimados significativos en la productividad de etanol	52

Figura 12 Gráfico de los principales efectos en al productividad de etanol	52
Figura 13 Contornos de superficie de respuesta de las diferentes variables en la productividad de etanol	55
Figura 14 Producción de etanol utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Niveles de las variables en el proceso de fermentación	28
Tabla 2	Características de las colonias aisladas a partir de diferentes sustratos	34
Tabla 3	Velocidad específica de crecimiento de las levaduras aisladas a partir de diferentes sustratos	36
Tabla 4	Tiempo de duplicación de las levaduras aisladas a partir de diferentes sustratos	37
Tabla 5	Parámetros cinéticos de producción de etanol utilizando levaduras nativas de diferentes sustratos	41
Tabla 6	Parámetros cinéticos de producción de etanol obtenidos en estudio preliminar de medios de cultivo	44
Tabla 7	Diseño experimental 3^3 obtenido mediante el programa STATGRAPHIS Plus 5	49
Tabla 8	Relación entre las variables que afectan la productividad de etanol y el estadístico P	50
Tabla 9.	Niveles óptimos de las variables glucosa, pH y agitación para la productividad de etanol	55

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Curva de calibración de biomasa	64
ANEXO B	Determinación de la productividad volumétrica de etanol	65
ANEXO C	Curva de calibración de glucosa	66

RESUMEN

TÍTULO *: ESTUDIO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GLUCOSA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LEVADURAS NATIVAS.

Galvis Jácome Magaly **

Palabras Claves: Bioetanol, levaduras nativas, Productividad de etanol.

Se estudió el proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioetanol utilizando levaduras nativas en un sistema por lote a escala de laboratorio. Las levaduras fueron aisladas a partir del bagazo de fique y de bebidas típicas fermentadas de caña, manzana y guarapo de panela. Se realizó la selección del mejor microorganismo productor con base en el parámetro de productividad volumétrica de etanol (Q_p). La concentración de etanol fue cuantificada mediante la técnica de Headspace-Cromatografía de gases.

La cepa seleccionada como la mayor productora de etanol alcanzó una productividad volumétrica de 2,064 g/l*h en un medio de cultivo YPG. Se realizó un ensayo preliminar utilizando un medio modificado (YG). En este caso, se alcanzó una productividad volumétrica de etanol de 3,587 g/l*h.

El proceso de fermentación fue estudiado utilizando la cepa seleccionada como mayor productora de etanol bajo las condiciones del medio modificado. En esta etapa se determinaron las variables que influyen en la producción de bioetanol utilizando el diseño experimental 3^3 cuyas variables fueron la concentración de glucosa, el pH y la agitación. Se observó que en las condiciones de trabajo, las variables en estudio ejercen un marcado e importante efecto en el proceso de producción de etanol.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Daniel Ricardo Molina
Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Lab, clínico. Codirectora: Claudia Cristina Ortiz

SUMMARY

TITLE *: GLUCOSE FERMENTATION PROCESS FOR BIOETHANOL PRODUCTION FROM NATIVE YEAST STUDY.

Galvis Jácome Magaly **

Key words: Bioethanol, ethanol productivity, native yeasts.

Glucose fermentation for bioethanol production was studied at laboratory scale using native yeasts in a batch mode system. The yeasts were isolated from fique bagasse and typical fermented beverages of sugarcane, apple and concentrated molasses. The strain selection was based on the volumetric productivity of ethanol parameter (Qp). Ethanol concentration was quantified by Head-space Gas chromatography.

The best selected strain yielded an ethanol productivity of 2.064 (g/l*h) in a YPG culture medium. A preliminary experiment using a modified culture medium (YG) was carried out. In this case, a volumetric productivity of 3.587 (g/l*h) was obtained.

In this investigation the fermentation process using the selected strain as the biggest ethanol producer under modified culture medium conditions was studied. In this stage were determined the main that influence the ethanol production, by a factorial experiment design 3³ monitoring the variables: concentration of glucose, pH and agitation. It was determined that the variables exercise a marked and important effect in the ethanol production process under the experimental conditions.

*Project of degree.

** Science Faculty. School of chemistry. Director: Daniel Ricardo Molina V.
Health Faculty. School of bacteriology and clinical laboratory. Codirector: Claudia Cristina Ortiz.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del desarrollo industrial y del crecimiento de la población, existe un continuo incremento en el consumo de energía alrededor del mundo. Las fuentes convencionales de energía como los combustibles fósiles no compensan en su totalidad tal demanda energética (Demirbas, 2006).

Las reservas naturales de este tipo de combustible son limitadas, su agotamiento se está produciendo mucho más rápido de lo previsto y además, el excesivo consumo del petróleo y sus derivados especialmente en el sector del transporte están causando deterioro y contaminación en el medio ambiente (Bai et al., 2007).

El uso de los biocombustibles como alternativa de fuentes energéticas presenta muchas ventajas: contribuye a la reducción de emisiones de CO₂ al ambiente, reduce la dependencia a la importación de aceites y permite oportunidades de desarrollo a nivel rural (Nikolic et al., 2009).

La producción de biocombustibles requiere como materia prima biomasa, principalmente de origen agrícola como: la caña de azúcar, melazas de azúcar de caña o remolacha, granos como el maíz, trigo y almidones (Fukuda, 2008). Esta biomasa es inicialmente sometida a procesos de hidrólisis (ácida ó enzimática) en donde se libera glucosa y otros carbohidratos que representan los principales sustratos para el proceso de fermentación de los cuales finalmente se obtiene etanol.

La producción de bioetanol por fermentación ha dado lugar a un incremento en el interés de encontrar biorrecursos alternativos y fuentes amiláceas que sirvan como materias primas para la producción del mismo. Por este motivo se han empleado productos como el maíz (en USA), la caña de azúcar (en Brasil) y otras materias primas ricas en carbohidratos fermentables o que pueden llevarse a productos que pueden ser convertidos en azúcares fermentables (Voca et al., 2009).

El uso del bioetanol en los combustibles fue visto en un principio como un sustituto parcial de la gasolina, como un mejorador de octanaje y como un agente oxigenante, siendo así uno de los más prometedores a partir de fuentes renovables (Mejías, 1990).

El amplio uso del etanol como combustible ha llevado a muchos países a elaborar programas de investigación destinados a mejorar y optimizar la fermentación alcohólica.

Algunas investigaciones han desarrollado diferentes modelos matemáticos que estudian el proceso de fermentación y el efecto de variables semejantes a las condiciones ambientales en que se realiza la fermentación, la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes o fuentes de carbono y su importancia en el proceso de bioconversión hasta etanol (Blanco et al., 2006).

Otros estudios han dado lugar al concepto de inmovilización de células como nueva estrategia de fermentación. Amutha y colaboradores desarrollaron un estudio de producción de etanol a partir de almidón licuado usando células co-inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces diastaticus*

obteniendo una mayor concentración de etanol en comparación a la producción mediante el uso de células libres (Amutha et al., 2001).

El objetivo de la presente investigación fue encontrar una levadura nativa productora de etanol a partir de glucosa y determinar las mejores condiciones de fermentación para obtener la mayor productividad. Esta levadura nativa fue aislada del zumo de caña.

1. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO

1.1. Biocombustibles, fuente alternativa de energía

El consumo de energía mundial ha aumentado en promedio 17 veces en el último siglo lo mismo que las emisiones de CO₂, SO₂ y NO_x, productos de la quema de combustibles fósiles y principales causantes de la contaminación atmosférica. Por su parte, las reservas conocidas de petróleo se estima que se agotarán en menos de 50 años con la tasa actual de consumo.

En los países desarrollados hay una tendencia cada vez mayor hacia el empleo de las tecnologías modernas y eficientes que abrirán la posibilidad al uso de una gama de biocarburantes. Estas nuevas tecnologías emplean productos naturales o biorrecursos como materias primas para la posterior producción de biocombustibles (Demirbas, 2006).

El término biocombustibles es usado para aquellos líquidos o gases empleados en el sector del transporte y que son predominantemente producidos por fermentación de biomasa. Se considera en general que los biocombustibles ofrecen muchas ventajas, tales como la sostenibilidad, la reducción en el efecto invernadero y el desarrollo regional, en lo que respecta a la estructura social y la agricultura.

El sector agropecuario tiene un gran potencial como proveedor de materia prima para la generación de energía. El etanol producido a partir de cultivos agrícolas, "bioetanol" es de gran interés a causa de la naturaleza renovable de sus materias primas. Los cultivos más usados en la producción de bioetanol son: la caña de azúcar y la remolacha azucarera. Sin embargo, se

puede producir etanol a partir de una gran variedad de sustratos azucarados o amiláceos, principalmente granos de cereales (Fernández y Garro, 2004).

Los procesos empleados en la fabricación de biocombustibles, dependen de la naturaleza de la materia prima, por ejemplo aquellas materias primas ricas en almidones requieren inicialmente de un tratamiento de hidrólisis ácida o enzimática que permita la liberación de glucosa para producir finalmente alcohol (Castro y Pérez 1979).

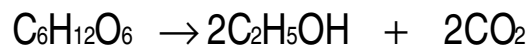
1.2. Proceso de fermentación para la obtención de bioetanol

La fermentación se define como el conjunto de reacciones químicas que sufre una sustancia orgánica de origen vegetal como los carbohidratos o sus derivados por medio de ciertos microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) y que generalmente van acompañadas de un desprendimiento gaseoso y producción de energía. En 1810 Gay-Lussac, señaló que para la fermentación alcohólica, es necesaria la presencia de una sustancia azucarada y un fermento particular de naturaleza animal (bacterias, mohos o levaduras (Hochfeld, 2006).

En las tecnologías de fermentación las materias primas proceden principalmente de las plantas que contienen carbohidratos y se utiliza la actividad metabólica y enzimática de microorganismos para transformar compuestos orgánicos en diferentes productos de interés. La fermentación implica la degradación del sustrato inicial conduciendo a la formación de productos finales metabólicos específicos, como etanol, ácido láctico y glicerol. Hay muchos tipos de fermentación que difieren en los productos finales. Dos tipos comunes son la fermentación alcohólica y la fermentación

láctica en las que se obtiene etanol y lactato respectivamente (Campbell, 2007).

Durante la fermentación alcohólica la glucosa es transformada en alcohol etílico y dióxido de carbono a través de reacciones de óxido- reducción (*reacción 1*).



Reacción 1. Fermentación de glucosa y producción de alcohol.

1.3. Sustratos naturales para la producción de bioetanol

En un sentido amplio se denomina biomasa a toda la materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los materiales procedentes de su transformación natural o artificial. Puede ser clasificada en: biomasa natural, producida en la naturaleza sin la intervención humana, biomasa primaria, cultivada con el propósito de obtener biomasa transformada en combustible, en lugar de alimentos, biomasa secundaria o residual generada por cualquier actividad humana en procesos agrícolas, ganaderos y residuos sólidos urbanos.

La utilización de biomasa con fines energéticos requiere de tratamientos adecuados para utilizarla en los sistemas convencionales como combustibles sólidos (leña, carbón vegetal), líquidos (biocarburantes, aceites, cetonas) o gaseosos (biogás, hidrógeno). El poder calorífico de la biomasa depende de su procedencia y humedad, este puede oscilar entre 3000 y 3500 Kcal/Kg para residuos lignocelulósicos, entre 2000 y 2500 Kcal/kg para residuos urbanos y alrededor de 10000 Kcal/kg para los combustibles líquidos provenientes de cultivos energéticos. Estas características, junto con el bajo

contenido de azufre de la biomasa, la convierten en un producto especialmente atractivo para ser aprovechado energéticamente (Laborde et al., 2006).

Desde el punto de vista ambiental, el aprovechamiento energético de la biomasa contribuye a la disminución de los gases de invernadero dado que el balance de emisiones de CO₂ a la atmósfera es neutro. En efecto, el CO₂ generado en la combustión de biomasa es reciclado mediante la fotosíntesis en el crecimiento de las plantas necesarias para su producción y por lo tanto, no se incrementa la cantidad de CO₂ en la atmósfera (Laborde et al., 2006).

