



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO

NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Estudio comparativo de la capacidad fermentativa entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red en la producción de etanol.

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ. Armando Varilla Mazaba

Asesores:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Dra. Elida Gastelum Martínez (CIATEJ)

H. Veracruz Ver.

23 Marzo 2018

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza para seguir adelante día a día.

A Lucero por su amor incondicional y por darme el mayor regalo que un hombre puede recibir.

A mis padres Rocio y Armando y a mi hermano Erick por su apoyo incondicionalmente a lo largo de toda mi trayectoria como estudiante y por nunca dejarme solo.

A mis abuelos Ángel & Gloria y Zenón & Olga que siempre me han dado los mejores consejos y nunca me han negado su apoyo incondicional.

A la Dra. Lupita por la ayuda para poder realizar este trabajo y por la confianza depositada en mi persona.

A mis amigos que conocí en el laboratorio de Bioingeniería Gabi, Danny, Rodolfo, Juan, y todos los demás.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para mis estudios de posgrado.

A la Dra. Lupita por la aportación en mi formación como profesionista y como ser humano.

Al Dr. Chema por recibirme en su laboratorio y a los chicos; Iván, David, Alicia y Estela por su gran apoyo.

A la Mtra. Dulce por apoyo durante mis actividades experimentales y su aportación en mi formación.

A todo el laboratorio de Bioingeniería.

RESUMEN

Varilla Mazaba Armando. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Marzo, 2018. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA ENTRE LAS LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 Y *Saccharomyces cerevisiae* ETHANOL RED EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. Asesores: Aguilar Uscanga, María Guadalupe, Torrestiana Sánchez Beatriz, Gastelúm Martínez Elida.

La fermentación alcohólica es la conversión de azúcares simples a etanol y CO₂ por la acción de microorganismos, principalmente levaduras, siendo las levaduras del género *Saccharomyces* las más utilizadas a nivel industrial. Este proceso ha sido ampliamente estudiado a lo largo de las últimas décadas. Pese a lo anterior, en la actualidad la industria alcoholera sigue presentando problemas en el proceso de fermentación, los cuales se ven reflejados en bajos rendimientos y productividades. Lo anterior se ha asociado principalmente a problemas de contaminación microbiológica, falta de control en la temperatura de fermentación y al grado de estrés al que las levaduras son sometidas debido a que a nivel industrial la fermentación se realiza en tanques abiertos empleando medios complejos con altas cantidades de sólidos disueltos. Por lo que el estudio de levaduras que sean capaces de crecer y producir etanol bajo las condiciones antes descritas resulta necesario para contar con procesos más eficientes. En este sentido, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 (cepa autóctona del ITVer) y *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red (cepa comercializada por la empresa Fermentis) han mostrado características deseables para su uso en proceso de producción de etanol a nivel industrial.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad fermentativa de estas dos levaduras para la producción de etanol, para ellos se evaluó la termotolerancia (30-40 °C), la osmotolerancia (100-250 g·L⁻¹), empleando medios industriales como melazas y miel intermedia "B", así mismo se realizaron estudios en jugo de sorgo dulce e hidrolizado del grano de cebada agotada (GCA) para verificar la

actividad fermentativa en medios complejos y por último se evaluó su capacidad fermentativa a nivel planta piloto.

Los resultados mostraron que ambas levaduras fueron capaces de crecer y mantener su capacidad fermentativa bajo el rango de temperaturas evaluado (30-40 °C), presentado una mayor producción de etanol *S. cerevisiae* ITV-01 y mayores rendimientos ($Y_{P/S}$) que *S. cerevisiae* ethanol Red. Respecto a la concentración de azúcares iniciales tanto *S. cerevisiae* Ethanol Red y *S. cerevisiae* ITV-01 fueron capaces de crecer y producir etanol sin afectar su actividad metabólica en un rango de concentraciones de 100-200 gL⁻¹, obteniendo *S. cerevisiae* ITV-01 mayores concentraciones de etanol y rendimiento. Respecto a la utilización de jugo de sorgo y el hidrolizado de GCA (medios ricos en nutrientes), las concentraciones rendimientos de etanol no presentaron diferencia alguna entre ambas levaduras. Por último las pruebas a nivel planta piloto revelaron que cuando los medios de fermentación son suplementado con (NH₄)₂SO₄ la producción de etanol se ve favorecida para ambas levaduras, manteniendo rendimientos ($Y_{P/S}$) de 0.48 g/g.

ABSTRACT

Varilla Mazaba Armando. Master of Science in Biochemical Engineering. Food Research and Development Unit of the Veracruz Institute of Technology. March, 2018. COMPARATIVE STUDY OF THE FERMENTATIVE CAPACITY BETWEEN *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 AND *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red IN ETHANOL PRODUCTION. Advisors: Aguilar Uscanga María Guadalupe, Torrestiana Sánchez Beatriz, Gastelúm Martínez Elida.

Alcoholic fermentation is the conversion of simple sugars to ethanol and CO₂ by the action of microorganisms, mainly yeasts, the genus *Saccharomyces* being the most used at the industrial level. This process has been widely studied throughout recent decades. At present, the alcohol industry continues to experience problems in the fermentation process, reflected in low yields and productivities. These problems have been associated mainly with microbiological contamination, lack of temperature control and the degree of stress to which the yeasts are subjected because industrial fermentation is carried out in open tanks using complex media with high amounts of dissolved solids. Therefore the study of yeasts able to grow and produce ethanol under the conditions described above is necessary to ascertain more efficient processes. *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 (an autochthonous ITVer strain) and *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red (a strain marketed by the Fermentis company) have shown desirable characteristics for their use in the industrial ethanol production process. The objective of this work was to study the fermentative capacity of these two yeasts for ethanol production; thermotolerance (30-40 °C) and osmotolerance (100-250 g•L⁻¹) using molasses and intermediate molasses "B" were evaluated. Studies were also conducted on sweet sorghum juice and hydrolyzed spent barley grain (SBG) to verify the fermentative activity in complex media. Finally, its fermentative capacity was evaluated at pilot plant level.

The results showed that both yeasts were able to grow and maintain their fermentative capacity at the evaluated temperature range (30-40 °C), *S. cerevisiae* ITV-01 presenting a higher ethanol production and higher yields ($Y_{P/S}$) than *S. cerevisiae* Ethanol Red. *S. cerevisiae* Ethanol Red and *S. cerevisiae* ITV-01 were able to grow and produce ethanol without affecting their metabolic activity in an initial sugar concentration range of 100-200 gL⁻¹, *S. cerevisiae* ITV-01 obtaining a higher ethanol concentration and yield. No difference between the two yeasts was

observed in ethanol yield concentrations with the use of sorghum juice and SBG hydrolyzate (nutrient-rich media). Finally, tests at the pilot plant level revealed that when fermentation media are supplemented with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ethanol production is favored for both yeasts, maintaining yields ($Y_{P/S}$) of 0.48 g/g and efficiencies of 90%.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 Biocombustibles.....	2
1.1.1 Bioetanol.....	3
1.1.2 Materias primas para la producción de etanol	5
1.1.2.1 Melazas	6
1.1.2.2 Miel Intermedia B.....	6
1.1.2.3 Jugo de caña de azúcar	8
1.2 Producción de etanol	9
1.2.1 Fermentación alcohólica	9
1.2.2 Producción de etanol	10
1.2.2.1 Modos de operación de reactores para la producción de etanol	10
1.2.2.1.1 Por lote (batch).....	11
1.2.2.1.2 Por lote Alimentado (fed-batch).....	11
1.2.2.1.3 Producción continua.....	11
1.2.2.2 Material Biológico (Levaduras)	12
1.2.2.3 Factores nutricionales.....	13
1.2.2.3.1 Carbono.....	15
1.2.2.3.2 Nitrógeno.....	15
1.2.2.3.3 Hidrógeno.....	15
1.2.2.3.4 Oxígeno.....	16
1.2.2.3.5 Sulfuro.....	16
1.2.2.3.6 Fósforo	16
1.2.2.3.7 Elementos minerales.....	17
1.2.2.3.8 Factores de crecimiento	18
1.2.2.4 Factores fisicoquímicos para el crecimiento	19

1.2.2.4.1	Temperatura.....	19
1.2.2.4.2	Agua.....	20
1.2.2.4.3	Oxígeno y pH del medio.....	22
1.2.3	Efectos de estrés en el crecimiento y producción de etanol.....	23
1.2.3.1	Estrés osmótico.....	24
1.2.3.2	Estrés térmico.....	25
1.2.3.3	Estrés a etanol.....	26
1.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.4.1	<i>S. cerevisiae</i> ITV-01.....	28
1.4.2	<i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red.....	30
2	JUSTIFICACIÓN.....	31
3.	OBJETIVOS.....	32
3.1	General.....	32
3.2	Específicos.....	32
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1	Material biológico.....	33
4.2	Medio de cultivo.....	33
4.2.1	Medio de conservación.....	33
4.2.2	Medio de activación.....	33
4.3	Condiciones para la fermentación.....	34
4.3.1	Precultivo.....	34
4.3.2	Fermentación alcohólicas por lote.....	34
4.3.2.1	Estudio del efecto de la temperatura.....	35
4.3.2.2	Evaluación del efecto de la concentración inicial de sustrato.....	35
4.3.2.3	Fermentación de jugo e hidrolizados.....	35
4.3.2.4	Validación y comparación a nivel planta piloto.....	36
4.4	Métodos analíticos.....	36
4.4.1	Cuenta celular.....	36
4.4.2	Análisis de biomasa.....	37
4.4.3	Viabilidad celular.....	38
4.4.4	Análisis de azúcares, etanol, glicerol y ácido acético.....	39
4.5	Análisis de datos experimentales.....	39
4.5.1	Rendimientos y productividades.....	39
4.5.2	velocidades globales.....	41

4.5.3 Velocidades específicas	42
4.6 Análisis estadístico de los datos.	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 Pruebas preliminares.	43
5.2 Evaluación del efecto de la temperatura.	44
5.2.1 Evaluación de la termotolerancia en melazas.....	44
5.2.2 Evaluación de la termotolerancia en miel B.	50
5.3 Evaluación del efecto de la concentración de azúcares iniciales.	55
5.3.1 Evaluación de la osmotolerancia en melazas.	55
5.3.2 Evaluación de la osmotolerancia en miel B.	60
5.4 Evaluación de la producción de etanol en jugos e hidrolizados.	66
5.5 Comparación a nivel planta piloto.	71
6 CONCLUSIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Tipo de procesamiento de biomasa y productos.....	3
Figura 1.2	Producción de bioetanol y biodiesel mundial.....	4
Figura 1.3	Producción de etanol en base a los principales productores.....	4
Figura 1.4	Demanda de etanol para el año 2025.....	5
Figura 1.5	Ruta metabólica para la producción de etanol.....	9
Figura 1.6	Aplicación biotecnológica de las levaduras en diversas épocas.....	13
Figura 1.7	Relación entre Ψ_w y μ	21
Figura 1.8	Comportamiento de la μ en levaduras con una disminución en la a_w	22
Figura 4.1	Distribución de la cámara de Thoma.....	37
Figura 4.2	HPLC Waters Alliance.....	39
Figura 5.1	Crecimiento de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en melazas a diferentes temperaturas.....	45
Figura 5.2	Consumo de azúcares de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en melazas a diferentes temperaturas.....	47
Figura 5.3	Producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en melazas a diferentes temperaturas.....	47
Figura 5.4	Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) a diferentes temperaturas en melazas.....	49
Figura 5.5	Crecimiento de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en miel B a diferentes temperaturas.....	50
Figura 5.6	Consumo de azúcares de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en miel B a diferentes temperaturas.....	52
Figura 5.7	Producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en miel B a diferentes temperaturas.....	52
Figura 5.8	Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) a diferentes temperaturas en miel B.....	54
Figura 5.9	Crecimiento de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	56

Figura 5.10	Consumo de azúcares de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	57
Figura 5.11	Producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	58
Figura 5.12	Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) a diferentes concentraciones de azúcares iniciales en melazas.....	59