1.4. Almidón como sustrato para la producción de bioetanol

En la mayoría de los organismos los carbohidratos son los sustratos principales que por degradación generan la energía y el carbono requerido para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros carbohidratos. Más de la mitad del carbono orgánico del planeta se encuentra almacenado en grandes moléculas de carbohidratos: los que tienen un papel estructural, tal como la celulosa en las plantas y los que tienen un papel de almacenamiento energético de carbono, tal como el almidón en las plantas y el glicógeno en los animales y las bacterias.

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa que están unidas por enlaces glucosídicos, formando polímeros de alto peso molecular, la amilosa (Figura 1) (15-25%) un polímero lineal de enlaces α 1,4 y la amilopectina de enlaces α 1,4 y α 1,6 (Figura 2). El almidón es la principal fuente de jarabes de glucosa (Satyaranayana, 2004).

Los almidones se encuentran exclusivamente en las plantas, en el interior de las células vegetales como gránulos en el citoplasma y también en los

plastidios incluyendo el cloroplasto. La función biológica de los almidones es la reserva de alimentos en la planta. Cuando se necesita carbono y energía, los almidones se liberan de los gránulos y son degradados por enzimas.

Como los almidones son moléculas de reserva debe haber un mecanismo para liberar glucosa del almidón cuando el organismo necesita energía. Tanto las plantas como los animales contienen enzimas que hidrolizan los almidones, dos de ellas llamadas α y β amilasas. La β -amilasa es una exoglucosidasa y permite sucesivas eliminaciones de solo unidades de maltosa empezando desde el extremo no reductor del polímero. La α -amilasa es una endoglucosidasa que puede hidrolizar un enlace glucosídico en cualquier sitio de la cadena para producir glucosa y maltosa (Bohinski, 1987).

La amilosa puede ser degradada en su totalidad a glucosa y maltosa por ambas amilasas, pero la amilopectina no se degrada en su totalidad, porque los enlaces ramificados (α 1,6) no son atacados. Sin embargo, en plantas y animales existen enzimas desramificadoras que degradan los enlaces α 1,6. Cuando estas enzimas se combinan con las amilasas, contribuyen a la degradación total de ambas formas de almidón (Ipsita Roy, 2003).

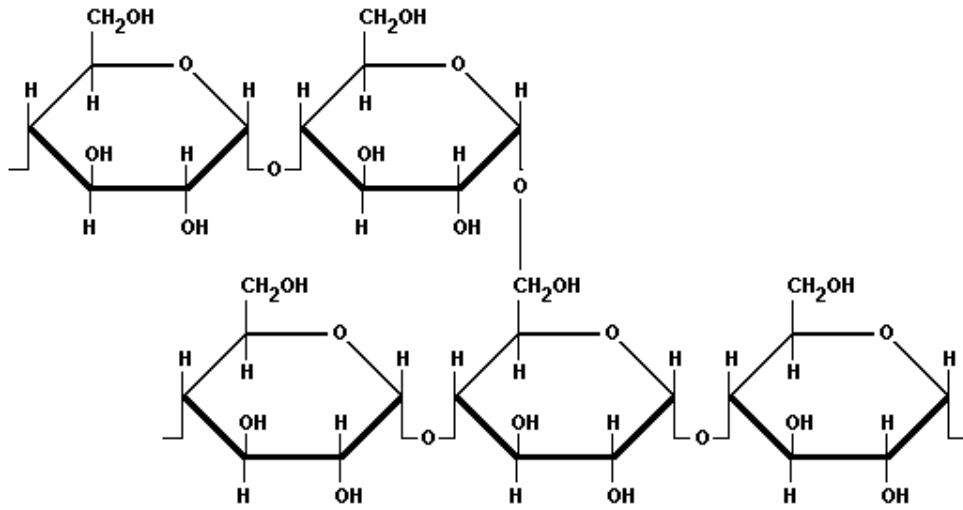


Figura 1. Estructura de la amilopectina.

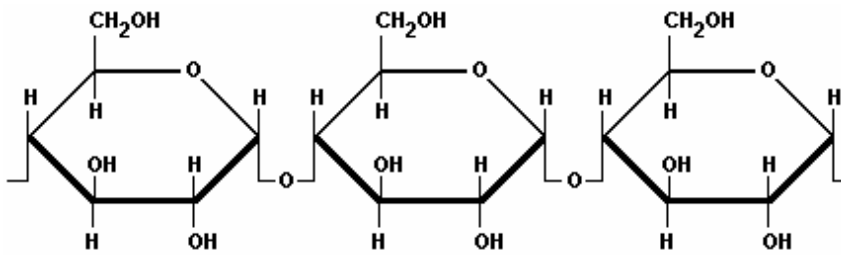


Figura 2. Estructura de la amilosa.

Entre las materias primas ricas en almidones, que después del proceso de hidrolizado dan lugar a azúcares fermentables, se encuentran fuentes amiláceas como el trigo, el maíz, la papa, la yuca; éstos son algunos de los productos que pueden usarse como materias primas para el proceso de fermentación.

Para aprovechar las ventajas de estas fuentes de energía renovables en la producción de bioetanol, es importante obtener de ellos la mayor cantidad de azúcares fermentables, esto significa que se debe hidrolizar el almidón (hidrólisis ácida o enzimática) hasta glucosa, principal sustrato en el proceso de fermentación y producción de etanol (Cara et al., 2007).

1.5. Nutrientes y condiciones ambientales necesarias para el crecimiento y metabolismo microbiano

El uso de microorganismos en la producción de etanol es un proceso ancestral. La mayor parte de los zumos de fruta sufren una fermentación natural ocasionada por las levaduras silvestres presentes en las frutas, es así como muchos microorganismos poseen una importante labor en industrias como la cervecera. En general, los microorganismos presentan unos requerimientos específicos de nutrientes y condiciones ambientales para su crecimiento y desarrollo.

1.5.1. Principales nutrientes requeridos por los microorganismos

Las células se caracterizan por tener la capacidad de llevar a cabo reacciones químicas y organizar sus moléculas para formar estructuras específicas. En las células deben ocurrir varios tipos de reacciones anabólicas y catabólicas para su duplicación o crecimiento, para ello se

requiere de una nutrición microbiana específica. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos tanto para macronutrientes, aquellos de los que se precisan grandes cantidades, como para micronutrientes de los que se requieren pequeñas cantidades o en ocasiones trazas.

Dentro de los macronutrientes más importantes están las fuentes de carbono y de nitrógeno. Los aminoácidos, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los azúcares, las bases nitrogenadas, los compuestos aromáticos y un sinnúmero de compuestos orgánicos, pueden ser usados por uno u otro microorganismo. En peso seco una célula típica contiene un 50% de carbono. Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en la célula es el nitrógeno con cerca del 12% en peso seco.

Entre otros macronutrientes necesarios para la célula se encuentra el Fósforo (P), azufre (S), potasio (K), Magnesio (Mg), Calcio (Ca), sodio (Na) y el Hierro (Fe). Por su parte los micronutrientes o elementos traza (Co, Mn, Zn), aunque se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes como los macronutrientes para el funcionamiento celular (Brock, 2005).

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se emplean para el cultivo de los microorganismos. En microbiología se usan dos tipos generales de medios: *los químicamente definidos* y *los complejos*. En los primeros se conoce la composición química exacta del mismo, ya que están precisadas las cantidades de los diferentes compuestos tanto orgánicos como inorgánicos del medio. A menudo los medios complejos son hidrolizados de caseína, carne, soja, extracto de levadura u otras sustancias muy nutritivas, más químicamente indefinidas.

La preparación de los medios de cultivo y su esterilización es muy importante en las fermentaciones industriales. La esterilización consiste en la eliminación de todos los microorganismos por remoción o muerte, así como la inactivación de virus en o sobre un producto. Muchas fermentaciones industriales y casi todas las fermentaciones de laboratorio usan cultivos puros simples que necesitan un medio estéril y el mantenimiento de condiciones de esterilidad. Estas condiciones se requieren puesto que un medio contaminado sufrirá debido a que (Scragg, 2007):

- Los nutrientes disponibles son usados por los contaminantes y convertidos a células y productos indeseables.
- Las condiciones del medio cambian a menudo.
- Las enzimas producidas por los contaminantes pueden degradar cualquier producto formado.

1.5.2. Crecimiento microbiano (Brock, 2005).

La palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células. Una célula microbiana no viable se define como aquella que incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un periodo de tiempo suficientemente largo es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse. Una curva de crecimiento típica puede dividirse en distintas fases llamadas *fases de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte*.

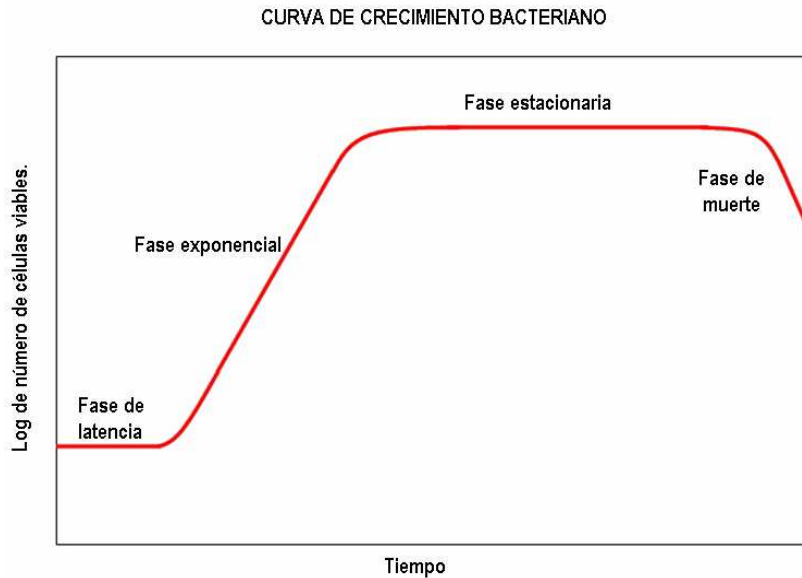


Figura 3. Curva de crecimiento típica de una población bacteriana.

Cuando se inocula una población microbiana en un determinado medio de cultivo el crecimiento comienza tras un periodo de tiempo llamado *fase de latencia* la cual puede ser breve o larga dependiendo de las condiciones de crecimiento y la procedencia del cultivo.

Si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio y en condiciones similares, el crecimiento exponencial se inicia de inmediato reduciendo el tiempo en la fase de latencia.

Por su parte, si un inóculo se toma desde su fase estacionaria y se inocula en el mismo medio de cultivo se observa un retraso aunque todas las células sean viables, como resultado la fase de latencia se hace mayor. Es probable apreciar un retraso cuando las células del inóculo han sido dañadas parcialmente a causa de la temperatura o compuestos tóxicos.

Las células en *crecimiento exponencial* están en el estado fisiológico más sano y por ello las células tomadas en el punto medio del crecimiento

exponencial son las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales. Durante la *fase exponencial* cada célula se divide para formar dos, cada una de las nuevas células se divide para formar otras dos y así sucesivamente. La velocidad de este tipo de crecimiento exponencial esta directamente influenciada por las condiciones del medio de cultivo.

El crecimiento exponencial no puede prolongarse de modo indefinido, por lo que en el ambiente de las células se generan diferentes factores que limitan el crecimiento celular. Generalmente un nutriente esencial del medio de cultivo llega a ser un factor limitante del crecimiento o bien pueden acumularse en el medio algunos productos de deshecho hasta niveles inhibitorios que hagan que cese el crecimiento exponencial. Al producirse esto la población alcanza la *fase estacionaria*.

Si la incubación continúa después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas pero también pueden morir. Si esto último ocurre se dice que la población está en *fase de muerte*.

1.5.3. Efectos de las condiciones ambientales en los microorganismos

El crecimiento y actividades de los microorganismos se ven muy afectadas por las condiciones físicas y químicas del medio en el que se desarrollan. Entre los factores de mayor relevancia se encuentran la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y de oxígeno entre otros.