Figura 5.13	Crecimiento de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	61
Figura 5.14	Consumo de azúcares de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	63
Figura 5.15	Producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	63
Figura 5.16	Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) a diferentes concentraciones de azúcares iniciales en miel B.....	65
Figura 5.17	Producción de etanol por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en jugo de sorgo dulce.....	67
Figura 5.18	Producción de etanol por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 (a) y <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red (b) en hidrolizado de grano de cebada agotada.....	69
Figura 5.19	Producción de biomasa en jugo de caña de azúcar a nivel planta piloto.....	72
Figura 5.20	Consumo de azúcares en jugo de caña a nivel planta piloto.....	74
Figura 5.21	Producción de etanol en jugo de caña a nivel planta piloto.....	74

LISTA DE TABLAS

		Pagina
Tabla 1.1	Clasificación para la producción de etanol.....	6
Tabla 1.2	Composición de la melaza.....	7
Tabla 1.3	Composición de la Miel intermedia B.....	8
Tabla 1.4	Composición del jugo de caña.....	9
Tabla 1.5	Elementos requeridos para las levaduras y su función.....	14
Tabla 1.6	Concentraciones óptimas de algunos cationes importantes para el crecimiento de levaduras.....	18
Tabla 1.7	Grupos de levaduras según su dominio térmico.....	20
Tabla 1.8	Clasificación de levaduras según sus propiedades fermentativas.....	23
Tabla 1.9	Efectos del estrés térmico en la fisiología de levaduras.....	26
Tabla 1.10	Efecto del estrés de etanol en la célula.....	27
Tabla 1.11	Respuesta de las levaduras al estrés de etanol.....	28
Tabla 4.1	Composición del medio de conservación.....	33
Tabla 4.2	Composición del medio de activación.....	34
Tabla 4.3	Tratamientos para la evaluación de la termotolerancia.....	35
Tabla 4.1	Tratamientos para la evaluación de la osmotolerancia.....	35
Tabla 5.1	Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para ambas levaduras en medio sintético.....	43
Tabla 5.2	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en melazas a diferentes temperaturas.....	46
Tabla 5.3	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en melazas a diferentes temperaturas.....	48
Tabla 5.4	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en miel B a diferentes temperaturas.....	51
Tabla 5.5	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en miel B a diferentes temperaturas.....	53

Tabla 5.6	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	56
Tabla 5.7	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	59
Tabla 5.8	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	62
Tabla 5.9	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.....	65
Tabla 5.10	Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de etanol a partir de jugo de sorgo dulce.....	66
Tabla 5.11	Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de etanol a partir de hidrolizado de grano de cebada agotada.....	70
Tabla 5.12	Comparación de la producción de etanol en diferentes medios.....	71
Tabla 5.13	Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de biomasa en jugo de caña a nivel planta piloto.....	73
Tabla 5.14	Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de etanol en jugo de caña a nivel planta piloto.....	75

INTRODUCCIÓN

La producción de etanol por vía fermentativa es uno de los procesos más antiguos en la historia de la biotecnología y esta se lleva a partir de la conversión de azúcares simples a etanol por la acción de microorganismos, principalmente levaduras. Sin embargo, en la actualidad el proceso de producción de etanol a nivel industrial aún requiere de mejoras, puesto que comúnmente existen problemas de inhibición por las altas concentraciones de sustrato y producto en los medios, así como la utilización de medios no estériles provocando generando bajos rendimientos y productividades.

Una solución a lo anterior es contar con levaduras capaces de producir etanol bajo las condiciones de estrés descritas anteriormente. En este sentido la levadura *S. cerevisiae* ITV-01 ha mostrado ser capaz de producir altas cantidades de etanol con altas concentraciones de sustrato, situándose así como una levadura de uso potencial para la industria.

En este trabajo se presenta el estudio comparativo de la capacidad fermentativa de la levadura *S. cerevisiae* ITV-01 con una levadura comercial de amplio uso en la industria etanolera (*S. cerevisiae* Ethanol Red) propiedad de la empresa Fermentis (Lafarge, Francia). Como inicio en este documento se presentan los antecedentes bibliográficos respecto a la producción de etanol y las características relevantes de las levaduras, seguido de la metodología utilizada para realizar este trabajo y para finalizar con los obtenidos resultados y las conclusiones finales.

1. ANTECEDENTES

1.1 Biocombustibles.

Actualmente el mundo está enfrentándose al agotamiento de los recursos energéticos, los cuales están basados principalmente en recursos no renovables, tales como el petróleo. De la misma forma el crecimiento urbano ha aumentado la demanda energética, forzando un consumo acelerado de éstos generando un déficit en materia energética a nivel mundial (Cardona y Sánchez, 2005).

Aunado a lo anterior, los problemas de contaminación siguen en continuo aumento, debido a las emisiones producidas por la generación y uso de combustibles fósiles, aumentando el nivel de gases de efecto invernadero en la atmósfera, siendo el Dióxido de Carbono (CO₂) el que se produce en mayor cantidad por la combustión de combustibles (Balat, Balat y Öz, 2008).

Una alternativa viable para mitigar la falta de combustibles y reducir la emisión de gases de efecto invernadero es el uso de biocombustibles, puesto que estos presentan ventajas ambientales sobre los combustibles fósiles, tales como una combustión más limpia y estos son obtenidos de recursos renovables (Quintero, *et al.*, 2007).

Los biocombustibles son combustibles líquido o gaseosos utilizados en el sector de transporte y comúnmente son producidos por biomasa, debido a que ésta ha sido considerada a nivel mundial como una fuente potencialmente atractiva para la generación de este tipo de combustibles. Las principales razones por las que la biomasa se considera como fuente atractiva son porque esta puede ser generada de manera sostenible a futuro, además presentan propiedades ambientales que pueden disminuir las emisiones netas de CO₂ y muy bajos contenidos de azufre y por último esto tiene un potencial económico significativo siempre y cuando el precio de los combustibles fósiles aumente (Demirbas, 2007).

La biomasa puede ser convertida a biocombustibles por dos rutas diferentes, por conversión termoquímica o por conversión bioquímica. En la Figura 1.1 se observa las

dos rutas para la conversión de la biomasa, así como los productos que pueden ser obtenidos respectivamente.

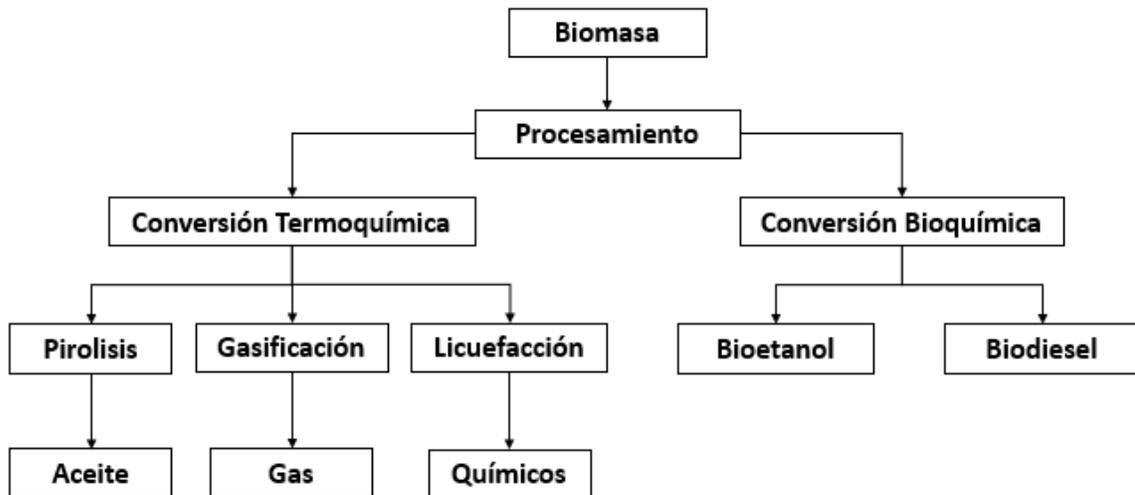


Figura 1.1 Tipos de procesamiento de biomasa y productos.
(Elaboración propia a partir de Faba, *et al.*, 2013)

1.1.1 Bioetanol

Los biocombustibles con una mayor producción en el mundo son el bioetanol y el biodiesel, puesto que a partir de la crisis del petróleo en los años 1980's surgen políticas energéticas que buscan nuevas alternativas al uso de combustibles derivados del petróleo. Actualmente el etanol ha sido el biocombustible con la mayor producción mundial, y este representa aproximadamente el 80 % de la producción de biocombustibles en el mundo (Renewable Energy Policy, 2012).

En la Figura 1.2 se muestra la producción mundial de bioetanol y biodiesel durante el período del 2000 al 2011 y en ella se puede observar que el bioetanol es el biocombustible con mayor producción a nivel mundial. Actualmente los principales productores de etanol a nivel mundial son los Estados Unidos y Brasil, seguidos por la Unión Europea, China y el resto de los países.

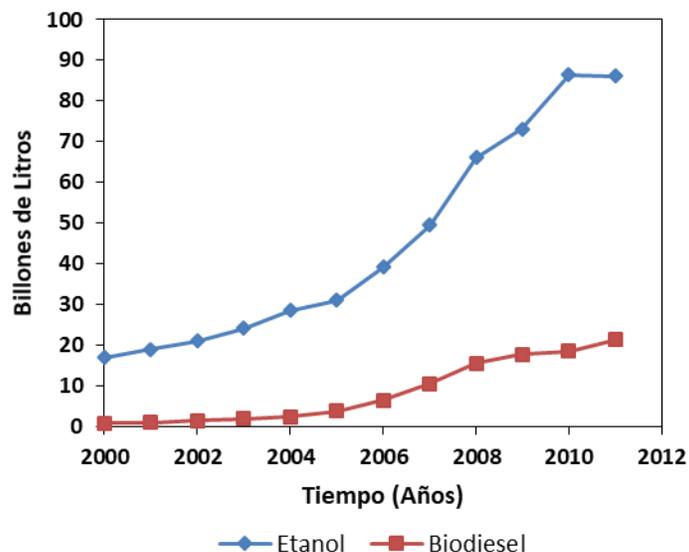


Figura 1.2 Producción de bioetanol y biodiesel mundial.
(Elaboración propia a partir de Renewable Energy Policy, 2012).

Lo ya mencionado con anterioridad se puede corroborar en la Figura 1.3, donde se muestra que los Estados Unidos y Brasil son los mayores productores de etanol en el mundo, manteniendo una superioridad en producción durante el periodo 2007-2015 respecto a países como China, Canadá, la Unión Europea y el resto del mundo.

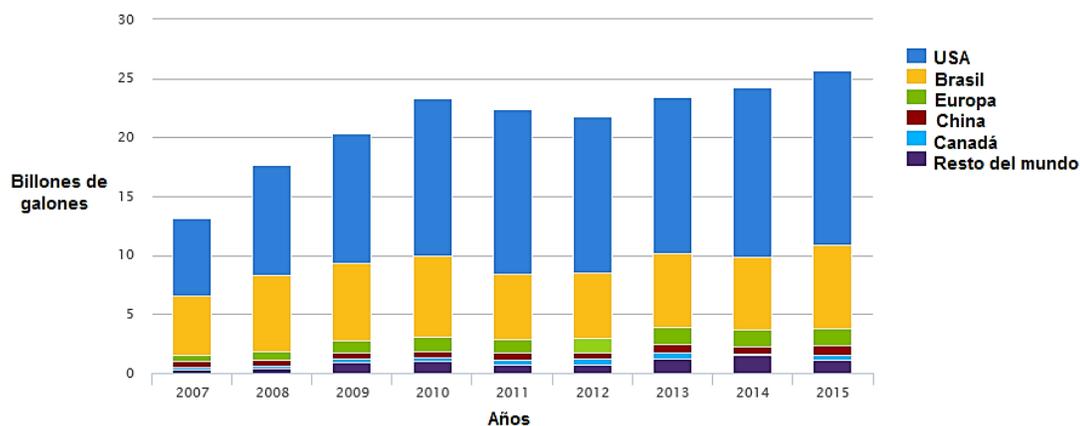


Figura 1.3 Producción de bioetanol en base a los principales productores.
(Renewable Energy Policy, 2012).

Por otro lado la producción de etanol en México en los últimos años ha venido en aumento mostrando un gran interés por empresas de alto nivel nacional, como el caso de Pemex, que ha lanzado una licitación en la cual se pretende llevar a cabo mezclas con gasolina en una concentración del 5.8 % v/v (E6). En esta licitación 6 empresas han obtenido el fallo de Pemex para poder vender este producto. De acuerdo con la SENER (2014) Pemex demandara aproximadamente más de 500 millones de litros para el año 2025 (Figura 1.4).