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Existe una diversidad de microorganismos de acuerdo a su temperatura óptima, desde los que

pueden sobrevivir a temperaturas muy bajas o los que su temperatura óptima es muy alta. Según este criterio se pueden distinguir cuatro grupos de microorganismos: *Psicrófilos* con temperaturas óptimas bajas (0-10 °C), *Mesófilos*, con temperaturas óptimas moderadas (12-45°C), *Termófilos*, con temperaturas óptimas altas (40-70 °C), *Hipertermófilo*, con elevadas temperaturas óptimas (70-100 °C)

En relación al pH, cada microorganismo tiene un rango dentro del cual se hace posible su crecimiento y normalmente posee un pH óptimo definido. Los microorganismos tienden a crecer en un intervalo limitado de pH y aún dentro de este intervalo frecuentemente cambian su metabolismo como resultado de un cambio de incluso 1 a 1.5 unidades de pH. En general las bacterias crecen en un intervalo de pH de 4 a 8, las levaduras de 3 a 6 y los mohos de 3 a 7. Estos intervalos de pH para el crecimiento se pueden usar ventajosamente durante las fermentaciones para reducir las posibilidades de contaminación.

En relación con la disponibilidad de agua, todos los organismos la necesitan y la disponibilidad de la misma es un factor importante que en la naturaleza determina el crecimiento de los microorganismos. La disponibilidad del agua no solo es función del contenido presente en el medio, sino que también depende de la concentración de solutos presentes. Esto se debe a que las sustancias disueltas tengan cierta afinidad por el agua que hace que el agua asociada no esté disponible para los microorganismos.

La disponibilidad del agua se expresa en términos de la actividad acuosa (a_w). El agua difunde desde una región con alta concentración de agua hasta una región con baja concentración de agua y mayor concentración de solutos por el proceso denominado *Ósmosis*. La mayoría de microorganismos son

incapaces de existir en ambientes con actividad de agua muy baja y mueren o se deshidratan pasando a un estado de latencia en tales circunstancias (Brock, 2005).

1.5.4. Microorganismos en la producción de etanol

La fermentación alcohólica, puede iniciarse espontáneamente o mediante la inoculación de levaduras nativas o comerciales. Generalmente la producción de etanol se realiza utilizando la segunda forma de fermentación, es decir, empleando inóculos a base de cepas seleccionadas para la producción de etanol

Entre los muchos microorganismos que han sido utilizados para la producción de etanol, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la especie de mayor uso. *Zymomonas Mobilis* también se ha estudiado intensamente durante las últimas tres décadas.

En los sistemas de fermentación las levaduras requieren como principales nutrientes una fuente de carbono o glucosa. Sin embargo, una alta concentración de éste último sustrato puede inhibir el crecimiento de la levadura y la fermentación como resultado de una elevada presión osmótica. Este efecto puede ocurrir a concentraciones de azúcares fermentables en el rango de 125 y 250 g/l (López et al., 2009).

Las levaduras usualmente presentan su pH óptimo entre 4 y 6, pero pueden crecer en un amplio intervalo de pH, de 2,5 a 8,5. *Saccharomyces cerevisiae* es una especie mesófila que puede crecer a temperaturas moderadas (20-40 °C). A estos niveles de pH y temperatura ocurre la producción de etanol (Mohanty et al., 2009).

En lo que respecta a la contaminación por parte de otros microorganismos en los medios de fermentación, las levaduras presentan un carácter *Killer* que radica en la capacidad que tienen ciertas cepas de sintetizar y secretar una toxina proteica (factor *killer*) que resulta letal para otras cepas de levaduras, de su mismo género y especie o no, denominadas estas últimas cepas sensibles. Las levaduras productoras del factor *killer* son inmunes a las toxinas que ellas mismas producen.

Las toxinas requieren unirse a receptores específicos de la pared celular de sus células blanco para que las mismas resulten sensibles a ellas. De la descripción del fenómeno surgen inmediatamente los potenciales campos de aplicación de estas toxinas: en clínica médica (profilaxis y terapéutica) y en tecnología de los alimentos (conservación, preservación y enología). En el primer caso, en los últimos años se han comenzado a desarrollar estrategias de control de micosis humanas basadas en el uso de dichas “toxinas *killer*” o de anticuerpos desarrollados a partir de ellas. En el segundo caso, estas toxinas *killer* aparecen como una herramienta útil y efectiva en el control de levaduras contaminantes de bodegas que producen defectos graves en los vinos (Rivero et al., 2002).

1.6. Ruta metabólica para la producción de Bioetanol

La producción de etanol está íntimamente ligada con el crecimiento celular lo que significa que la levadura se presenta como un coproducto del proceso de fermentación.

Saccharomyces cerevisiae ha sido uno de los microorganismos mas utilizados en la producción de etanol. Esta emplea como ruta metabólica la *Glicólisis* para la fermentación y/o producción de bioetanol. Bajo condiciones

anaeróbicas el piruvato es reducido a etanol con la liberación de CO_2 . Teóricamente el rendimiento es de 0,511 y 0,489 para etanol y CO_2 respectivamente a partir de un mol de glucosa metabolizada.

De acuerdo con la vía glucolítica que se muestra en la Figura 4, por cada molécula de glucosa se hidrolizan o se gastan dos de ATP y se producen cuatro moléculas de ATP por lo que existe una ganancia de energía de dos ATP. Los últimos son utilizados para conducir la biosíntesis de células de levadura que implica una variedad de biorreacciones que requieren energía (Bai et al., 2007).

Sin el continuo consumo de ATP para el crecimiento de células de levadura la ruta metabólica o glucolítica se ve interrumpida de inmediato debido a la acumulación intracelular de ATP, inhibiendo la acción de la enzima fosfofructoquinasa (PFK) y ejerciendo así una de las tres regulaciones más importantes en la glicólisis. Cuando hay un alto nivel de ATP en la célula, queda disponible considerable energía química para la hidrólisis de ATP, luego la célula no necesita metabolizar glucosa para obtener energía, de modo que la presencia de ATP inhibe la vía glucolítica en este punto.

Uno de los aspectos más importantes acerca de cualquier vía metabólica se refiere a los puntos donde se ejercita el control o regulación. Las vías pueden dejar de funcionar cuando el organismo no tiene necesidad inmediata de esos productos ahorrando así energía al organismo.

En la glicólisis hay tres reacciones que constituyen puntos de control. La primera es la reacción de la glucosa para producir Glucosa 6-fosfato catalizada por la hexoquinasa; la segunda la producción de fructosa-1,6-bifosfato, es catalizada por la fosfofructoquinasa y la última es la reacción

que permite la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, catalizada por la piruvato quinasa.

Las hexoquinatas presentan características reguladoras, siendo los reguladores uno de los sustratos y dos de los productos de la reacción: ATP, ADP y Glucosa 6- fosfato (G6P) respectivamente. Cuando el consumo de energía es alto el aumento de ADP activa a la hexoquinasa y aumenta la velocidad de movilización de glucosa para ir al mismo paso con la demanda por más ATP. Cuando el consumo de energía declina el nivel intracelular de Glucosa 6-fosfato (G6P) se incrementa en respuesta a una menor demanda de energía.

La elevación del nivel de ATP y G6P inhibe el funcionamiento de la hexoquinasa y disminuye la movilidad de glucosa, dando lugar al primer control de la vía glucolítica (Bohinski, 1987).

La piruvato quinasa es la enzima que cataliza la última reacción o el tercer punto de control de la vía glucolítica. Es una enzima alostérica que se inhibe en presencia de ATP. La conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato se hace mas lenta cuando la célula tiene alta concentración de ATP, es decir cuando la célula no tiene gran necesidad de energía en forma de ATP (Campbell, 2007).

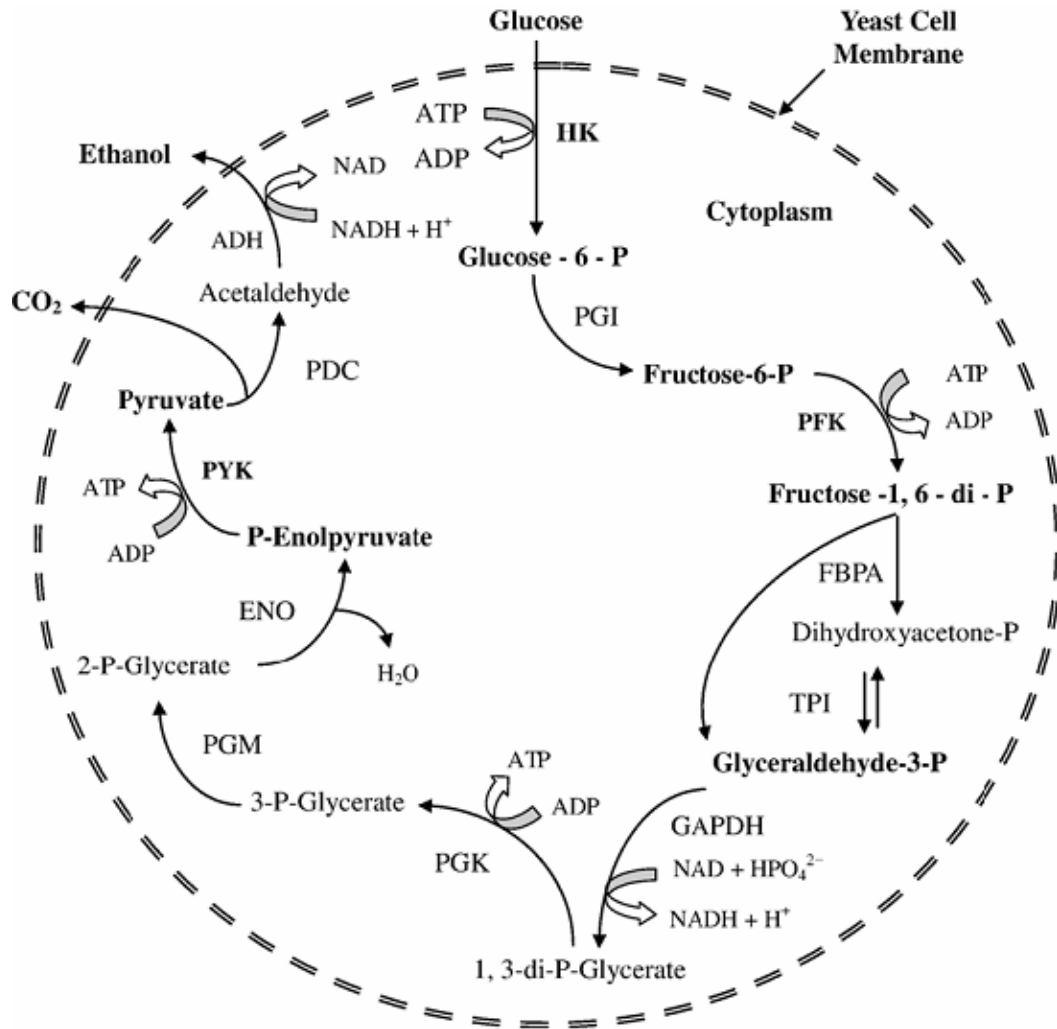


Figura 4. Ruta metabólica para la fermentación y producción de etanol empleando *S. cerevisiae*. Abreviaturas: HK: Hexoquinasa; PGI: Glucosa fosfato isomerasa; PFK: Fosfofructoquinasa; FBPA: fructosa bifosfato aldolasa; TPI: Triosa fosfato isomerasa; GAPDH: Glicer aldehído 3- fosfato deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato quinasa; PGM: fosfogliceratomutasa; ENO: Enolasa; PYK: Piruvato quinasa; PDC: Piruvato decarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa (Fuente: Bai et al., 2007).

1.7. Condiciones adversas para los microorganismos durante la producción de etanol

Durante la fermentación alcohólica las células de levadura están expuestas a condiciones adversas o de estrés provocadas por el cambiante medio exterior, algunas hacen referencia al medio ambiente en el que se encuentran las mismas, incluyendo las altas temperaturas, limitaciones de nitrógeno o fuente de carbono, deficiencia de nutrientes y contaminación. La capacidad para tolerar diversas condiciones suele ser uno de los criterios más importantes para la selección de cepas que permitan una eficiente fermentación y producción de etanol (Zhao y Bai 2009).

Existen condiciones de estrés en el metabolismo celular debido a la acumulación de etanol y su correspondiente inhibición en el crecimiento de las células de levadura.

La membrana citoplasmática es la única barrera existente entre el citoplasma intracelular y el medio exterior. Esta desempeña una importante función ayudando a la célula en su lucha contra los efectos del etanol y de acidez del medio que le rodea. Esta membrana por si sola no es permeable a macromoléculas o iones con excepción de los protones (H^+).

La acumulación de etanol en el medio de fermentación, interacciona con el funcionamiento de la membrana plasmática al ser la interfaz entre el medio y la parte interna de la célula.

El principal efecto del etanol es hacer que la membrana permita el paso de protones e inhibir la actividad de la bomba de protones ATPasa, la cual se encarga de mantener la homeóstasis del pH de la célula de levadura. Por lo tanto las células se encuentran en la obligación de consumir más energía

para mantener la homeostasis de pH, hasta que el equilibrio entre la entrada pasiva de electrones y su expulsión por la actividad de la bomba de protones ATPasa no puede ser mantenido dando lugar a la muerte de la célula (Salmon et al., 2007).

1.8. Etanol y su importancia en la nueva industria

El etanol se produce a gran escala en Brasil y los EE.UU. a partir de azúcar de caña y maíz respectivamente, siendo estos los países que lideran el área de los biocombustibles para el sector del transporte. El etanol puede ser mezclado con gasolina o utilizado como alcohol puro en algunos motores, aprovechando su propiedad de aumentar el índice de octanaje y su mayor calor de vaporización, suele ser entonces un excelente combustible para el futuro (Hagerdal et al., 2006).

Cuando se mezcla con gasolina el etanol actúa aumentando el octanaje y substituyendo compuestos tóxicos (tetraetilplomo) y cancerígenos (benceno). Se obtiene de esta forma un producto con mejor calidad desde el punto de vista ambiental y de salud de la población. En relación con las emisiones de contaminantes al ambiente, el uso de etanol y la combustión del mismo no produce SO_x, teniendo como consecuencia una menor incidencia en la lluvia ácida (Laborde et al., 2006).

La industria del etanol en América Latina y el Caribe, está construida principalmente sobre la caña de azúcar como materia prima. Así, las actividades productivas e industriales relacionadas con dicho producto han experimentado un salto tecnológico significativo, lo que ha redundado en un claro aumento en la productividad agrícola e industrial del sector. De manera similar el cultivo de las algunas materias primas que permitan la producción

de bioetanol puede derivar beneficios sociales, ambientales y económicos para una determinada región.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Medios de cultivo

Durante el desarrollo de la investigación fueron preparados tres medios de cultivo. El medio de cultivo para aislamiento y mantenimiento (YPGA), el cual era un medio sólido que contenía: extracto de levadura (10 g/l), peptona (10 g/l), glucosa (20 g/l) y agar (15 g/l). Un segundo medio (YPG) o medio de selección de levaduras fermentadoras de glucosa, correspondiente a la siguiente composición: extracto de levadura (10 g/l), peptona (10 g/l), glucosa (150 g/l). Finalmente, el medio de fermentación (YG) de composición: extracto de levadura (10 g/l) y glucosa (150 g/l). Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

2.1.2. Preparación del hidrolizado del almidón de yuca

Se pesaron 150 g de almidón de yuca y fueron disueltos en 600 ml de buffer acetato 0.2 M de pH 5. La hidrólisis del almidón incluyó dos procesos para los cuales se utilizaron dos enzimas diferentes: el primero o licuefacción en donde se utilizó la enzima Liquozyme SCDS® bajo las siguientes condiciones: Temperatura 80°C, agitación 390 rpm y volumen de enzima adicionado 187 µl. La posterior sacarificación se realizó por acción de la enzima Spirizyme fuel® bajo las siguientes condiciones: temperatura 70 °C, agitación 250 rpm y volumen de enzima 562 µl.

Del hidrolizado anterior fueron tomados 130 ml sobre los cuales se agregaron 10 ml de extracto de levadura de concentración 10 g/l para completar un volumen de fermentación de 140 ml y conformar un medio de cultivo YH.

2.2. Metodología experimental

2.2.1. Aislamiento de microorganismos nativos

Las levaduras presuntivas productoras de etanol fueron aisladas a partir de diferentes sustratos: zumo de manzana, zumo de caña, guarapo de panela y zumo del bagazo de fique. El aislamiento se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander por estudiantes en práctica de Bacteriología y Biología.

El zumo de manzana fue preparado en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología tomando manzanas en descomposición y transfiriéndolas a un recipiente con un contenido de agua de aproximadamente 1 litro, dejando fermentar durante 48 horas. El recipiente se mantuvo cerrado durante el tiempo de fermentación. Las muestras de guarapo de panela y el zumo de caña fueron obtenidas directamente en trapiches de la región de Santander en envases de 100 ml. Las muestras del guarapo de panela fueron tomadas de la parte superior o natas del guarapo, las muestras del zumo de caña fueron obtenidas durante el proceso de molienda y el zumo del bagazo de fique fue tomado directamente desde la máquina desfibradora.

En todos los casos, para el aislamiento de los microorganismos se preparó a partir de los diferentes sustratos una dilución 10^{-2} en solución salina 0,85 % (p/v), a partir de la cual se prepararon otra serie de diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6} ,

10^{-7}). De cada dilución se tomaron 100 μl y se sembraron en superficie utilizando el medio sólido YPGA definido en el numeral 2.1.1.

Las diferentes colonias obtenidas fueron caracterizadas macro y microscópicamente según se describe en el numeral 2.3.1.1. Las levaduras aisladas fueron almacenadas a 4°C en un medio de igual composición al anterior y mantenidos por subcultivo semanalmente.

2.2.2. Selección del microorganismo

Se realizó una selección de la mejor cepa productora de etanol a partir de los microorganismos previamente aislados. Para cada una de las levaduras presuntivas productoras de etanol se siguió la metodología descrita en la Figura 5.

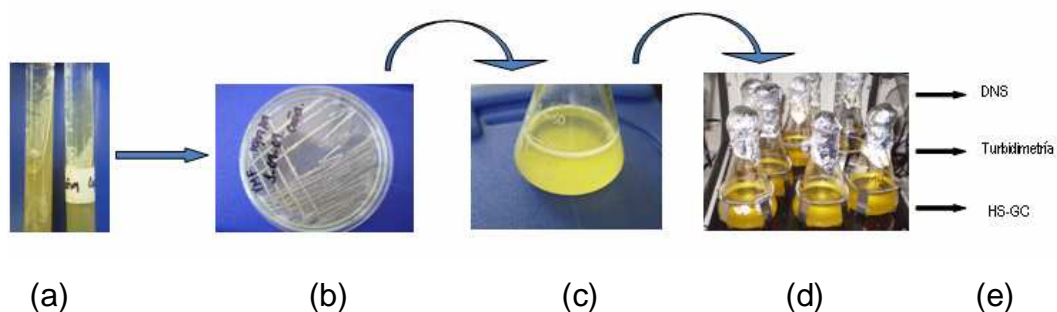


Figura 5. Metodología de selección. (a) Aislamiento de cepas en tubos inclinados, (b) siembra por extensión, (c) preinóculo, (d) medios líquidos de fermentación, (e) muestras para análisis de: glucosa por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), biomasa por turbidimetría y etanol por headspace-cromatografía de gases (HS-CG).

La respectiva levadura nativa fue sembrada en el medio sólido de aislamiento y mantenimiento YPGA (b) y se dejó crecer por 36 horas a 37 °C. Aproximadamente tres colonias de las crecidas del medio sólido fueron transferidas al medio líquido de selección YPG (c) cuyo contenido era aproximadamente el 10 % del volumen total del medio de selección y se dejó en crecimiento durante 12 horas en condiciones de microaerofilia. La suspensión anterior sirvió como inóculo para el medio de cultivo de selección YPG (d) de volumen total 140 ml. La concentración del inóculo fue estandarizada por turbidimetría mediante el uso de un espectrofotómetro y de acuerdo a la curva patrón de peso seco (ANEXO A), ésta fue de 0,06 g/l en todos los casos.

Una vez inoculado el medio de selección se inició el proceso de fermentación a temperatura controlada de 32 ± 2 °C, agitación 130 rpm y el pH inicial del medio de cultivo sin ajustar era 6.7 en condiciones microaerófilas. Durante la cinética de fermentación se estudió el consumo de glucosa, la producción de biomasa y etanol (e) teniendo como parámetro de selección la productividad volumétrica de etanol (Q_p). En el ANEXO B, se define Q_p y se muestra un ejemplo de cálculo.

2.2.3. Estudio preliminar de producción de etanol en medio de cultivo modificado

Una vez seleccionada la levadura nativa que presentó la mayor producción de etanol, se estudió el proceso de fermentación de glucosa utilizando el medio de cultivo YPG y YG, siguiendo la metodología indicada en la Figura 5.

2.2.4. Estudio del efecto de las condiciones del medio de cultivo en la producción de bioetanol

Para determinar las variables más influyentes en el proceso de fermentación con la levadura nativa seleccionada se elaboró un diseño experimental 3^3 con una réplica, se consideraron como variables independientes la agitación, el pH y la concentración de glucosa; la variable de respuesta fue la productividad de etanol. Los niveles estudiados para cada variable se muestran en la Tabla 1.

Para el estudio del efecto de las condiciones de cultivo en la producción de bioetanol los medios de cultivo fueron preparados en soluciones buffer para garantizar la estabilidad del pH. Se utilizó un buffer de acetato 0.2 M para medios de cultivo con pH 5; y un buffer de fosfato 0.2 M para pH 7. Los niveles de agitación fueron controlados y la temperatura se mantuvo a $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabla 1. Niveles de las variables en el proceso de fermentación.

VARIABLE	NIVELES		
	+1	0	-1
pH	7	6	5
Agitación(rpm)	170	120	70
Glucosa (g/l)	150	100	50

Se utilizó el programa STATGRAPHIS Plus 5.1, en el modo Diseño de Experimentos para identificar cual de las variables o factores son estadísticamente significativos durante el proceso de fermentación y cual de

los niveles de las mismas son favorables durante el proceso permitiendo la mayor productividad de etanol.

Se graficó la superficie de respuesta y la respectiva curva de nivel de las variables independientes sobre la variable dependiente del proceso de fermentación y se estableció la combinación de niveles de los diferentes factores que pueden maximizar la productividad de etanol.

En relación con el estudio del efecto de la agitación del medio de cultivo en la producción de etanol se evaluaron tres niveles de agitación: 70, 120 y 170 rpm. Se utilizó un agitador orbital marca Thermo scientific MAX Q 4450 con control de temperatura. Todos los ensayos se realizaron bajo las condiciones de temperatura y concentración de inóculo descritas en el numeral 2.2.2.

En relación con el estudio del efecto del pH en la producción de etanol se evaluaron tres niveles. Se modificó el pH del medio de cultivo ajustando el grado de acidez o basicidad en los niveles 5, 6 y 7 mediante el uso de soluciones buffer de acetato y de fosfato de concentración 0.2 M. Se realizó un ensayo preliminar a pH 4.

En relación con el efecto de la concentración de glucosa en la producción de etanol se evaluaron los niveles de: 50, 100 y 150 g/l. Se realizó un ensayo preliminar empleando una concentración de glucosa de 200 g/l.

2.2.5. Estudio preliminar de producción de etanol, utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado

Una vez establecidas las condiciones del medio óptimas para la producción de etanol, se realizó un ensayo sustituyendo la glucosa por el almidón de

yuca hidrolizado como sustrato. Durante la cinética de fermentación se siguió la metodología indicada en la Figura 5, con una concentración de inóculo de 0.3 g/l y siguiendo las condiciones óptimas de operación.

2.2.6. Parámetros cinéticos

Para la selección del microorganismo productor de etanol y del medio de cultivo ideal para el mismo, se estableció como parámetro de selección la *Productividad volumétrica de etanol (g/l*h)*. También fueron estudiados otros parámetros como: rendimiento celular respecto al sustrato consumido (g/g); velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), el tiempo de duplicación (h) y la productividad específica (h^{-1}).

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Identificación de levaduras

La caracterización preliminar de las levaduras se hizo de acuerdo con sus características macroscópicas: color, forma, apariencia, tamaño, borde de la colonia, brillo, consistencia y microscópicas utilizando la tinción de Gram, que a pesar de ser una coloración para bacterias, permite observar la morfología de levaduras presentes en la muestra.

2.3.1.1. Tinción de Gram (Brock, 2005)

La tinción de Gram utiliza colorantes para teñir las células y aumentar así su contraste facilitando su observación. Los colorantes usados para la tinción de Gram son: violeta (1 min), lugol (1 min), alcohol-acetona (inmediato) y fucsina (30 seg).