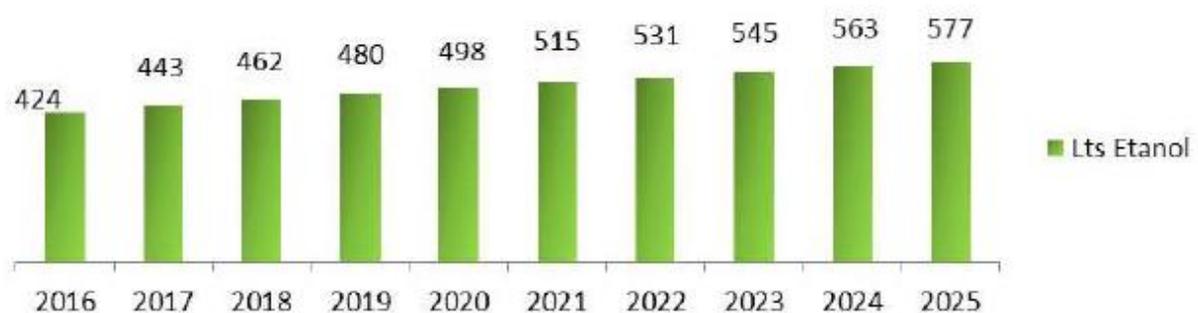


Figura 1.4 Demanda de etanol para el año 2025. (SENER, 2014)

Por lo que a la luz de lo anterior, es necesario mejorar la producción de etanol existente en el país y así mismo mejorar la tecnología ya existente para poder obtener procesos de mayor eficiencia.

1.1.2 Materias primas para la producción de etanol

La producción de etanol puede llevarse acabo de diversa materias primas y de acuerdo con el origen de la metería prima, la producción de etanol puede clasificarse en primera, segunda y tercera generación (Balat, Balat y Öz, 2008; Cardona y Sánchez, 2007). En la Tabla 1.1 se presentan las características más importantes de la primera y segunda generación, así como algunos ejemplos de materias primas que incluyen dichas clasificaciones.

Tabla 1.1 Clasificación para la producción de etanol.

Generación	Definición	Ejemplos
Primera	En esta categoría el etanol se produce a partir de materias primas que contengan azúcares simples y almidones. En este grupo se tiene la controversia de que algunas materias primas son utilizadas principalmente para consumo humano.	<ul style="list-style-type: none"> • Jugos de caña y sorgo • Mieles (melazas, Miel intermedia B) • Hidrolizados de almidón (Maíz, Papa, Yuca, etc.)
Segunda	Producción de etanol a partir de materiales lignocelulósico, los cuales se busca que sean principalmente materiales de deshecho.	<ul style="list-style-type: none"> • Madera • Bagazo de sorgo dulce y caña de azúcar • Paja (trigo, arroz, etc.)

(Elaboración propia a partir de Cardona y Sánchez, 2007)

1.1.2.1 Melazas

Actualmente en México la principal materia prima para la generación de etanol es la melaza. En la zafra del período 2008-2009 se produjeron 42.5 millones de toneladas de caña de azúcar, generando 4.9 millones de toneladas de azúcar de caña, y 1.5 millones de toneladas de melaza, de las cuales se utilizó el 3.6 % para la producción de etanol (García, *et al.*, 2011). La melaza es un jarabe denso y viscoso del cual ya no es posible cristalizar más azúcar. Se le denomina melaza al efluente final que se obtiene en la producción de azúcar mediante una cristalización repetida; esta es una mezcla compleja que contiene sacarosa, glucosa, fructosa, sales y otros compuestos solubles que normalmente solo se encuentran en el jugo de caña, además de los compuestos fermentables, también cuenta con sustancias reductoras no fermentables (Olbrich, 1963). En la Tabla 1.2 se muestra la composición de las melazas.

1.1.2.2 Miel Intermedia B

Por otra parte, la miel intermedia B al igual que las melazas es un subproducto obtenido de la producción de azúcar de caña, se obtiene a partir de la segunda etapa de

cristalización y centrifugación, así como también es más rico en azúcares fermentables (50-65%) que las melazas finales, este subproducto contiene vitaminas como son la riboflavina, tiamina y ácido pantoténico (Fernández-López, *et al*, 2012). En la Tabla 1.3 se muestra la composición.

Tabla 1.2 Composición de la melaza

Componentes	Constituyentes	Contenido (%p/p)
Mayores	Materia seca	7
	Proteínas	3
	Sacarosa	60-63
	Azúcares reductores	3-5
	Sustancias disueltas	4-8
	Agua	16
	Grasas	0.40
	Cenizas	9
Minerales	Calcio	0.74
	Magnesio	0.35
	Fósforo	0.08
	Potasio	3.76
Aminoácidos	Glicina	0.10
	Leucina	0.01
	Lisina	0.01
	Treonina	0.06
	Valina	0.02
Vitaminas	Constituyente	Contenido (ppm)
	Colina	600
	Niacina	48.86
	Ácido Pantoténico	42.90
	Piridoxina	44
	Riboflavina	4.40

(Elaboración propia a partir de Olbrich, 1963)

Tabla 1.3 Composición de la Miel intermedia B

Compuesto	%
Materia seca (sin azúcar)	18
Materia seca (azúcares)	56

Agua	17
Nx6.25	2
Cenizas	7
Biotina (mg/kg)	0.36
Colina (mg/kg)	74.5
Ácido Pantoténico (mg/kg)	21
Rivoflavina (mg/kg)	1.8
Tiamina (mg/kg)	0.9

(Elaboración propia a partir de Fernández-López, *et al*, 2012).

1.1.2.3 Jugo de caña de azúcar

El jugo de caña es obtenida a través del proceso de molienda y filtración-clarificación. La caña de azúcar es introducida a molinos de rodillos donde el jugo es extraído y el bagazo es roseado con agua para aumentar la eficiencia de extracción. Posteriormente pasa a un proceso de clarificación para separarla de impurezas, así como también una filtración para separar el jugo de la cachaza contenida en el lodo, gracias a la acción de filtros rotatorios del vacío (Sarmiento-Forero, 2011). La Tabla 1.4 muestra la composición del jugo de caña de azúcar, donde se observar el alto contenido de azúcares fermentables y el contenido de vitaminas importantes para el crecimiento de levaduras.

Tabla 1.4 Composición del jugo de caña.

Indicador	cantidad
pH	3.7-4.6
% de azúcares	30-36
Agua %	>20
Ceniza %	0.3-0.93
Biotina (mg/kg)	-----
Ácido Pantoténico (mg/kg)	1-3
Rivoflavina (mg/Kg)	0.1
Tiamina (mg/Kg)	0.2

(Elaboración propia a partir de Sarmiento-Forero, 2011)

1.2 Producción de etanol

1.2.1 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una ruta catabólica en la cual se dan reacciones de oxido-reducción para degradar azúcares simples hasta etanol. Primero los azúcares son convertidos a piruvato por medio de la glucólisis, posteriormente el piruvato es transformado a etanol en dos pasos, tal y como se observa en la Figura 1.5.

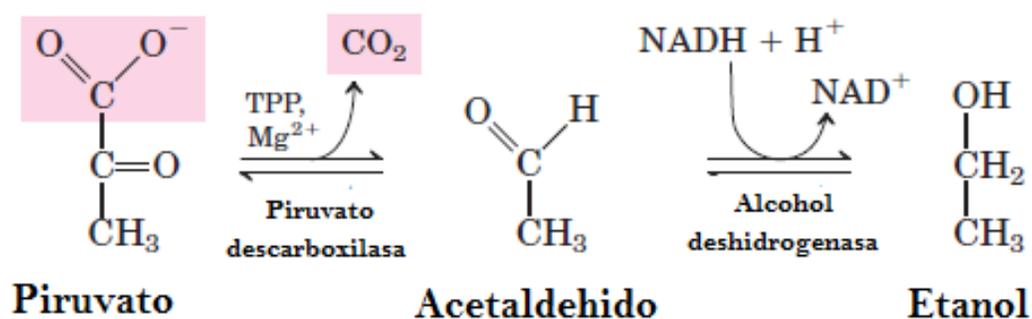


Figura 1.5 Ruta metabólica para la producción de etanol.
(Mathews, Van Holde y Ahern, 2002)

En el primer paso el piruvato es convertido a acetaldehído mediante una descarboxilación realizada por la enzima piruvato descarboxilasa, la cual requiere Mg^{+2} y está fuertemente unida a la tiamina pirofosfato (TPP), que actúa como una coenzima. En el segundo paso el acetaldehído es reducido a etanol por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa la cual utiliza $NADH + H^+$, el cual es previamente obtenido en la glucólisis en la deshidrogenación del gliceraldehido 3-fosfato. Como productos finales se obtiene etanol y CO_2 (Nelson y Cox, 2005; Mathews, Van Holde y Ahern, 2002).

1.2.2 Producción de etanol

El etanol puede ser obtenido por vía química y por vía fermentativa, siendo principalmente producido por vía fermentativa, puesto que la vía química se realiza a partir de derivados del petróleo, lo cual no es una opción viable debido al uso excesivo de este recurso.

La producción de etanol por vía fermentativa depende de varios factores físicos y químicos, los cuales influyen de manera directa en el rendimiento y la eficiencia de la producción de etanol. Algunos de estos factores son el modo de operación del reactor, el material biológico, medio de producción a emplear y las condiciones ambientales.

1.2.2.1 Modos de operación de reactores para la producción de etanol

La producción de etanol puede llevarse a cabo en tres formas diferentes en base al modo de operación del reactor, estas pueden ser en lote (batch), lote alimentado (feed-batch) y de forma continua. Cada una de estas formas de operación difiere principalmente en los flujos de entrada y salida presentes en el reactor. En las siguientes secciones estos modos de operación serán explicados a detalle.

1.2.2.1.1 Por lote (batch)

La producción por lote o discontinua de etanol es actualmente la más utilizada a nivel industrial. En este modo de operación el microorganismo inicia la fermentación en un medio de cultivo con una alta concentración de sustrato, con la finalidad de obtener altas concentraciones de producto al término del periodo de fermentación. El sistema por lotes presenta ciertas ventajas con respecto a los otros modos de operación, puesto que este no requiere un sistema de control riguroso, puede realizarse con mano de obra no clasificada, la esterilización y adaptación de las materias primas es fácil. Por otra parte este sistema también puede presentar algunas desventajas, tales como la inhibición del microorganismo por las altas concentraciones de sustrato o de producto en el medio, así como las bajas productividades obtenidas y por último la pérdida económica generado por el tiempo muerto de operación (Jan y Chaurasia, 2014; Chandel, *et al.*, 2007).

1.2.2.2 Por lote Alimentado (fed-batch)

La producción de etanol por lote alimentado es llevada a cabo mediante la adicción de medio fresco al reactor en periodos de tiempo intermitentes y esta es finalizada hasta que se llega a un volumen cercana al volumen total del reactor. Este sistema inicia por un sistema por lote previamente a la alimentación del medio fresco y a diferencia del modo de operación por lote, en este sistema se trabaja con bajas concentraciones de sustrato, con la finalidad de disminuir los efectos inhibitorios por los sustratos o producto. Con base a lo anterior en la fermentación por lote alimentado se pueden alcanzar mayores rendimientos y eficiencias en comparación con el proceso por lote (Jan y Chaurasia, 2014; Chandel, *et al.*, 2007; Laopaiboon, *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Producción continua

La producción continua de etanol es realizado mediante a adicción continua de medio fresco al fermentador, así mismo una corriente de medio agotado sale del fermentador hacia las posteriores etapas de recuperación del producto, de modo que en el

fermentador se mantiene un volumen constante, cabe mencionar que al igual que el proceso por lote alimentado también existe una etapa inicial por lote. Este modo de operación en comparación con el proceso en lote presenta algunas ventajas, tales como la disminución de efectos inhibitorios por sustrato o producto, presenta elevadas productividades y además el volumen de los reactores empleados en este sistema es más pequeño (Jan y Chaurasia, 2014; Chandel, *et al.*, 2007; Munnecke, 1981).

1.2.2.2 Material Biológico (Levaduras)

El mundo de las levaduras ha sido ampliamente estudiado en los últimos y a pesar de esto su comprensión no es del todo fácil. Las levaduras definidas como hongos unicelulares. Una definición más estricta representa a las levaduras como hongos ascomicetes y basidiomicetos que se reproducen vegetativamente por brotación o fisión y forman estados sexuales, los cuales no están encerrados en un cuerpo fructífero (Walker, 1998).