Sobre una placa de vidrio con una suspensión de microorganismos previamente seca y fijada, se adicionó una pequeña cantidad del colorante y se mantuvo en contacto durante el tiempo indicado anteriormente, a continuación se lavó con abundante agua y se secó. Sus características microscópicas fueron determinadas mediante la observación al microscopio.

2.3.1.2. Prueba API 20 C AUX (Linares et al., 2001)

La galería API 20 C AUX (bioMeérieux) está constituida por 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados y permiten efectuar 19 pruebas de asimilación.

Se preparó una suspensión de levaduras en solución salina 0.85 % de turbidez igual a la del patrón 2 de MacFarland. 100 µl de la suspensión fueron transferidos a una ampolla API C Médium. Las cúpulas se inoculan con la suspensión obtenida con un medio mínimo semi-agar y las levaduras crecen solamente si son capaces de asimilar el sustrato correspondiente. Los resultados fueron comparados con una cepa patrón.

2.3.2. Determinación de la concentración de glucosa (Miller, 1959).

La concentración de glucosa se determinó por el método del ácido 3, 5-Dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS al ácido 3,5-nitrosalicílico. La reacción permite un cambio de coloración y la lectura de absorbancia se hizo a 540 nm, la interpolación de los datos se hizo mediante una curva patrón previamente obtenida (ANEXO C).

2.3.3. Determinación de la concentración de biomasa (Brock, 2005)

La concentración de biomasa producida en el medio de fermentación se obtuvo por Turbidimetría en relación con el peso seco, efectuando la medida de la dispersión de la luz a 650 nm en un SPECTRONIC 20 GENESYS. La interpolación de los datos de absorbancia se hizo en una curva patrón previamente obtenida (ANEXO A).

2.3.4. Determinación de la concentración de etanol (Hailong Li, 2009).

El analito de interés, el etanol, se identificó por headspace-cromatografía de gases (GC) y se comparó con los datos obtenidos por medio de una curva de calibración de soluciones de etanol, la cual se analizó bajo las mismas condiciones de operación que la muestra de interés. Se utilizó la técnica de Headspace-Cromatografía de gases (GC), empleando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890.

Condiciones de operación HEADSPACE:

Ciclo GC: 50 min.

Agitación: media.

Tiempo de equilibrio vial: 10 min.

Tiempo de presurización: 0.03 min.

Tiempo de llenado del loop: 0.1 min.

Tiempo de equilibrio del loop: 0.1 min.

Tiempo de inyección: 0.5 min.

Volumen del loop: 1ml.

Condiciones de operación de la columna CROMATOGRAFIA DE GASES
(GC).

Gas de arrastre: Helio.

Flujo del gas de arrastre: 2 ml/min.

Tipo de columna: DB-WAX. 60m*0.25mm*0.25µm.

Temperatura inicial: 35°C (8min)

Velocidad: 5°C/min. Hasta 100°C (2min).

Velocidad: 15°C/min. Hasta 240°C (2min).

Este método está implementado en la Escuela Nacional de Cromatografía,
Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Características macro y microscópicas de las levaduras presuntivas productoras de etanol

La Tabla 2, resume las características macro y microscópicas de las cuatro levaduras nativas aisladas.

Tabla 2. Características de las colonias aisladas a partir de diferentes sustratos.

Características de las colonias aisladas		
Sustrato	Macroscópicas	Microscópicas
Zumo de manzana	Colonias medianas, de color blanquecino, con borde liso y cremosas	Medianas, globosas de forma elipsoidal.
Zumo de caña	Colonias cremosas, pequeñas, de color blanquecino y con borde liso	Medianas, globosas y de forma elipsoidal
Guarapo de panela	Colonias grandes, cremosas, de color blanquecino	Grandes, globosas de forma ovalada.
Zumo del bagazo de fique	Colonias pequeñas, cremosas, color blanquecino, con borde y superficie lisa	Pequeñas, globosas de forma ovalada

Aunque la tinción de Gram es específica para bacterias, también permite identificar levaduras de acuerdo con su tamaño y forma. Las bacterias ante la tinción de Gram son pequeñas, algunas de forma cilíndrica (bacilos), esférica (cocos) o pueden curvarse de forma espiral. Las levaduras ante la tinción de Gram presentan un gran tamaño en comparación a las bacterias (Brock, 2005).

Las levaduras nativas aisladas a partir de diferentes sustratos ante la tinción de Gram se observaron de color morado intenso, grandes y globosas. Las levaduras aisladas del zumo del bagazo de fique y del guarapo de panela presentaron forma ovalada y las aisladas del zumo de manzana y del zumo de caña forma elipsoidal.

3.2. Selección del microorganismo/aislamiento mayor productor de bioetanol

Una serie de modelos empíricos basados en la mecánica de las leyes cinéticas se han propuesto para describir la fermentación alcohólica en un sistema por lotes. Este modelo asume que el crecimiento microbiano unicelular es autocatalítico de modo que la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de células ya presente (Blanco et al., 2006).

$$\frac{dx}{dt} \propto X \qquad \frac{dx}{dt} = \mu X$$

Donde μ (h^{-1}) es la velocidad específica de crecimiento la cual es específica para cada célula y depende del medio de crecimiento. La velocidad de

crecimiento se define como el cambio en el número de células por unidad de tiempo.

$$\mu = \frac{1}{X} * \frac{dx}{dt} \qquad \int_0^t \mu dt = \int_{x_0}^x \frac{1}{X} dx \qquad \mu t = \ln \frac{X}{X_0}$$

En la Tabla 3 se encuentran los valores de velocidad específica de crecimiento calculados para cada una de las levaduras presuntivas productoras de etanol. La levadura aislada del zumo de caña posee una velocidad de crecimiento superior a las provenientes del zumo de manzana, guarapo de panela y del zumo de bagazo de fique.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento de las levaduras aisladas a partir de diferentes sustratos.

<u>Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)</u>			
Zumo del bagazo de fique	Zumo de manzana	Zumo de caña	Guarapo de panela
0,21	0,25	0,31	0,06

El aumento de la concentración de células en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente es una progresión geométrica de base 2. Cuando dos células se dividen se convierten en cuatro y así sucesivamente (Brock, 2005). Ello puede expresarse de la siguiente forma: $2^1 \rightarrow 2^2$. El tiempo que un microorganismo gasta en duplicar su biomasa se define como:

$$t_d = \ln \frac{2}{\mu}$$

La Tabla 4 muestra el tiempo invertido por cada una de las levaduras nativas de diferentes sustratos para duplicar su biomasa.

Tabla 4. Tiempo de duplicación de las levaduras aisladas a partir de diferentes sustratos.

Tiempo de duplicación (h)			
Zumo del bagazo de fique	Zumo de manzana	Zumo de caña	Guarapo de panela
3,2	2,7	2,2	11,6

De las Tablas 3 y 4 se concluye que la levadura aislada del zumo de caña presenta la mayor velocidad de crecimiento y por tanto el menor tiempo de duplicación de sus células. Las levaduras del zumo del bagazo de fique y zumo de manzana poseen velocidades de crecimiento muy cercanas entre si y un tiempo de duplicación mayor al de la levadura aislada del zumo de caña. Este factor se atribuye a la composición de los sustratos a partir de los cuales se aislaron las diferentes levaduras.

Los sustratos utilizados para el aislamiento de las levaduras presuntivas productoras de etanol se caracterizan por ser ricos en carbohidratos. La gran diferencia entre éstos radica en la composición o tipo de carbohidratos presentes y la facilidad que puede tener el microorganismo para acceder a estos nutrientes o fuentes de carbono requeridos para su crecimiento.

Sustratos como el zumo de caña y el zumo de manzana poseen un contenido de carbohidratos a los que el microorganismo puede acceder fácilmente como la glucosa y la fructosa.

Si bien, el zumo de caña es un producto rico en azúcares, la mayor parte de ellos son glucosa y sacarosa y en una menor proporción fructosa. Estos se encuentran disponibles para que los microorganismos los utilicen como nutrientes y facilitadores de su crecimiento (Chaves, 2003).

El zumo de manzana también presenta un gran contenido de azúcares disponibles como nutrientes para los microorganismos, la mayor parte de estos azúcares es fructosa y en una menor proporción glucosa y sacarosa. En el guarapo de panela el azúcar más abundante es la sacarosa.

En el caso del zumo del bagazo de fique, los nutrientes necesarios para el microorganismo no cuentan con un fácil acceso, ya que presenta material lignocelulósico que requiere de un previo tratamiento para facilitar al microorganismo los azúcares y nutrientes requeridos para su crecimiento, el principal carbohidrato en el bagazo de fique es la celulosa.

Las diferencias en el contenido de azúcares y la disponibilidad de los mismos, es un importante factor que interviene directamente en el crecimiento microbiano. Es por ello que se observó que al utilizar como sustrato el zumo de caña el cual es rico en glucosa, el microorganismo presenta una mayor velocidad de crecimiento y un tiempo de duplicación menor en comparación a los valores reportados para los microorganismos aislados de los restantes sustratos mencionados. El microorganismo utiliza en primer lugar la fuente de carbono y energía más fácilmente asimilable, tal como la glucosa.

Cuando se utilizó el zumo de manzana como sustrato se observó una velocidad de crecimiento ligeramente menor a la encontrada con el zumo de la caña, lo que indica que el microorganismo aislado del zumo de manzana utiliza eficientemente la fructosa para su crecimiento.

La levadura aislada del guarapo de panela presentó la menor velocidad específica de crecimiento alcanzando un valor de $0,0660 \text{ h}^{-1}$ y requiere de un tiempo de duplicación aproximadamente 5 veces mayor al resto de las levaduras aisladas.

Este efecto puede atribuirse a que la levadura aislada del guarapo de panela proviene de un muestreo hecho en la parte superior del mismo o natas del guarapo, es probable que en esta zona haya ocurrido un envejecimiento prolongado que de lugar a la autodestrucción de las células de levadura por acción de sus propias enzimas (fenómeno de autólisis). También cabe considerarse que las levaduras al encontrarse en la parte superior del guarapo hayan crecido en un ambiente aerobio y al ser sometidas a microaerofilia su crecimiento haya sido afectado.

La Figura 6 representa la producción de etanol en el tiempo por parte de cada una de las levaduras presuntivas productoras de etanol en el medio YPG y bajo las siguientes condiciones de fermentación: pH 6.7, agitación 130 rpm y temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

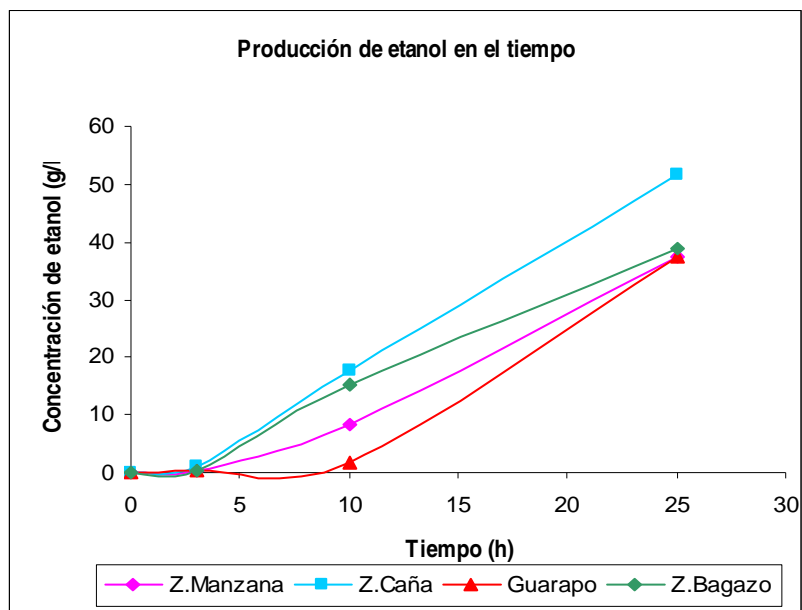


Figura 6. Producción de etanol por cada una de las levaduras presuntivas productoras en el medio YPG.

En la Tabla 5 se resumen los parámetros cinéticos de producción de etanol por parte de cada una de las levaduras presuntivas productoras, en el medio de cultivo YPG.