Las levaduras están siendo ampliamente utilizadas en diversos sectores de la industria, pues que anteriormente las levaduras solo se utilizaban en un campo muy limitado. Esto se observa en la Figura 1.6 analizando como ha evolucionado el uso de las levaduras a nivel industrial.

Actualmente las levaduras están siendo ampliamente estudiadas en la producción de etanol, ya que estas son parte fundamental para alcanzar procesos con alta eficiencia y existen diversos factores que pueden afectar el desempeño para la producción de etanol (Gutt y Gutt, 2009; Lin, *et al.*, 2012; Fakruddin, *et al.*, 2012)

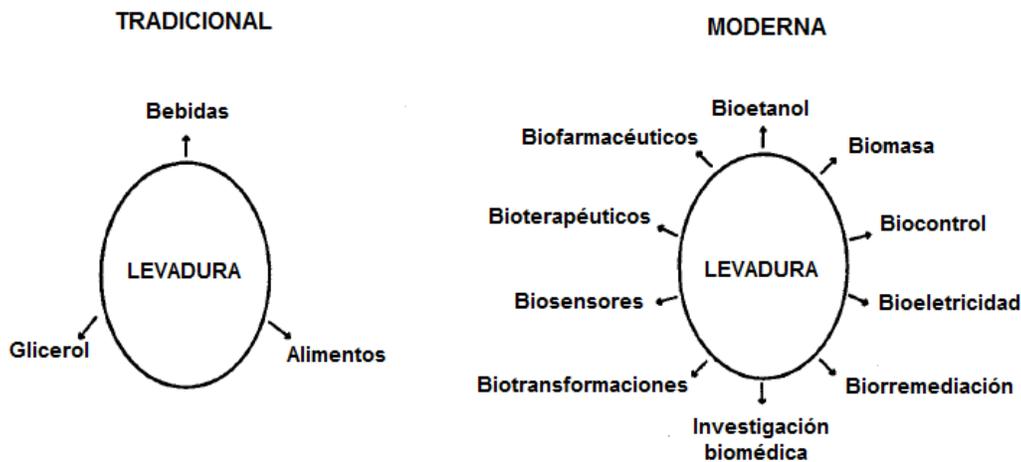


Figura 1.6 Aplicación biotecnológica de la levaduras en diversas épocas. (Walker, 1998)

1.2.2.3 Factores nutricionales

Durante el crecimiento de las levaduras existen diversos requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo sus funciones vitales de manera adecuada. Para la producción de etanol la generación de biomasa es un factor de importancia, puesto que el etanol es un metabolito primario, es decir, es un producto asociado al crecimiento del microorganismo.

Durante un análisis realizado por Berry (1998) a 100 mg de levadura seca para panificación, se encontró que la formulación química era la siguiente:



Ec. 1

Esta fórmula tiene un valor limitante, puesto que esta puede variar de acuerdo del tipo de levadura y las condiciones de crecimiento que se empleen. Pese a lo anterior esto muestra claramente que las levaduras están compuestas principalmente de elementos como carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, sulfuros, potasio y magnesio. Las levaduras adquieren estos elementos de su entorno de crecimiento a partir de

fuentes de alimentación sencillas. En la Tabla 1.5 se puede observar algunos de los diferentes elementos requeridos en las levaduras.

Tabla 1.5 Elementos requeridos para las levaduras y su función.

Elemento	Fuente común	Función celular
Carbono	Azúcares	Elemento estructural importante en la célula junto con el nitrógeno, hidrógeno y oxígeno. El catabolismo de estos genera energía.
Hidrógeno	Protones de la acides ambiental	Genera la fuerza impulsora para el bombeo de protones transmembrana. Mantenimiento del pH ácido intracelular para mantener funciones metabólicas.
Oxígeno	O ₂ o aire	Sustrato para la respiración y otros reacciones enzimáticas oxidativas. Importante para la síntesis de ergosteroles y ácidos grasos insaturados.
Nitrógeno	Sales de NH ₄ ⁺ , Urea y Amonio.	Estructural y funcionalmente como nitrógeno orgánico en proteínas y enzimas.
Fósforo	Fosfatos	Transducción de energía, ácidos nucleicos y estructura de la membrana.
Potasio	Sales de K ⁺	Balance iónico y actividad enzimática.
Magnesio	Sales de Mg ²⁺	Actividad enzimática y estructura de la célula y organelos.
Sulfuros	Sulfatos y Metionina	Aminoácidos y vitamina.
Calcio	Sales de Ca ₂₊	Posible segundo mensajero en señales de transducción.
Cobre	Sales cúpricas	Pigmentos Redox.
Fierro	Sales férricas	Hemoproteinas y citocromos.
Manganeso	Sales de Mn ²⁺	Actividad enzimática.
Zinc	Sales de Zn ²⁺	Actividad enzimática.
Níquel	Sales de Ni ²⁺	Actividad Ureasa.
Molibdeno	Na ₂ MoO ₄	Metabolismo de los nitratos y Vitamina B12.

(Elaboración propia a partir de Wlaker,1998)

1.2.2.3.1 Carbono

Las levaduras son organismo quimioorganotróficos porque obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos. Los azúcares son las principales fuentes de obtención de carbono y la glucosa generalmente es la más utilizada, no obstante este no puede ser metabolizado adecuadamente por todas las levadura, debido a que la glucosa no es carbohidrato simple que se encuentre de manera libre en la naturaleza, es decir, que normalmente los carbohidratos presentes en la naturales son más complejos (Polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos). Aunado a esto la glucosa presenta efecto de represión e inhibición en la asimilación de otros azúcares para las levaduras (Walker, 1998).

1.2.2.3.2 Nitrógeno

El nitrógeno es un componente muy importante de la célula, en las levaduras aproximadamente éste representa un 10 % de su peso seco. A nivel celular este componente es utilizado para la síntesis de macro y micro moléculas, tales como; aminoácidos, purinas, pirimidinas y aminas. El nitrógeno puede ser suministrado a la célula de diversas fuentes, siendo las sales de amonio las mayormente utilizadas. El compuesto más utilizado como fuentes de nitrógeno en medios de crecimiento para las levaduras es el sulfato de amonio, puesto que no solo provee a la célula de nitrógeno, sino al mismo tiempo sirve como una fuente de sulfuros (Walker, 1998).

1.2.2.3.3 Hidrógeno

El hidrogeno se encuentra presenta en las macromoléculas de las levaduras y está disponible en los carbohidratos y otras fuentes. Los iones H^+ son de suma importancia para la fisiología de la célula, puesto que ayudan al mantenimiento del pH intracelular y extracelular. Normalmente las levaduras crecen en pH entre 4-6, pero algunas levaduras son capaces de crecer en pH entre 2-8. Por otra parte la producción de etanol tiende a ser sensible a los cambios de pH (Walker, 1998).

1.2.2.3.4 Oxígeno

Las levaduras son organismo incapaces de crecer en ausencia total del oxígeno, puesto que este es un requerido compuesto para el crecimiento celular en el metabolismo respirativo (el oxígeno es aceptor final de electrones), además el oxígeno es un compuesto de suma importancia para la síntesis de esteroides y de ácidos grasos insaturados. De manera más específica el oxígeno es requerido para la actividad oxidasa de función mixta para la conversión del 2-3-epóxido de escualeno a lanosterol. Es importante resaltar que el oxígeno es un compuesto poco soluble en agua y que a lo largo de los años se han llevado a cabo prácticas para aumentar la eficiencia de su dispersión en medios acuoso. Cabe mencionar que el oxígeno a altas concentraciones puede ser inhibitorio para el crecimiento celular (Walker, 1998).

1.2.2.3.5 Sulfuro

El contenido de sulfuros en las levaduras es aproximadamente de un 0.3 % de sus pesos seco, y este es principalmente utilizado para la biosíntesis de aminoácidos que contengan sulfuros. Los sulfuros pueden ser tomados del medio de cultivo a través de compuestos sulfurados tales como; sulfatos, sulfitos, tiosulfatos, metionina o glutamina (Walker, 1998).

1.2.2.3.6 Fósforo

El fósforo es un componente que se encuentra en la célula en un porcentaje que oscila entre el 3-5 % de su peso seco y la mayor parte de este se encuentra en forma de ortofosfato (el H_2PO_4 actúa como un sustrato y como un efecto de varias enzimas, así como se ve involucrado en la transducción de energía). El fosfato es un componente importante, pues es usado para la biosíntesis de ácidos nucleicos y parte fundamental en la estructura de los fosfolípidos, los cuales son parte básica de la estructura de la membrana celular. Para las levaduras que poseen un efecto Crabtree

a corto plazo, la realización de un pulso de glucosa genera que los niveles de fosfato intracelular aumenten de manera drástica (Walker, 1998).

1.2.2.3.7 Elementos minerales

Las levaduras al igual que otras muchas células requieren de ciertos minerales para su crecimiento. Estos principalmente tienen funciones metabólicas o estructurales. El K^+ es utilizado principalmente para generar un ambiente catiónico metálico en la célula y se encuentra en un relación 1-2 % del peso seco de la célula. El Mg^{2+} es un compuesto que se utiliza como cofactor en diversa reacciones enzimáticas y éste se encuentra en la célula en una relación de 0.3 % en su pesos seco. Por otro lado, el Fe^{2+} es utilizado principalmente como en las proteínas del grupo hemo y en los citocromos. Además de los elementos minerales ya mencionados, también se encuentra otros minerales en la célula, tales como; Mn, Ca, Zn, Cu, Ni, Co y Mo. En la Tabla 1.6 se puede observar las concentraciones en las que estos iones se encuentran en la célula (Walker, 1998).

Tabla 1.6 Concentración óptima de algunos cationes importantes para el crecimiento de levaduras.

Catión	Concentración (μM)
H⁺	1 (pH 6)
K⁺	2-4
Mg²⁺	2-4
Mn²⁺	2-4
Ca²⁺	<
Cu²⁺	1.5
Fe²⁺	1-3
Zn²⁺	4-8
Ni²⁺	10-90
Mo²⁺	1.5
Co²⁺	0.1
B⁺	0.4

(Elaboración propia a partir de Walker, 1998)

1.2.2.3.8 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son compuesto orgánicos requeridos en bajas concentraciones para llevar a cabo funciones catabólicas específicas o estructurales en levaduras y estos no son utilizados como fuentes de energía. Los factores de crecimiento más utilizados son Vitaminas (biotina, tiamina y piridoxina), purinas y pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides y otros componentes (poliaminas, colina, etc.). Usualmente cuando se dice que una levadura requiere un factor de crecimiento, esto indica que la levadura no puede sintetizar este compuesto. *Saccharomyces cerevisiae* usualmente utiliza como factores de crecimiento a la biotina, ácido pantoténico, inositol y tiamina (Walker, 1998).

1.2.2.4 Factores fisicoquímicos para el crecimiento

Las Levaduras prefieren para su crecimiento ambientes cálidos, húmedos, ácidos, aerobios y que existe una fuente que proveedora de azucare. De modo que para el empleo de levaduras a nivel industrial es de suma importancia prestar atención a estos factores.

1.2.2.4.1 Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes en el crecimiento de microorganismo. La mayoría de las levaduras de laboratorio e industria usualmente crecen en un rango de temperaturas entre 20-30 °C. Las levaduras exhiben tres temperaturas características; la temperatura mínima (T_{\min}), la temperatura óptima (T_{opt}) y la temperatura máxima (T_{\max}). Para *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado T_{\max} en un rango de 30-35 °C (Torija, *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha observado que la T_{\max} no solo depende de la especie, puesto que ésta también depende de las condiciones de crecimiento empleadas, por ejemplo, la influencia de la fuente de carbono, la disponibilidad de oxígeno, la medición del potencial de agua y la presencia de etanol. Las levaduras pueden ser agrupadas de una manera diferente con respecto a otros microorganismos según el dominio térmico para su crecimiento. En la Tabla 1.7 se observa la clasificación de las levaduras, en donde podemos encontrar tres grupos; Psicófilos, mesófilos y termófilos (Walker, 1998).

Tabla 1.7 Grupos de levaduras según su dominio térmico.

Dominio Térmico	Definición	Ejemplo
Psicrofilo	Levaduras capaces de crecer en un rango de temperatura entre 5-18 °C.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leucosporidium spp.</i> • <i>Torulopsis spp.</i>
Mesofilo	Levaduras con un crecimiento entre 0 °C hasta 48 °C.	La mayoría de las especies de levaduras
Termofilos	Levaduras con T_{min} para el crecimiento mayor a 20 ° C.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida slooffii</i> • <i>Cyniclomyces guttulatus</i> • <i>Saccharomyces telluris</i> • <i>Torulopsis bovina</i>

(Elaboración propia a partir de Walker, 1998)

1.2.2.4.2 Agua

Al igual que todos los microorganismos las levaduras necesitan del agua en altas concentraciones para poder llevar a cabo sus funciones de crecimiento y metabolismos de manera adecuada. El agua es un factor muy importante para la actividad enzimática, puesto que los sustratos y enzimas (extracelulares) se encuentran en medios acuosos.

Usualmente durante las fermentaciones a nivel industrial se utilizan medio de fermentación (jugos, mieles diluidas, hidrolizados, etc.) con una alta cantidad de sólidos disueltos, por lo que el término de potencial de agua (Ψ_w , en unidades de MPa) es un utilizado para hacer referencia a energía potencial del agua, es decir, la cantidad de agua disponible en presencia de sólidos disueltos. El potencial de agua puede ser calculado a partir del valor de la actividad de agua del medio (a_w), en base a la Ecuación 2. De manera que lo anterior, está directamente relacionado con la presión osmótica del medio en la que crecen las levaduras (Walker, 1998).

$$\Psi_w = \frac{RT}{v_w} \ln(a_w)$$

Ec. 2

El agua pura tiene un valor $\Psi_w = 0$ MPa, mientras que el agua mariana presenta un valor de $\Psi_w = -2.5$ MPa. Al igual que en el caso de la temperatura el Ψ_w presenta diferentes valores, es decir, un mínimo, óptimo y máximo (Ψ_{wmin} , Ψ_{wopt} , Ψ_{wmax}). En la Figura 1.7 se representa un gráfico de Ψ_w Vs μ , de manera que el Ψ_{wopt} se obtiene en el punto que se alcanza el mayor valor de μ .

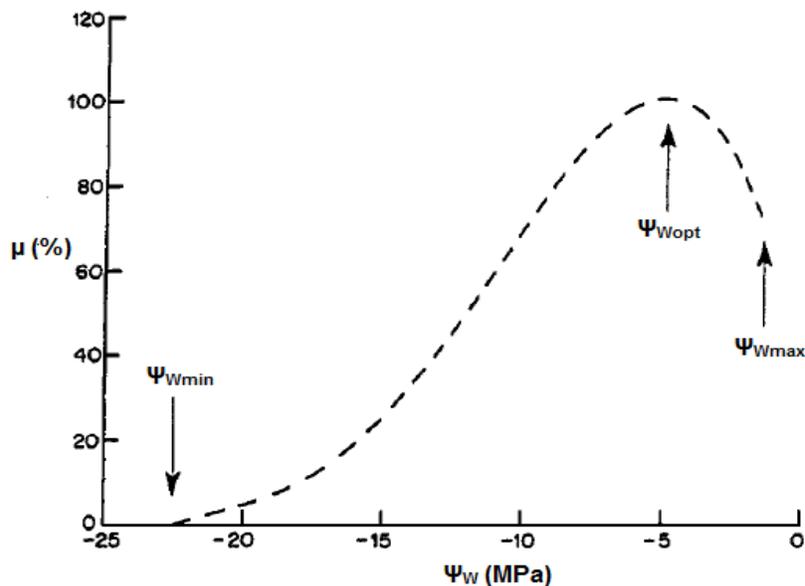


Figura 1.7 Relación entre el Ψ_w y μ .
(Walker, 1998)

Las levaduras también pueden ser clasificadas en base su resistencia o sensibilidad a crecer en medios con una alta concentraciones de sólidos, dentro de esta clasificación se tienen tres categorías; las levaduras osmosensibles, las osmofilas y las osmotolerantes. En la Figura 1.8 se puede ver la relación que existe entre la a_w y la μ para cada uno de los tres tipos de comportamiento según su resistencia a los bajos valores de a_w .

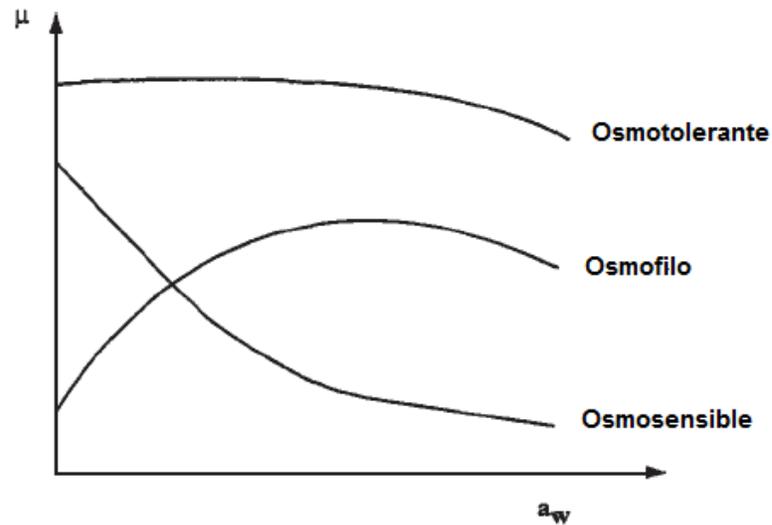


Figura 1.8 Comportamiento de la μ en levaduras con una disminución en la a_w . (Walker, 1998)

1.2.2.4.3 Oxígeno y pH del medio

El pH del medio tiene un papel muy importante en el crecimiento de las levaduras, con respecto a los valores óptimos de pH para el crecimiento, estos se encuentran en un rango de 4.5-6.5, y son muy pocas las levaduras que pueden crecer fuera de estos valores de pH. Por otra parte, la acidificación de un medio de cultivo con un ácido orgánico tiende a tener un efecto de mayor inhibición que con un ácido inorgánico, puesto que un ácido orgánico no disociado puede disminuir el pH intracelular seguido de una translocación de la membrana plasmática de las levaduras (Walker, 1998; Verduyn, 1992).

Por otra parte, como se comentó anteriormente el oxígeno no solo es utilizado en la célula como aceptor final de electrones, si no también es importante en la biosíntesis de compuestos de importancia para el crecimiento celular. En las levaduras el metabolismo de los carbohidratos se ve seriamente influenciado por el oxígeno y la disponibilidad de azúcares, de manera que el metabolismo de carbohidratos ha sido separado en ciertos grupos de acuerdo a los fenómenos de regulación. Las levaduras

también son agrupadas en diversos grupos de acuerdo a sus propiedades fermentativas y sus respuestas al crecimiento según su respuesta al oxígeno. En la Tabla 1.8 se muestra esta agrupación.

Tabla 1.8 Clasificación de levaduras según sus propiedades fermentativas.

Clase	Ejemplos	Comentario
Obligatoriamente fermentativas	<i>Candida pintolopesii</i> (<i>Saccharomyces telluris</i>)	Naturalmente ocurre en levaduras con déficits respiratorio
Facultativamente fermentativas		Estas levaduras fermentan medio con altos contenidos de azúcares en presencia de oxígeno.
<ul style="list-style-type: none"> • Crabtree (+) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 	
<ul style="list-style-type: none"> • Crabtree (-) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida utilis</i> 	Estas levaduras no generan etanol bajo condiciones aeróbicas y no crecen en condiciones anaeróbicas.
No fermentativas	<i>Rhodotorula rubra</i>	No producen etanol en presencia o ausencia de oxígeno.

(Elaboración propia a partir de Walker, 1998)

1.2.3 Efectos de estrés en el crecimiento y producción de etanol.

Durante la fermentación alcohólica las levaduras están expuestas a diversos factores de estrés que influyen sobre el crecimiento y la producción de etanol negativamente. Éstos factores de estrés son provocados por las condiciones a las cuales son realizadas la fermentación, a nivel industrial las fermentaciones se llevan a cabo en tanques expuestos al aire libre con medios complejos no estériles, los cuales contiene altas concentraciones de azúcares con la finalidad de tener una mayor concentración de etanol en el medio al finalizar el periodo fermentativo. Además de esto los tanques de fermentación no poseen un control riguroso de temperatura y en algunos casos no lo presentan, esto con la finalidad de disminuir los costos del proceso en el enfriamiento

de los tanques. A la luz de lo anterior, la levadura durante el proceso se ve obligada a trabajar en medios con altas con altas temperaturas debido a que no estricto un control riguroso de ésta, con presiones osmóticas debido a la gran cantidad de solidos disueltos, aunado a esto, la levadura tiene que competir por el sustrato con microorganismos ajenos a la fermentación, tales como bacterias lácticas y acéticas, y por ultimó la levadura de tolerar altas concentraciones de etanol, puesto que para que la fermentación alcohólica a nivel industrial sea eficiente es necesario tener concentraciones en un rango del 9-15 % v/v en el mosto (Muhktar, *et al.*, 2010; Souza, *et al.*, s.f.).

En base a lo anterior, las levaduras deben poseer ciertas características para poder llevar a cabo procesos de producción de etanol con altas productividades y eficiencias. Dichas características son enlistadas a continuación:

- Ser de fácil propagación.
- Estable genéticamente.
- Fermentación eficiente y rápida.
- Poseer actividad Killer.
- Producir bajas cantidades de calor durante la fermentación.
- Ser osmotolerantes.
- Ser termoresistentes.
- Tolerar altas concentraciones de etanol.
- Poseer actividad en un amplio rango de pH.

1.2.3.1 Estrés osmótico

La osmotolerancia es la capacidad que presentan algunas levaduras a crecer en medio con una alta concentración de solidos disueltos (azúcares y sales), de manera que al a_w se ve disminuida en el medio, lo que genera bajos valores de Ψ_w . Las levaduras que se encuentran en medios con bajas a_w son expuestas a condiciones de estrés

osmótico, que por lo general causan cambio principalmente en la morfología y metabolismos de las células (Walker, 1998).

Cuando una levadura es transferida de un medio a otro con una menor a_w que el anterior, ésta sufre un choque hiperosmótico, de manera que el agua intracelular de pasa al medio exterior, generando un reducción en el tamaño de la célula. Por otra parte el efecto contrario lo anterior es conocido como choque hipoosmótico (Walker, 1998; Folch-Mallol, *et al.*, 2004).

La respuesta de las levaduras al estrés osmótico está dada principalmente por un aumento en la concentración intracelular de trehalos y polioles (glicerol, arabitol, sorbitol, manitol) y la eliminación de iones nocivos para el crecimiento. Los polioles son compuestos osmoreguladores que pueden remplazar el agua de manera adecuada en la célula para mantener la actividad metabólica, el glicerol el uno de los polioles más comunes (Walker, 1998; Folch-Mallol, *et al.*, 2004; Bosso, Bosso y Rocha, 2011).

1.2.3.2 Estrés térmico

La termotolerancia se define como la capacidad de las levaduras a sobrevivir a altas temperaturas (Walker, 1998). El daño en la levaduras generado por el estrés térmico, se dan principalmente en la ruptura de los puentes de hidrogene y las interacciones hidrofóbicas, dando como resultado la desnaturalización de la proteínas y ácidos nucleicos. En la Tabla 1.9 se resume los efectos del estrés térmico en la célula como respuesta al estrés térmico las levaduras inducen la producción de proteínas de choque térmico (Hsps), así mismo se da la acumulación de compuestos protectores como el glicerol, trehalosa y algunas enzimas (catalasa y superoxido dismutasa mitocondrial) (Walker, 1998 y Iwahashi *et al*, 1995).

Tabla 1.9 Efectos del estrés térmico en la fisiología de levaduras.

Función	Efecto
Viabilidad	A temperaturas superiores a las T_{max} para cada una de especie, la velocidad de muerte se vuelve exponencial.
Morfología general	La célula aumenta su tamaño.
Estructura de la membrana plasmática	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la fluidez de la membrana y se da un disminución de la permeabilidad de los nutrientes esenciales. El ergosterol es conocido por aumentar la termoestabilidad. • Disminuyen los ácidos grasos insaturados en la membrana. • Disminuye el pH intracelular.
Función mitocondrial	Disminuye la actividad respiratoria y se induce a mutantes con déficit respiratorio.
Metabolismo intermedio	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento en la concentración de trehalosa. • Inhibición de la respiración y la fermentación arriba de T_{max}.
Síntesis de proteína	Represión de la síntesis de algunas proteínas pero se induce ciertas proteínas de choque térmico.
Función cromosómica	Se aumente la frecuencia de las mutaciones.