La Figura 6 junto con el parámetro cinético de productividad (Q_p) muestran que el microorganismo que permite la mayor productividad de etanol en el medio de selección YPG es la levadura aislada del zumo de caña, esta puede alcanzar una productividad volumétrica de etanol de $2,06 \text{ g/l}\cdot\text{h}$, mientras que la productividades de etanol alcanzadas con las levaduras aisladas del zumo de manzana y guarapo de panela son similares entre si y más bajas que la de caña de azúcar.

De la misma manera el parámetro de rendimiento celular respecto al sustrato consumido y la velocidad específica de crecimiento es mayor para la

levadura aislada del zumo de caña en comparación a los demás aislamientos. A partir de los resultados obtenidos registrados en la Tabla 5 y de acuerdo al parámetro de productividad volumétrica de etanol, se seleccionó el aislamiento de zumo de caña como el mejor microorganismo productor de etanol para continuar con los estudios de fermentación alcohólica.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de producción de etanol utilizando levaduras nativas de diferentes sustratos.

SUSTRATO	Yx/s (g/g)	μ (h ⁻¹)	qp (h ⁻¹)	Qp (g/l*h)
Zumo de manzana	0,03	0,25	0,52	1,50
Zumo de Caña	0,05	0,31	0,40	2,06
Guarapo de panela	0,04	0,06	0,37	1,50
Zumo del bagazo de fique	0,05	0,22	0,40	1,69

Yx/s= Rendimiento celular respecto al sustrato consumido (g/g); μ = Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹), qp= Productividad específica (h⁻¹); Qp= Productividad volumétrica (g/l*h).

De acuerdo con la literatura, los resultados obtenidos utilizando la levadura nativa mayor productora de etanol son promisorios, teniendo en cuenta que otros investigadores han mostrado productividades de etanol comparables con las obtenidas.

Sventlana Nikolíc y sus colaboradores en el año 2009, utilizando células inmovilizadas de *Sacchromyces cerevisiae* obtuvieron una productividad

volumétrica de 1.96 g/l*h en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (Nikolic et al., 2009).

En estudios realizados por M. Blanco y sus colaboradores en el año 2006, se obtuvo una productividad volumétrica de etanol de 2,94 g/l*h cuando se usaba un medio de cultivo que contenía 5 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, 3 g/l de extracto de malta y 100 g/l de glucosa, bajo la acción de la levadura *Sacchromyces cerevisiae* ATCC 1326 (Blanco et al., 2006).

El rendimiento celular respecto al sustrato consumido, la velocidad específica de crecimiento y la productividad específica de etanol encontrados en el anterior estudio fueron de: 0,215 g/g, 0,132 h⁻¹ y 0,297 h⁻¹ respectivamente, que comparados con los obtenidos utilizando la levadura aislada del zumo de caña en las condiciones del medio de selección YPG son menores. Lo anterior ubica a la levadura nativa del zumo de caña como una levadura potencial para la producción de bioetanol.

3.3. Identificación de la levadura nativa seleccionada

El microorganismo seleccionado como el mayor productor de bioetanol presenta las siguientes características macro y microscópicas: Colonias blancas, pequeñas, de color blanquecino, redondas, cremosas y con borde liso. Según sus características microscópicas tienen forma elipsoidal y de tamaño mediano.



Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas de la colonia de la levadura aislada del zumo de caña.

3.4. Cinética de crecimiento y producción de etanol utilizando la cepa seleccionada como mayor productora de etanol

Con el objetivo de encontrar un medio de fermentación más económico para la levadura seleccionada como la mejor productora de etanol, fueron estudiados dos medios de cultivo: El medio de selección YPG y un segundo medio o medio de fermentación YG el cual había sido modificado, no contenía peptona. La peptona es una de las fuentes de nitrógeno mas empleadas en los medios de cultivo complejos y es un nutriente de alto costo.

Las Figuras 8 y 9 representan los perfiles cinéticos de fermentación utilizando la cepa mayor productora de etanol en cada uno de los diferentes medios de cultivo de estudio. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de producción de etanol obtenidos en estudio preliminar de medios de cultivo utilizando la levadura mayor productora de etanol.

Medio de Cultivo	Y_{p/x} (g/g)	Y_{x/s} (g/g)	q_p (h ⁻¹)	Q_p (g/l*h)
Medio YPG	10,09	0,05	0,40	2,06
Medio YG	23,56	0,02	0,93	3,58

Utilizando la levadura nativa del zumo de caña seleccionada como la mayor productora de etanol, en el medio de cultivo YPG se alcanzó una productividad volumétrica de 2,06 g/l*h y una máxima concentración de biomasa de 12,5 g/l, en este medio la velocidad específica de crecimiento de la cepa productora de etanol fue de 0,3088 h⁻¹ y se requiere de un tiempo de duplicación de 1,86 h. En el caso en que se utilizó el medio YG se alcanzó una productividad volumétrica de etanol de 3,58 g/l*h y una máxima concentración de biomasa de 3,035 g/l. En el medio YG la velocidad específica de crecimiento fue de 0,2822 h⁻¹ y el tiempo de duplicación 1,95 h.

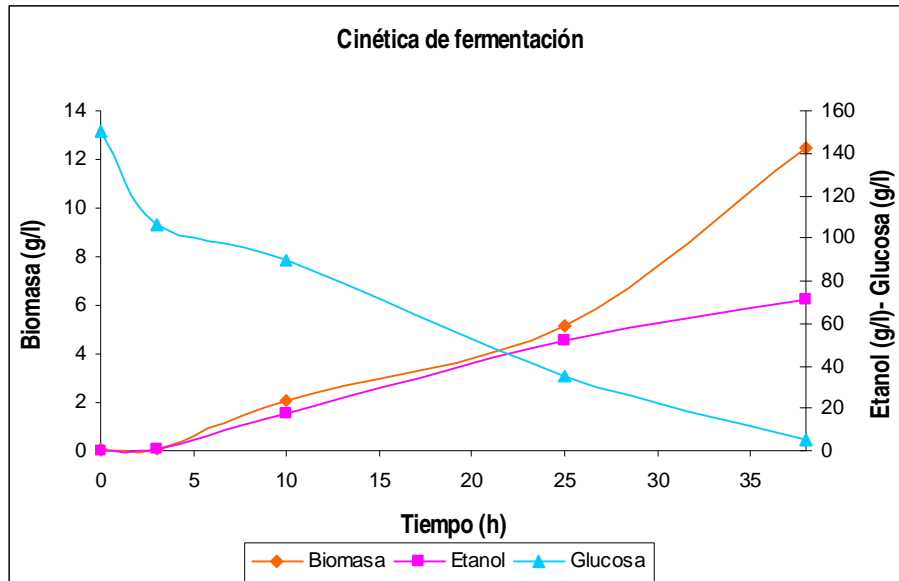


Figura 8. Cinética de fermentación en el medio YPG utilizando la levadura productora de etanol a temperatura de 32 °C, agitación 130 rpm y pH 6,7.

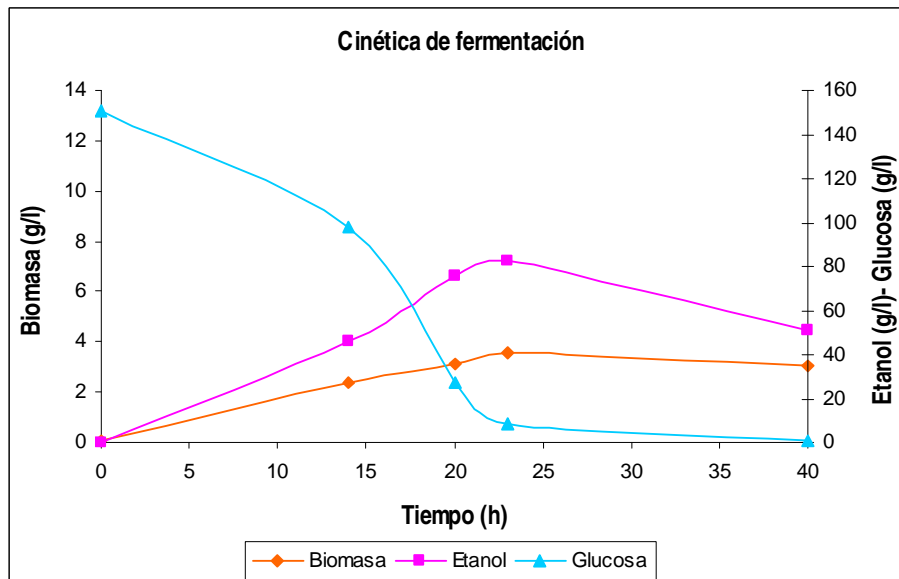


Figura 9. Cinética de fermentación en el medio YG utilizando la levadura productora de etanol a temperatura de 32°C, agitación 130 rpm y pH 6,7.

El parámetro de productividad específica (q_p) se hace casi tres veces mayor en el medio de cultivo YG, ello indica que la levadura nativa del zumo de caña mayor productora de etanol produce menos biomasa en el medio deficiente de peptona en comparación al medio de cultivo cuando contiene éste último nutriente.

Aunque la velocidad específica de crecimiento y la concentración de biomasa se ven reducidas como consecuencia de la eliminación de nutrientes, el parámetro de productividad volumétrica se ve favorecido ante este efecto, pues en el medio YG al cual se le había eliminado la peptona se alcanzó la mayor productividad de etanol. Esto indica que la deficiencia de peptona en el medio de fermentación no limita al microorganismo seleccionado en sus procesos bioquímicos, específicamente en la producción de etanol y puede eliminarse reduciendo los costos al preparar los medios de cultivo.

Los componentes del medio YG son principalmente glucosa y extracto de levadura. Este último es una fuente de sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos cuya sola presencia en el medio de cultivo estaría liberando a la célula de la síntesis de aminoácidos permitiendo una mayor disponibilidad del sustrato para la producción de etanol sin el requerimiento de otros nutrientes (Mejías 1990).

De acuerdo a los parámetros de rendimiento y productividad de etanol fue seleccionado el medio de cultivo YG para continuar con los ensayos de fermentación utilizando la levadura nativa del zumo de caña potencial productora de etanol.

3.5. Comportamiento del pH durante la fermentación alcohólica

La Figura 10 muestra el descenso del pH en el medio de cultivo YG utilizado en la fermentación alcohólica.

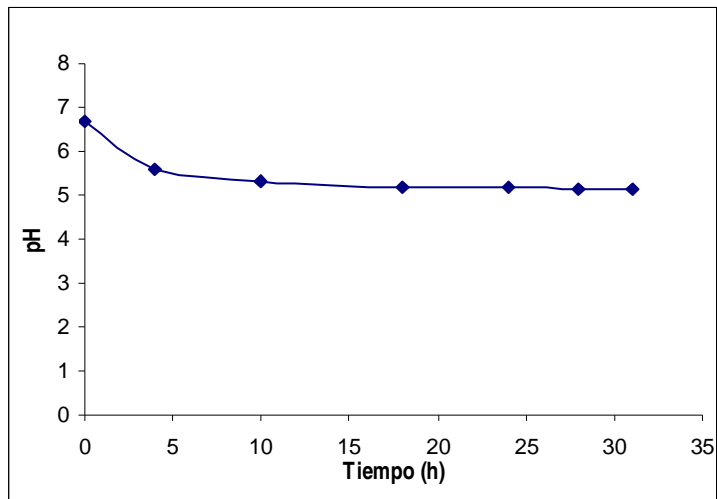


Figura 10. Comportamiento del pH en el medio de fermentación YG utilizando la levadura mayor productora de etanol bajo las siguientes condiciones: temperatura de 32°C, agitación 130 rpm y pH inicial 6,7.

Durante la fermentación, además de producirse etanol y CO₂ se generan otros subproductos como el glicerol y ácidos orgánicos que pueden bajar el pH del medio de cultivo. Es por ello que se hace necesario controlar el pH para mitigar el efecto que se muestra en la Figura 7, consecuencia de la formación de subproductos.

Durante las primeras horas de fermentación el pH desciende drásticamente desde 6,7 a 6, de allí en adelante desciende de manera pausada hasta

mantenerse alrededor de las 5 unidades. Según los valores reportados en la Tabla 6 y la Figura 9, la mayor productividad volumétrica de etanol se alcanzó cerca de las 25 horas en donde el pH es cercano a 5, ello indica que a este pH la levadura nativa seleccionada podría desarrollar mejor y eficientemente el proceso de conversión desde glucosa hasta bioetanol.