(Elaboración propia a partir de Walker, 1998)

1.2.3.3 Estrés a etanol

El etanol es un compuesto altamente inhibitorio para el crecimiento de los microorganismos, pese a que las levaduras generan este compuesto como principal producto de su metabolismo fermentativo, estas pueden ser gravemente afectadas por el etanol. El efecto de inhibitoria que el etanol genera, afecta principalmente el crecimiento, la viabilidad celular y la velocidad de fermentación (Walker, 1998, D' Amore y Stewart, 1987).

En la Tabla 1.10 se representa de manera más detallada los efectos inhibitorios del etanol en la célula.

Tabla 1.10 Efectos del estrés de etanol en la célula.

Función fisiológica	Influencia del etanol
Viabilidad y crecimiento celular.	<ul style="list-style-type: none"> • Genera inhibición del crecimiento, división y viabilidad celular. • Disminuye el volumen de la célula. • Inducción de transiciones morfológicas • Mejora la muerte térmica.
Metabolismo intermedio y de biosíntesis de macromoléculas	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización de proteínas intracelulares y enzimas glucolíticas. • Bajas velocidades de acumulación de RNA y proteínas. • Reducción de la V_{max} de las principales enzimas glucolíticas. • Mejora la mutación de péptidos. • Inducción de proteínas de choque térmico. • Incrementa los radicales libre de oxígeno. • Incrementa la síntesis de citocromo P450.
Estructura y función de membrana	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de la composición de ácidos grasos y esteroides. • Incrementa la permeabilidad iónica. • Inhibición del consumo de nutrientes. • Inhibición de la fuerza motriz de la ATP sintetasa. • Hiperpolarización de la membrana plasmática.

(Elaboración propia a partir de Walker, 1998).

Las Levaduras que presentan tolerancia a etanol responden a este tipo de estrés, llevando a cabo un cierto número de adaptaciones fisiológicas, generando agentes protectores a etanol (Walker, 1998, D' Amore y Stewart, 1987). Éstas diversas adaptaciones son enlistadas en la Tabla 1.11.

Tabla 1.11 Respuesta de las levaduras al estrés de etanol.

Adaptaciones fisiológicas

- Disminución de los ácidos grasos saturados en la membrana (ácido palmítico)
- Incremento de los ácidos grasos insaturado en la membrana (ácido oleico).
- Aceleración de la síntesis de escualeno y ergosterol.
- Mejoramiento de la biosíntesis de fosfatidilinositol.
- Mejoramiento de la actividad peróxido dimutasa mitocondrial.
- Aumento de los niveles de trehalosa celular.
- Estimulación de la síntesis de proteínas de estrés.
- Incrementa la síntesis de citocromo P450.

(Elaboración propia a partir de Walker, 1998).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ha sido la levadura más estudiada a lo largo de los últimos años para la producción de etanol y es ampliamente utilizada como levadura de panificación y en la producción de bebidas alcohólicas (Bai, Anderson y Moo-Young, 2008; Folch-Mollol, *et al*, 2004)

1.4.1 *S. cerevisiae* ITV-01

Saccharomyces cerevisiae ITV-01 es una cepa autóctona aislada a partir de melazas de caña de azúcar de la región de Veracruz y selección de 103 cepas por Ortiz-Zamora (2006) en base a su rendimiento de etanol, su osmotolerancia, tolerancia a etanol y actividad killer.

Por otro parte, en el 2008 Campos evaluó el uso de diferentes tamaños de inóculo, encontrando que 6×10^6 cel/mL es el tamaño de inóculo adecuado para promover la producción de etanol. Así mismo, realizó la comparación de *S. cerevisiae* ITV-01 con cepa comercial (*S. cerevisiae* 493EDV), empleando sacarosa, jugo de caña y miel intermedia B en concentraciones de 70 y 130 g/L y a diferentes temperaturas (25, 30,

35 °C) y el pH (4,5 5.0 y 5.5), encontrando que la cepa ITV-01 presentó los mejores rendimientos y producciones de etanol.

En el 2011 Fernández-López estudió la producción de etanol con ITV-01 utilizando como materia prima miel intermedia B con una concentración de azúcares iniciales entre 70-291 g/L, encontrado que las mejores condiciones para la producción de etanol fueron a 220 g/L de azúcares iniciales, un tamaño de inóculo de 6×10^6 cel/mL y pH de 5.5, dando como resultado rendimiento de etanol de 0.40 g/g, concentraciones de etanol de 85 g/L y una productividad de 3.8 g/L*h.

La producción de etanol a partir de hidrolizados de bagazo de caña suplementados con miel Intermedia B fue estudiada por Gutiérrez-Rivera (2015), así como la evaluación del monocultivo y cocultivo de *S. cerevisiae* ITV-01 con *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, encontrando que la mejor relación para la producción de etanol era 50 % de hidrolizado de bagazo de caña adicionado con 8 % de miel intermedia B, además encontró que la utilización de un sistema de cocultivo mejora la producción de etanol.

En 2010 Ortiz-Muñiz realizó la evaluación de *S. cerevisiae* ITV-01 en medio sintético, utilizando cuatro diferentes concentraciones de azúcares iniciales, así mismo evaluó el efecto de la temperatura y del pH, encontrando que las mejores condiciones para la producción de etanol fueron a 30 °C, un pH de 3.5 y una concentración de azúcares iniciales de 150 g/L. además evaluó la tolerancia a etanol y encontró que la cepa es capaz de crecer con concentraciones de etanol al 10 % v/v.

Por último 2017 Partida-Sedas encontró las mejores condiciones para la producción de etanol a partir de jugo de sorgo dulce e hidrolizado de bagazo de sorgo dulce utilizando *S. cerevisiae* ITV-01, así mismo evaluó el efecto de la adición de nutrientes al medio sin encontrar diferencia alguna.

En base a lo anterior *S. cerevisiae* ITV-01 es una levadura que posee características que la colocan como una levadura de interés industrial con un gran potencial para la producción de etanol industrial.

1.4.2 *S. cerevisiae* Ethanol Red

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red es una cepa comercial producida por la empresa Lاسaffre (Francia). Ésta levadura es la más utilizada a nivel industrial por ingenios y alcoholeras para la producción de etanol en México. *S. cerevisiae* Ethanol Red es ampliamente utilizada en hidrolizados de almidón a partir de maíz (principal materia prima en Estados Unidos) y en México es ampliamente utilizada en melaza de caña de azúcar.

Devantier, *et al.* (2004) reportó la producción de etanol a partir de un hidrolizado de maltodextrina con una concentración de 280 gL⁻¹ alcanzando 118 gL⁻¹ de etanol y un rendimiento 0.41 gg⁻¹, mostrando así su capacidad de producir etanol a altas concentraciones de azúcares iniciales (osmótorelancia).

Por otra parte, Iman y Capárade (2011) estudiaron la producción de etanol en jugo de sorgo dulce con una concentración de azúcares iniciales en un rango de 140-148 gL⁻¹, generando etanol a una concentración máxima de 65 gL⁻¹ con rendimientos superiores al 0.48 gg⁻¹.

Por último la producción de etanol por lote a partir de melaza de caña de azúcar fué reportada por Barbosa, *et al.* (2017) utilizando concentraciones de azúcares iniciales de 300 gL⁻¹ a 30°C a un pH de 5, dando como resultado concentraciones máximas de 118 gL⁻¹ y rendimientos (0.39 gg⁻¹) inferiores al 80 % respecto al teórico.

Lo anterior deja a la luz la aplicación de *S. cerevisiae* Ethanol Red en diversos medios con una alta eficiencia de fermentación. Por lo que esta levadura es un punto de referencia adecuado para la comparación de levaduras de laboratorio como *S. cerevisiae* ITV-01.

2 JUSTIFICACIÓN

Saccharomyces cerevisiae Ethanol Red es una levadura industrial de amplio uso en la producción de etanol de primera generación, principalmente en medios tales como: almidones y melazas. Sin embargo, no se tienen reportes de estudios en miel intermedia B e hidrolizados de bagazo de grano de cebada agotada, los cuales son una materia prima potencial para la producción de etanol de primera y segunda generación.

Por otro parte *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 ha demostrado poseer características deseables para la producción de etanol, por lo que se posiciona como una cepa con gran potencial para uso industrial. A pesar de que esta cepa ha sido ampliamente estudiada, no ha sido evaluada en condiciones industriales ni comparado con una cepa usada en la industria.

Actualmente la empresa Fermentis (Lasaffre, Francia) se encuentra interesada en la adquisición de la levadura *S- cerevisiae* ITV-01 para fines industriales, requiriendo del estudio comparativo de la capacidad fermentativa en medios complejos, tales como, hidrolizados, miel intermedia B y melazas de caña bajo condiciones de operación establecidas para ambas levaduras.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Realizar el estudio comparativo entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red bajo diferentes condiciones de cultivo para la producción de etanol.

3.2 Específicos

1. Estudiar el efecto de la temperatura sobre la producción de etanol *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red en melazas y miel intermedia B.
2. Evaluar el efecto de la concentración inicial de azúcares sobre la producción de etanol en *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red en melazas y miel intermedia B.
3. Evaluar la cinética de producción de etanol *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red en medios complejos como hidrolizados (grano de cebada agotada) y jugo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*).
4. Validar y comparar la eficiencia en la producción de etanol a nivel Planta Piloto de las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico.

Las cepas utilizadas en este trabajo son dos levaduras de especie *Saccharomyces cerevisiae*. La cepa “*Saccharomyces cerevisiae* ITV01” es una cepa autóctona aislada de melazas de caña por Ortiz-Zamora (2007). Por otra parte la cepa “*Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red” es una cepa comercial proporcionada por la empresa Fermentis (Lasaffre, Francia).

4.2 Medio de cultivo.

4.2.1 Medio de conservación.

Las cepas se mantienen en conservación a 4 °C, resemebrando cada 2 meses en el medio de conservación, el cual tiene la siguiente composición (Tabla 4.1):

Tabla 4.1 Composición del medio de conservación.

Componente	g/L
Glucosa	20
Agar	20
Extracto de Levadura	10

4.2.2 Medio de activación.

Para la activación del metabolismo de las levaduras mantenidas en conservación (caja Petri o tubos a 4 °C), ésta es inoculada con tres asadas en un medio de cultivo sintético propuesto por Strehaiano (1984) con la composición mostrada en la Tabla 4.2. Una vez inoculado el matraz (100 mL de medio), éste se incubaba a 30 °C a 250 rpm por 12 horas.

Tabla 4.2 Composición del medio de activación.

Componente	g/L
Glucosa	30
KH₂PO₄	5.0
(NH₄)₂SO₄	2.0
MgSO₄*7 H₂O	0.4
Extracto de Levadura	1.0

4.3 Condiciones para la fermentación.

4.3.1 Precultivo

Con la finalidad de disminuir la fase de adaptación durante la fermentación alcohólica, *S. cerevisiae* es previamente adaptada al medio de fermentación. Para llevar a cabo el precultivo se inocula 3×10^6 células viables/ mL del matraz de activación y se incuba a las mismas condiciones de la sección 4.2.2.

4.3.2 Fermentación alcohólicas por lote.

Las fermentaciones se llevan a cabo en matraces de 500 mL, conteniendo 250 mL de medio de fermentación (melazas y miel intermedia B.). El tamaño de inóculo para estas fermentaciones es de 6×10^6 células viables/mL y se incuban a 150 rpm a las temperaturas y concentraciones de azúcares iniciales de acuerdo a cada experimento. Las tomas de muestra se realizan cada tres horas evaluando viabilidad, cuanta celular, pH y almacenado 1.5 mL de muestra para análisis en cromatografías de líquidos de alta resolución (HPLC).

4.3.2.1 Estudio del efecto de la temperatura.

La evaluación del efecto de la temperatura se llevó a cabo en los dos medios utilizado las condiciones mencionadas en las secciones anteriores. Para evaluar la termotolerancia de ambas levaduras, la temperatura fue variada en un rango de 30 a 40 °C teniendo un total de 4 tratamientos, tal como se muestra en la Tabla 4.3

Tabla 4.3 Tratamiento para la evaluación de la termotolerancia.

Tratamientos			
30 °C	34 °C	38 °C	40 °C

4.3.2.2 Evaluación del efecto de la concentración inicial de sustrato.

La evaluación del efecto de la concentración de azúcares iniciales será llevada a cabo en los dos medios, utilizando las condiciones previas y las temperaturas adecuadas para cada microorganismo. Para evaluar la osmotolerancia la concentración de azúcares iniciales fue variada entre 100-250 g/L, teniendo 4 tratamientos en total, los cuales se muestran en la Tabla 4.4

Tabla 4.4 Tratamientos para la evaluación de la osmotolerancia.

Tratamientos			
100 gL ⁻¹	150 gL ⁻¹	200 gL ⁻¹	250 gL ⁻¹

4.3.2.3 Fermentación de jugo e hidrolizados.

Esta fermentaciones se llevaron a cabo en matraces conteniendo medios con posibles aplicación para la producción de etanol al nivel industria, tal es el caso del jugo de sorgo y del hidrolizado de grano agotado de cebada. Las concentraciones de azúcares dependieron para el caso del jugo de la calidad del mismo y para el hidrolizado de la concentración alcanzada con los pretratamientos realizados [H₂SO₄ 1.25 % w/w a 120

°C por 17 minutos (1:8 w/w); NaOH 8 % w/v a 120 °C por 60 minutos (1:10 w/w) y relación líquido-sólido de 30:1 (g:g), una relación de celulasas-sustrato de 28:1 (FPU:g) y una relación celobiosa-celulasas 13:1 (IU:FPU)].

4.3.2.4 Validación y comparación a nivel planta piloto.

Las fermentaciones a nivel planta piloto se realizaron en un fermentador de 1500 L con el medio más eficiente para la producción de etanol, simulando las condiciones que se emplean actualmente en la industria etanolera (sin control de la temperatura y sin control del pH). La activación de las levaduras se llevó a cabo utilizando la metodología descrita en las secciones anteriores, adicionalmente se realizaron dos etapas de precultivos en fermentadores de 60 y 400 L con la finalidad de producir biomasa para inocular los fermentadores de producción (1500 L).

4.4 Métodos analíticos.

4.4.1 Cuenta celular

La cuenta celular se realiza empleando una cámara de Thoma. Las muestras de cultivo fueron diluidas con el fin de contar cada vez un número máximo de 300 células. Cada conteo es realizado a partir de cinco cuadros grandes de la cámara de Thoma (Figura 4.1). El volumen de cada cuadro es de 4×10^6 mL.

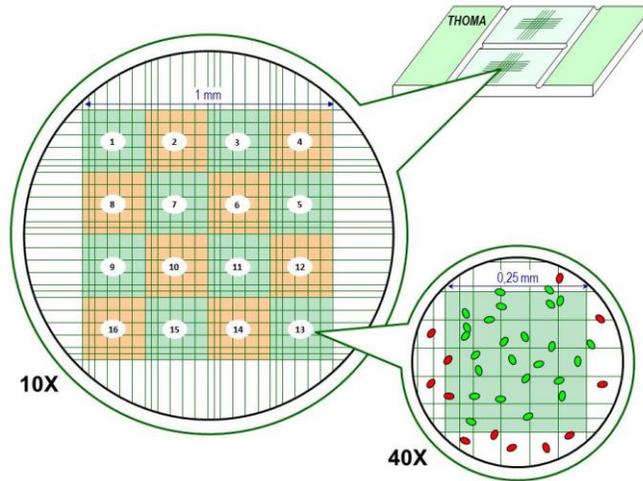


Figura 4.1 Distribución de la cámara de Thoma

La concentración celular (X) por mililitro se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$X = \frac{N \cdot d}{4n \cdot 10^{-6}} \quad \text{.Ec. 3}$$

Dónde:

N: Número de células contadas.

d: Dilución.

n: Número de cuadros grandes.

4.4.2 Análisis de biomasa.

La determinación de la biomasa se realiza en base al conteo a la cuneta celular el cual fue explicado en la sección 4.4.1. La cantidad de biomasa en peso seco (g/L) se obtendrá a mediante la filtración y secado de un volumen conocido de muestra (5 mL) en membranas de una porosidad determinada (Waters, acetato de celulosa 0.45 μm).

A estos datos se les llevara a cabo una regresión lineal para generar correlaciones para *S. cerevisiae* IVT-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red, respetivamente.

4.4.3 Viabilidad celular.

El análisis de células viables es realizado por medio de cuneta al microscopio después de haber realizado una tinción con azul de metileno (Lange, *et al.*, 1993). La muestra se mezcla volumen a volumen con el azul de metileno (la muestra previamente diluida para no exceder un máximo de 300 células), se deja en contacto durante 10 min y posteriormente se realiza el conteo en el microscopio. Las células que se encuentran viables no presentar coloración, mientras las no viables tomaran un color azul. Esta coloración puede deberse a dos motivos:

1. En las levaduras muertas el azul de metileno penetra en la célula, puesto que la membrana se vuelve permeable, mientras que en las levaduras vivas la permeabilidad de la membrana se mantiene evitando la penetración del azul de metileno.
2. En las levaduras vivas el azul de metileno penetra la célula y éste es reducido por una deshidrogenasa volviendo incoloro, mientras que en las levaduras muertas esto no sucede.

Este método permite evaluar la viabilidad celular de las levaduras durante la fermentación. El porcentaje de viabilidad celular (% V) es determinado mediante la ecuación:

$$\% V = \frac{N_v}{N_t} \times 100$$

Ec. 4

Dónde:

N_v es el número de células vivas.

N_m es el número de células totales.

4.4.4 Análisis de azúcares, etanol, glicerol y ácido acético

Para la determinación de los analitos de interés se utilizara un HPLC Waters Alliance (Figura 4.3) (Modelo E2605, Waters Co., Milford, MA) equipado detector de índice de refracción (Waters REW34e23, USA) y con una columna Shodex SH1011, específica para la separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes, operando a 55 °C. La fase móvil fue H₂SO₄ 0.05 N con flujo de elución de 0.600 mL min⁻¹. La concentración de azúcares, etanol y glicerol fue obtenida en base a una calibración con estándares utilizan el software Empower v2.0. (Waters Co., USA) para la estimación de las concentraciones de los analitos.



Figura 4.2 HPLC Waters Alliance.

4.5 Análisis de datos experimentales

4.5.1 Rendimientos y productividades

La ecuación de rendimiento $Y_{X/S}$ (g de biomasa / g de sustrato):

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

Ec.5

Dónde:

Xf: Concentración final de biomasa (gL⁻¹).

Xi: Concentración inicial de biomasa (gL⁻¹).

Si: Concentración inicial de sustrato (gL⁻¹).

Sf: Concentración final de sustrato (gL⁻¹).

La ecuación de rendimiento Y_{P/S} (g de producto / g de sustrato):

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad \text{Ec.6}$$

Dónde:

P_f: Concentración final de producto (gL⁻¹).

P_i: Concentración inicial de producto (gL⁻¹).

La ecuación de productividad volumétrica (Q) (g de producto / Litro * hora)

$$Q = \frac{P_f}{t_f} \quad \text{Ec. 7}$$

Dónde:

t_f: Tiempo de fermentación donde se alcanza la máxima concentración de producto (h)

P_f= concentración de producto máxima alcanzada en el tiempo t_f (g/L)

4.5.2 velocidades globales

El cálculo de las velocidades globales de producción y consumo se realizaran en base a las siguientes ecuaciones:

Producción de biomasa (r_x):

$$r_X \text{ (gL}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{dX}{dt} \quad \text{Ec.8}$$

Producción de producto (r_P):

$$r_P \text{ (gL}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{dP}{dt} \quad \text{Ec. 9}$$

Consumo de sustrato (r_S):

$$r_S \text{ (gL}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{dS}{dt} \quad \text{Ec. 10}$$

Un modelo matemático (ajuste polinómico de orden variable) es utilizado para ajustar los datos experimentales. La función obtenida representa las concentraciones (biomasa, sustrato y producto) como función del tiempo y posteriormente se deriva para encontrar los valores de las velocidades específicas y globales.

4.5.3 Velocidades específicas

El cálculo de las velocidades específicas de producción y consumo se realizaran en base a las siguientes ecuaciones:

Crecimiento (μ):

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Ec.11}$$

Producción (V_P):

$$V_P \text{ (gg}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{Ec.12}$$

Consumo (V_S):

$$V_S \text{ (gg}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad \text{Ec.13}$$

4.6 Análisis estadístico de los datos.

Todos los experimentos son realizados por duplicado, y sus valores fueron promediados para calcular las medias y desviaciones estándar. El análisis de variancia (ANOVA) fue realizado en el software Minitab 16.1.0 para verificar si los tratamientos son estadísticamente diferentes. Las pruebas de comparaciones múltiples son realizadas por Tukey con un 95 % de confiabilidad

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Pruebas preliminares.

Las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red fueron evaluada previamente en un medio sintético con 100 g/L de glucosa a 30°C y 150 rpm. Los resultados obtenidos mostraron que ambas levaduras crecieron con velocidades específicas de crecimiento superiores a 0.25 h⁻¹ y produjeron concentraciones de etanol superiores a los 40 gL⁻¹, con respecto a la producción de glicerol *S. cerevisiae* ITV-01 género una concentración mayor de este compuesto comparada con la cepa comercial (6.21 g/L y 2.53 g/L, respectivamente). Hablando del rendimiento de etanol, no hubo diferencia significativa entre ambas levaduras, pero en cambio en la productividad de *S. cerevisiae* ITV-01 fue 30 % mayor que la obtenida por *S. cerevisiae* Ethanol Red. Lo anterior se resume en la Tabla 5.1, así como el resto de parámetros cinéticos y estequiométricos.

Tabla 5.1 Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para ambas levaduras en medio sintéticos.

<i>S. cerevisiae</i>	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [gg ⁻¹]	$Y_{P/S}$ [gg ⁻¹]	Q_X [gL ⁻¹ h ⁻¹]	Q_P [gL ⁻¹ h ⁻¹]	Eficiencia [%]
ITV-01	0.266 ^a	0.018 ^b	0.459 ^a	0.155 ^b	3.004 ^a	89.88 ^a
Ethanol Red	0.288 ^a	0.049 ^a	0.424 ^a	0.292 ^a	2.282 ^b	83.02 ^a

La velocidad específica de crecimiento obtenida en *S. cerevisiae* ITV-01 fue similar a la obtenida por Ortiz-Muñiz en el 2010, en cambio el rendimiento y productividad de etanol tuvieron ligeras variaciones.

5.2 Evaluación del efecto de la temperatura.

5.2.1 Evaluación de la termotolerancia en melazas.

La evaluación de la termotolerancia en medio complejos se realizó en melazas y en miel B, puesto que las melazas son el medio más utilizado en México para la producción de etanol a nivel industrial y la miel B es un medio con potencial para la producción de etanol.

Como se ha reporta previamente en la literatura, la temperatura tiene un efecto importante sobre el crecimiento de microorganismos. Para el crecimiento de las levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae* la temperatura se encuentra en un rango de 30-43 °C (Walker, 1998). Las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red fueron capaces de crecer en un rango de temperatura de 30-40 °C manteniendo una viabilidad superior al 90 % con variaciones en la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) desde 0.319 -0.193 h⁻¹ y 0.281-0.202 h⁻¹, respectivamente.

S. cerevisiae ITV-01 presento los mayores valores de μ_{max} a las temperaturas 30 y 34 °C sin diferencia estadística alguna, alcanzando concentraciones de biomasa de superiores a 7 g/L para ambos casos. Trabajos previos por Ortiz-Muñiz, *et al* (2006) y Fernández-López, *et al* (2011) reportan que *S. cerevisiae* ITV-01 puede crecer sin problema a estas temperaturas tanto como en medio sintético y mieles (melazas y miel B), pero cuando la temperatura es incrementada el crecimiento se ve afectado.

Por otra parte, *S. cerevisiae* Ethanol Red la cual es un cepa catalogada como termoresistente (30-40 °C) por el proveedor (Lesaffre), solo perdió el 28 % de su μ_{max} en el rango de temperatura evaluado, comparada con *S. cerevisiae* ITV-01 que fue mayormente afectada perdiendo un 39 %. Para esta levadura la mayor velocidades de crecimiento se encontró a los 34 °C, alcanzando concentraciones de aproximadamente 6 g/L.