3.6. Estudio del efecto de las condiciones del medio de cultivo en la producción de bioetanol

Se estudió el efecto de las condiciones del medio de cultivo en la productividad de etanol, para ello se realizó un ensayo preliminar en el que se varió la concentración de glucosa entre los niveles de 50 y 200 g/l, simultáneamente se modificó el pH en los intervalos de 4 a 7. Durante este ensayo se observó que la levadura aislada del zumo de caña y seleccionada como la mayor productora de etanol no crece a altas concentraciones de glucosa como 200 g/l, en este caso la cepa productora de etanol tiende a eliminar agua de la célula debido a la alta concentración de sustrato en el medio externo al que se encuentra sometido hasta pasar a un estado de latencia, por lo que no se observó crecimiento.

Al realizar los ensayos preliminares a pH 4, no se observó crecimiento de la cepa productora de etanol. Las condiciones ácidas del medio de cultivo afectan la naturaleza de la superficie microbiana y la homeóstasis de la célula por lo cual no se observó crecimiento a pH 4 independientemente de la concentración de glucosa utilizada. Con los resultados obtenidos en este ensayo preliminar se seleccionaron los niveles de las diferentes variables a estudiar como se describe en el numeral 2.2.4.

3.6.1. Diseño estadístico de experimentos para considerar el efecto de las variables en la productividad de etanol

Tabla 7. Diseño experimental 3³ obtenido mediante el programa computacional STATGRAPHIS Plus 5.

Glucosa(g/l)	pH	Agitación (rpm)	Productividad de etanol (g/l*h)
0	0	-1	1,74
-1	-1	-1	1,52
0	-1	0	2,55
1	0	-1	1,77
0	-1	-1	2,13
1	1	1	1,41
0	1	0	2,48
-1	-1	0	1,93
-1	0	0	0,96
1	-1	1	2,28
1	-1	0	3,40
-1	1	1	1,47
1	-1	-1	2,42
0	1	1	1,25
1	0	0	1,12
0	1	-1	2,61
-1	0	-1	1,19
-1	1	-1	1,99
-1	1	0	2,48
-1	-1	1	1,65
1	1	0	2,18
-1	0	1	1,25
1	0	1	1,54
1	1	-1	1,99
0	0	0	1,40
0	0	1	1,48
0	-1	1	1,46

En la Tabla 7 se reportan los resultados de productividad volumétrica de etanol al combinar los niveles de las variables: glucosa, pH y agitación.

3.6.2. Estadístico P

En la Tabla 8 se encuentran los valores para el estadístico P, el cual determina el grado de significancia de cada efecto de las variables independientes sobre el modelo, un efecto con valor $-P$ inferior a 0,05 es significativo para niveles de confianza del 95 %. En este caso existen cinco factores que son significativos.

Tabla 8. Relación entre las variables que afectan la productividad de etanol y el estadístico P.

Fuente	P-Valor
A:Glucosa	0,0310
B:pH	0,3597
C:Agitación	0,0348
AA	0,5430
AB	0,0172
AC	0,6243
BB	0,0003
BC	0,1790
CC	0,0446

3.6.3. Gráfico de Pareto

El diagrama de Pareto (Figura 11) presenta cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud. La línea vertical juzga qué efectos son estadísticamente significativos. Las barras extendidas más allá de la línea corresponden a efectos que son estadísticamente significativos en el 95% del nivel de confianza. Existen 5 efectos significativos: El pH, la concentración de glucosa, el nivel de agitación, la relación glucosa-pH y la relación agitación-agitación, siendo el más significativo el pH.

3.6.4. Gráfico de efectos principales

La Figura 12 presenta la productividad de etanol estimada como una función de cada factor experimental.

En relación a la productividad de etanol en función de la concentración de glucosa, a medida que la concentración de esta última se hace mayor, la productividad de etanol también se incrementa. La agitación por su parte puede favorecer la productividad de etanol a niveles intermedios y el pH a niveles bajos.

Gráfico de Pareto estandarizado para Productividad de etanol

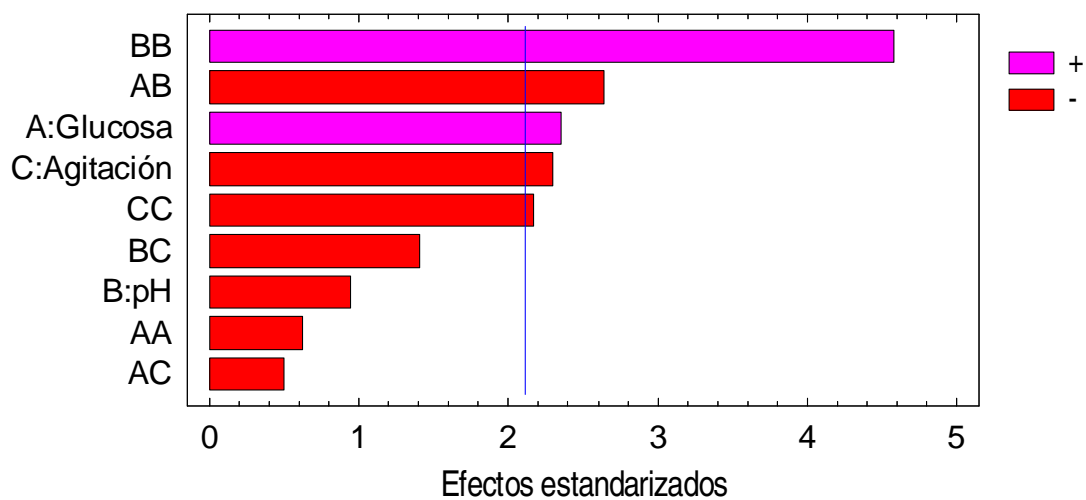


Figura 11. Diagrama de Pareto para los efectos estimados significativos en la productividad de etanol.

Gráfico de Efectos principales para Productividad de etanol

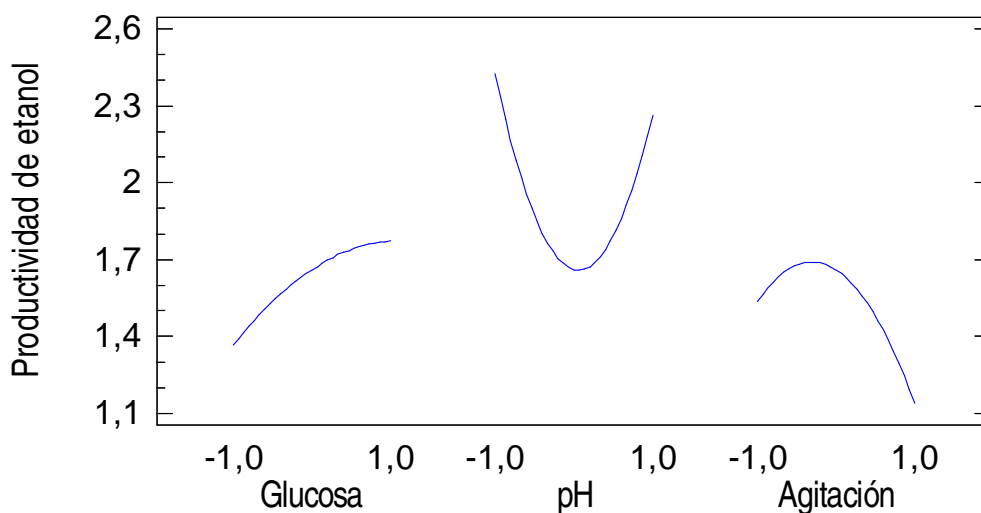


Figura 12. Grafico de los principales efectos en la productividad de etanol.

La fuente de carbono es de vital importancia para los microorganismos y para la vía glucolítica. La mayoría de los microorganismos como las levaduras requieren concentraciones de glucosa de aproximadamente entre 80 y 200 g/l para la producción de bioetanol, es por ello que al utilizar la levadura aislada del zumo de caña en el medio de fermentación YG, a medida que aumenta la concentración del sustrato en el medio de cultivo, también se incrementa la productividad de etanol, concentraciones de glucosa muy bajas, limitan el ejercicio de los microorganismos en la fermentación alcohólica y concentraciones muy altas (200 g/l) pueden inhibir la producción de etanol y crecimiento del microorganismo por efecto de ósmosis (Blanco et al., 2006).

Para los estudios de fermentación de glucosa utilizando la levadura seleccionada como mayor productora de etanol en el medio YG, el pH es el factor de mayor significancia en la productividad de etanol, cualquier modificación en el pH puede incrementar o disminuir tal producción. La mayor productividad se obtuvo a pH 5 y fue de 2,55 g/l*h. La productividad volumétrica de etanol disminuye a pH intermedios (6).

En lo que respecta a la agitación su finalidad en un biorreactor es: dispersar el aire en la solución de nutriente, obtener una temperatura y una concentración de nutrientes homogénea en todo el recipiente, suspender los microorganismos y nutrientes sólidos, dispersar cualquiera de los líquidos inmiscibles presentes (Laborde et al., 2006).

Una adecuada agitación permite la mezcla de burbujas de gas a través del medio líquido garantizándose el acceso de las células microbianas a los nutrientes.

Según los niveles de agitación probados experimentalmente, un nivel de agitación de 170 rpm afecta el metabolismo de las levaduras productoras de etanol aisladas del zumo de caña pues pueden estresarse a estos niveles de agitación, de la misma manera una elevada agitación evita el eficiente acceso del microorganismo al nutriente, por lo que la productividad de etanol se ve reducida, el mismo efecto se presenta a niveles de agitación muy bajos. Los niveles de agitación intermedios como 120 rpm incrementan la productividad de etanol garantizando que el microorganismo tiene fácil acceso al nutriente requerido para sus procesos bioquímicos.

3.6.5. Contorno de superficie de respuesta

La Figura 13 presenta los contornos para la productividad de etanol como una función de la concentración de glucosa y el pH. Los otros factores se mantienen constantes.

Dentro del gráfico mostrado solo una pequeña zona da lugar a la mayor productividad de etanol la cual corresponde a las mayores concentraciones de glucosa y a el pH del valor mas bajo utilizado es decir 150 g/l y 5 unidades respectivamente. Los menores valores alcanzados de productividad volumétrica de etanol se presentan en la zona enmarcada por la concentración de glucosa mas baja y a pH intermedio, 50 g/l y 6 unidades respectivamente.

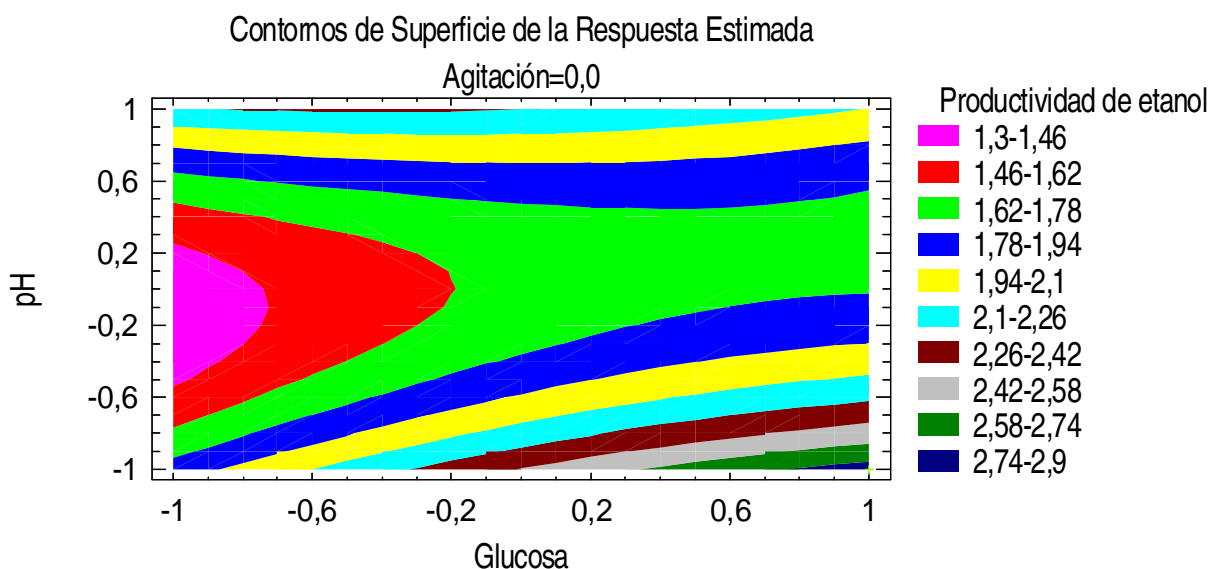


Figura 13. Contornos de superficie de respuesta de las diferentes variables en la productividad de etanol.

3.6.6. Factores que pueden maximizar la productividad de etanol

La Tabla 9 presenta la combinación de niveles de los diferentes factores que pueden maximizar la productividad de etanol. Valor óptimo de productividad de etanol: 2,82 g/l*h.

Tabla 9. Niveles óptimos de las variables glucosa, pH y agitación para la productividad de etanol.

<u>Factor</u>	<u>Óptimo</u>
Glucosa (g/l)	150
pH	5
Agitación (rpm)	112

3.7. Estudio del proceso de fermentación utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado

La Figura 14 muestra la cinética de fermentación utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado y como microorganismo fermentador la levadura aislada del zumo de caña seleccionada como la mayor productora de bioetanol.

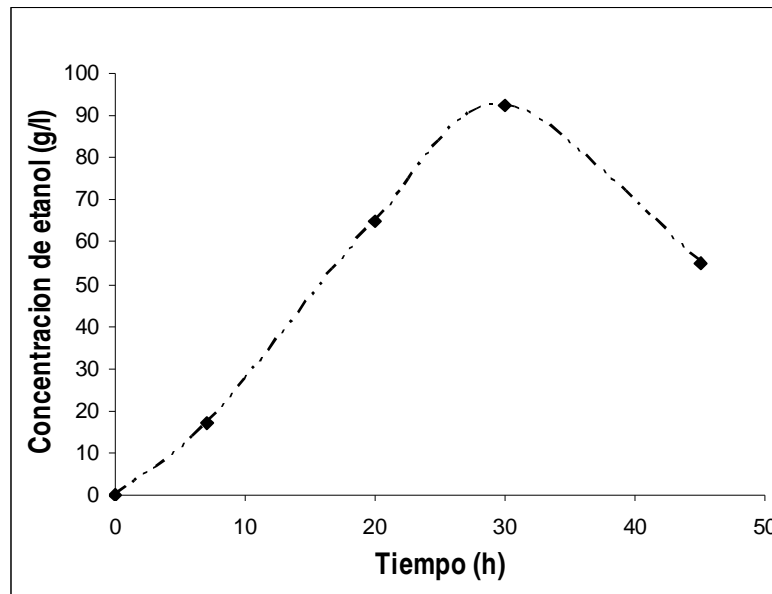


Figura 14. Producción de etanol utilizando como sustrato almidón de yuca hidrolizado y la levadura productora de etanol bajo las siguientes condiciones: temperatura 32 °C, agitación 112 rpm y pH 5.

El hidrolizado de almidón de yuca es un excelente sustrato para el proceso de fermentación y producción de etanol. Bajo las condiciones de fermentación establecidas en el numeral 2.2.5 el microorganismo nativo utiliza el hidrolizado de almidón de yuca como sustrato para producir etanol y alcanza una productividad volumétrica de 3,07 g/l*h.

De acuerdo a la literatura Ramasamy Amutha & Paramasamy Gunasekaran en el 2001, al emplear células libres de *Saccharomyces diastaticus* y *Z. mobilis* sobre almidón licuado como sustrato obtuvieron una productividad volumétrica máxima de 0,95 g/l*h (Amutha et al., 2001).

Comparado con estudios hechos por Davis y colaboradores en el 2006, acerca de la producción de etanol sobre hidrolizados de almidón utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, en donde se alcanzó una productividad volumétrica de etanol de 3,25 g/l*h, los resultados obtenidos al utilizar la levadura aislada del zumo de caña son promisorios.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de levadura aisladas a partir de diferentes sustratos tales como el zumo de caña, zumo de manzana, bagazo de fique y guarapo de panela, demostraron ser competitivas en la producción de etanol a escala de laboratorio.
2. La levadura aislada a partir del zumo de caña resultó ser la mayor productora de etanol, con una productividad volumétrica de 2,06 g/l*h en el medio de selección YPG bajo las siguientes condiciones de fermentación: pH 6.7, 150 g/l de glucosa, agitación y temperatura controlada de 130 rpm y 32 + ó – 2°C respectivamente.
3. La levadura aislada del zumo de caña, la cual presentó la mayor producción de etanol puede crecer en un intervalo de pH de 5 a 7, a pH 4 y concentraciones de glucosa de 200 g/l su crecimiento se ve afectado.
4. El diseño experimental permitió establecer el efecto de cada una de las variables independientes (Concentración de glucosa, pH y agitación) en el proceso de fermentación desde glucosa hasta bioetanol.
5. En el proceso de fermentación de glucosa hasta bioetanol con la levadura nativa aislada a partir del zumo de caña, los mejores resultados de productividad se obtuvieron a las condiciones siguientes: pH 5, 150 g/l de glucosa y 120 rpm.
6. El ajuste del pH de los medios de cultivo mediante buffer acetato y fosfato fue un factor importante para mitigar el descenso del pH producido durante el

proceso de fermentación y así garantizar que esta última ocurra a unas mismas condiciones acidez o basicidad.

7. La levadura nativa del zumo de caña puede crecer y llevar a cabo sus procesos fermentativos en un medio de cultivo en ausencia de peptona.

8. El hidrolizado de almidón de yuca es un sustrato prometedor para el proceso de fermentación y producción de bioetanol utilizando microorganismos fermentadores nativos con la levadura aislada del zumo de caña.

RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio a nivel de planta piloto donde se evalúen las condiciones de fermentación usando la levadura seleccionada como productora de etanol durante esta investigación para obtener mayores porcentajes de rendimiento de etanol y así llevar el proceso a escala industrial.
2. Estudiar el efecto del bioetanol producido en mezclas con gasolina sobre las auto partes del vehículo asociados o en contacto con el combustible líquido.
3. Estudiar las condiciones y ambientes que permiten dar aprovechamiento a la biomasa producida durante el proceso de fermentación.
4. Realizar estudios a nivel molecular de la levadura nativa del zumo de caña, seleccionada como la mayor productora de etanol y así mejorar el rendimiento en el proceso de fermentación.
5. Ampliar los estudios del proceso de fermentación utilizando como sustrato el almidón de yuca hidrolizado.

BIBLIOGRAFÍA

Blanco Marcelo, Peinado Antonio C, Mas Jordi. "Monitoring alcoholic fermentation by joint use soft and hard modeling methods. Analytica Chimica acta (2006).

Bohinski Robert C. "Bioquímica" Segunda edición (1987).

Chaves Solera Marco Antonio. "La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante" (2003).

Davis Linda, Rogers Peter, Pearce John, Peiris Paul. " Evaluation of *Zymomonas* -based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream". Biomass and Bioenergy (2006)

Demirbas Ahyan. "Progress and recent trends and biofuels". Progress in energy and combustion science (2007).

F.W Bai, W.A Anderson, M. MOO Young. " Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks". Biotechnology advances (2006).

Hagerdal B Hahn, M galbe, M.F Gorwa Grauslund, "Bioethanol the fuel of tomorrow from the residues of today" (2006).

Hideki Fukuda, Akihiko Kondo, Sriappareddy Tamalampudi. "Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts". Biochemical engineering journal (2009)

Hailong li, xin Cheng chaiyulin deng, huaiyu zhan, shiyu fu. “ rapid determination of ethanol in fermentation liquor by full evaporation headspace gas chromatography. Journal of Chromatography A (2008).

Laborde Miguel A, Abello M. Cristina, Aguirre pio. “Producción y purificación de hidrógeno a partir de bioetanol y su aplicación en pilas de combustible. Primera edición (2006)

Linares Maria José, Solís Cuesta Frnacisco. “Identificación de levaduras”. Revista iberoamericana de microbiología (2001).

López Arroyo Noe, Orlic Sandi, Querol Amparo, Barrio Eladio. “ Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Kudriavzevii* and their interspecific hybrid”. International journal of food Microbiology (2009).

Madigan Michael T, Martinko John M, Parker Jack. Brock, Microbiología de los microorganismos. Décima edición (2005).

Mejías Gladys M. “Estudio de la fermentación alcohólica en sistemas discontinuos”. Tesis. Universidad católica de Valparaíso (1990).

Miller Gail Lorenz. “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing Sugar”. Analytical chemistry. Vol 31 (1959).

Mohanty Sujit Kumar, Shuvasis Behera, Manas Ranjan Swain, Armes Chandra Ray. “Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia L.*) flowers by solid–state fermentation. Applied Energy (2009).

Neven Voca, Boris Varga, Tajana Kricka, Dusca Curic, Vanja Jurisic, Ana Martin. "Progress in ethanol production from corn kernel by applying cooking pre-treatment". *Bioresource technology* (2009).

Ramasamy Amutha y Paramasamy Gunasekaran. "Production of ethanol from liquefied cassava starch using Co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*". *Journal of bioscience and bioengineering* (2001).

Svetlana Nikkolic, Ljiljana Mojovic, Marica Rakin, Dusanka Pejcin. "Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cell of *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoideus*". *Fuel* (2009).

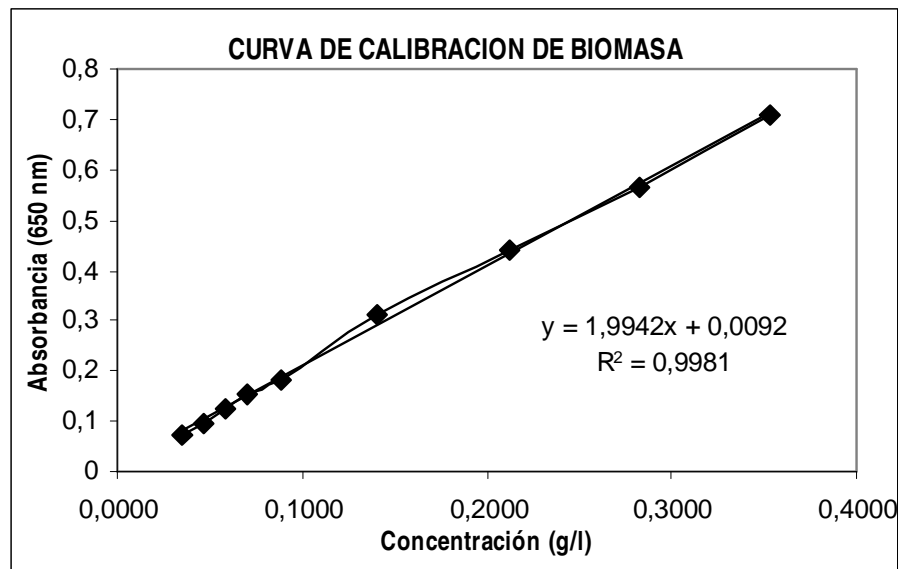
Scragg Alan H. "Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos" (1997)

Xin Qing Zhao, Feng wu Bai. "Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production". *Journal of Biotechnology* (2009).

ANEXO A

CURVA DE CALIBRACIÓN DE BIOMASA

BIOMASA(g/l)	ABSORBANCIA
0,0353	0,07
0,0471	0,097
0,0588	0,126
0,0707	0,151
0,0883	0,183
0,1413	0,312
0,2120	0,443
0,2826	0,565
0,3532	0,707



ANEXO B

PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE ETANOL

La productividad volumétrica de etanol se define como la máxima concentración de etanol alcanzada en un tiempo t.

$$Q_p = \frac{g/l}{h}$$

Ejemplo: en el medio de cultivo YPG la máxima concentración de etanol fue de 51,6237 g/l a las 25 horas de fermentación. Entonces,

$$Q_p = \frac{51,6237}{25} = 2,06g/l * h$$

ANEXO C

CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA

GLUCOSA(mg/ml)	ABSORBANCIA
0	0
0,1	0,071
0,2	0,153
0,3	0,232
0,4	0,272
0,5	0,396
0,6	0,465
0,7	0,564
0,8	0,615
0,9	0,701
1	0,754