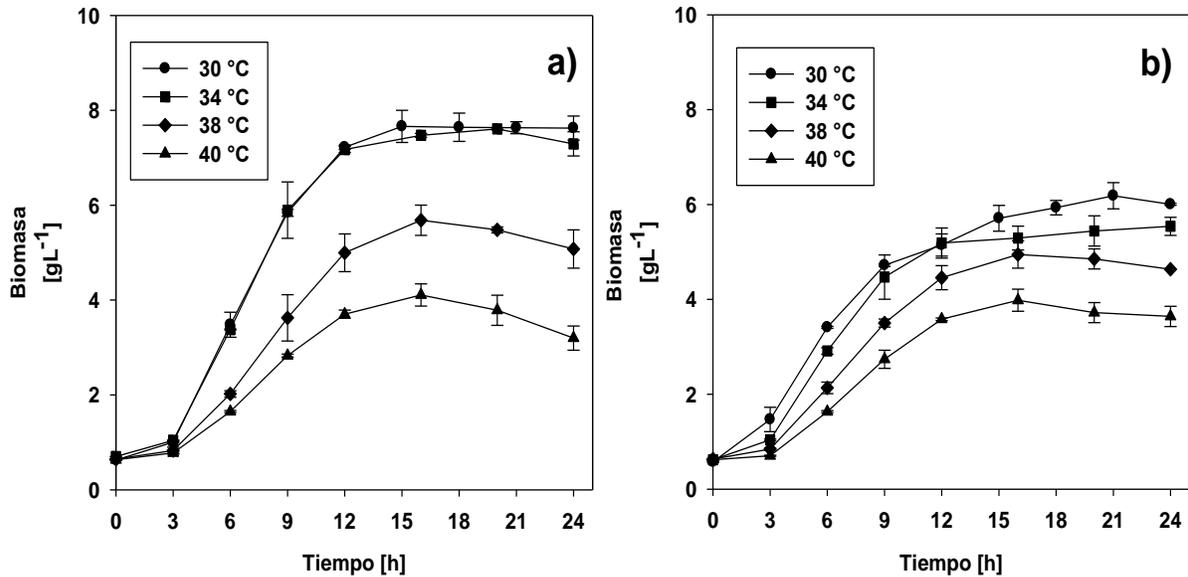


Figura 5.1 Crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en melazas a diferentes temperaturas.

Respecto al rendimiento ($Y_{X/S}$) y productividad (Q_x) de biomasa, los valores más altos para estos parámetros se obtuvieron a la temperatura de 30°C para ambas levaduras y estos disminuían con un incremento de la temperatura. Los valores de $Y_{X/S}$ (ver Tabla 5.2) fueron mayores para *S. cerevisiae* Ethanol Red en todas las temperaturas comparadas con *S. cerevisiae* ITV-01, lo que demuestra que *S. cerevisiae* Ethanol Red utilizó una mayor fracción de sustrato para la producción de biomasa comparada con *S. cerevisiae* ITV-01. Sin embargo los valores de Q_x fueron mayores para *S. cerevisiae* ITV-01 entre 30-38 °C, pero cuando la temperatura se incrementó 40 °C el valor de Q_x fue menor.

El efecto de la temperatura sobre el consumo de sustrato se representa en la Figura 5.2. Para la levadura *S. cerevisiae* ITV-01 la tendencia del consumo de sustrato fue similar en el rango de temperaturas evaluadas, pero la cantidad de azúcares residuales aumento de 5 gL⁻¹ a 11 gL⁻¹ cuando la temperatura fue incrementada de 30 °C a 40 °C. En cambio *S. cerevisiae* Ethanol Red consumió aproximadamente un 50 % de los azúcares iniciales en medio (100 gL⁻¹), manteniendo al final de la fermentación una

concentración azúcares residuales entre 45-50 gL⁻¹. El comportamiento mostrado para *S. cerevisiae* Ethanol Red fue similar para todas las temperaturas evaluadas.

Tabla 5.2 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en melazas a diferentes temperaturas.

Temperatura [°C]	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]		$Y_{x/s}$ [gg ⁻¹]		Q_x [gg ⁻¹]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
30	0.319 ^a	0.281 ^{ab}	0.084 ^b	0.128 ^a	0.362 ^a	0.251 ^c
34	0.319 ^a	0.286 ^{ab}	0.072 ^{bc}	0.115 ^a	0.303 ^b	0.231 ^{cd}
38	0.236 ^{bc}	0.234 ^{bc}	0.052 ^d	0.088 ^b	0.211 ^{de}	0.193 ^e
40	0.193 ^c	0.202 ^c	0.028 ^e	0.062 ^{cd}	0.133 ^f	0.152 ^f

Los valores con letras diferentes presentan diferencia estadística.

Una posible explicación al consumo ineficiente de azúcares mostrada por *S. cerevisiae* Ethanol Red puede ser debida a la falta de algún nutriente específico (fuente de nitrógeno o sales minerales) que promueva el consumo de sustrato, puesto que en medio sintético presentó un consumo de sustrato similar al mostrado por *S. cerevisiae* ITV-01. En la literatura las pruebas realizadas con esta levadura se llevan a cabo con medios suplementados (nitrógeno y sales), mientras que los medios utilizados para evaluar el efecto de la temperatura no fueron suplementados (Moreno, *et al*, 2013; Devantier, *et al.*, 2005; Imam y Capareda, 2011).

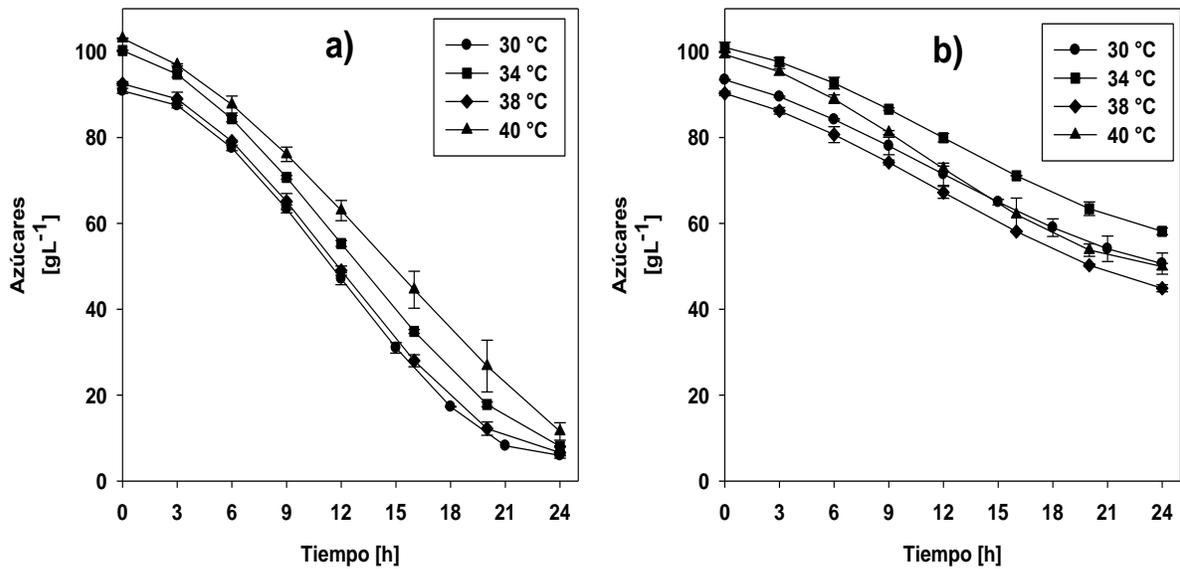


Figura 5.2 Consumo de azúcares de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en melazas a diferentes temperaturas.

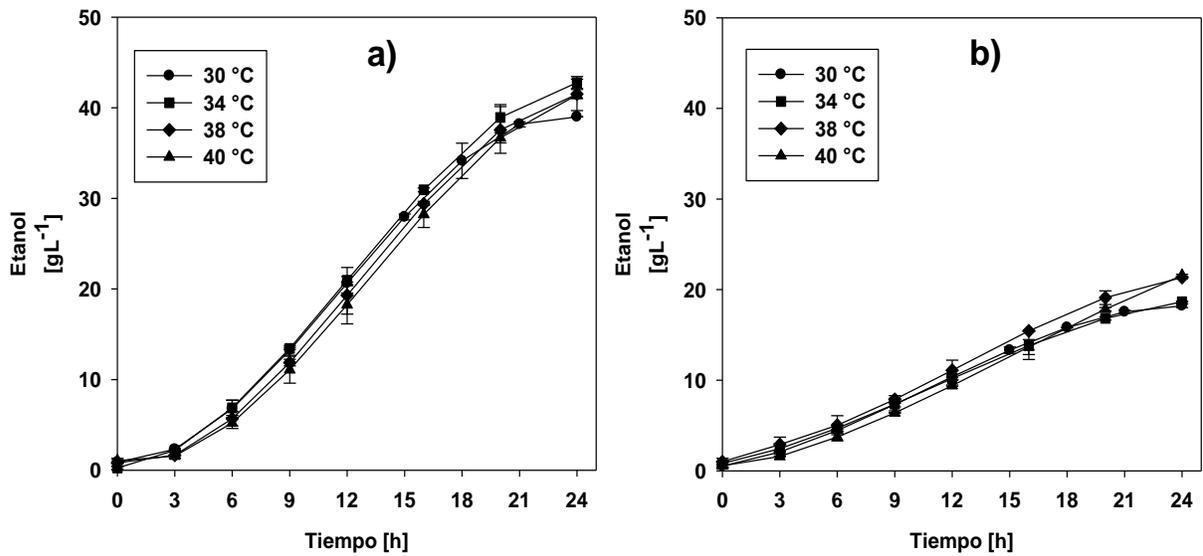


Figura 5.3 Producción de etanol por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en melazas a diferentes temperaturas.

En la Figura 5.3 se muestra la cinética de producción de etanol a diferentes temperaturas en melazas para las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red, alcanzando concentraciones máximas de etano de 42 gL⁻¹ y 21 gL⁻¹, respectivamente. La producción de etanol está directamente relacionada con el consumo de azúcares en el medio de fermentación, por lo que la formación de etanol por *S. cerevisiae* Ethanol Red se vio limitada comparada con la obtenida por *S. cerevisiae* ITV-01.

Respecto al rendimiento de etanol ($Y_{P/S}$) y eficiencia, se observa en la Tabla 5.3 que estos valores fueron mayores para *S. cerevisiae* ITV-01 sin diferencia estadística entre sí en el rango de temperatura evaluado. Por otra parte, los valores de productividad de etanol (Q_P) revelan que *S. cerevisiae* ITV-01 fue superior comparada con la levadura comercial y estos disminuían cuando la temperatura se incrementaba, situación inversa a la que se presentó por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red. El valor más alto de Q_P para *S. cerevisiae* ITV-01 se alcanzó a los 30 °C, pero este no presento diferencia estadística con el valor de 34 °C.

Tabla 5.3 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en melazas a diferentes temperaturas.

Temperatura [°C]	Parámetros					
	$Y_{P/S}$ [gg ⁻¹]		Q_P [gL ⁻¹ h ⁻¹]		Eficiencia [%]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
30	0.459 ^a	0.399 ^b	1.861 ^a	0.770 ^e	89.81 ^a	78.15 ^b
34	0.464 ^a	0.400 ^b	1.807 ^{ab}	0.783 ^{de}	90.90 ^a	78.22 ^b
38	0.471 ^a	0.415 ^{ab}	1.722 ^b	0.888 ^{cd}	92.17 ^a	81.18 ^{ab}
40	0.439 ^{ab}	0.432 ^{ab}	1.728 ^b	0.905 ^c	85.85 ^{ab}	84.46 ^{ab}

Los valore con letras diferentes presenta diferencia estadística.

Lo ya mencionado respecto a la mayor productividad de etanol por parte *S. cerevisiae* ITV-01 se puede apreciar en la Figura 5.4, en donde se representan las velocidades globales de producción de etanol (r_P) como función del tiempo. Para *S. cerevisiae* ITV-01 los valores máximos de r_P se alcanzaron a las 12 horas con un valor aproximado a $2.5 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para todas las temperaturas evaluadas, mientras que para *S. cerevisiae* Ethanol Red fue de aproximadamente de $1 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ en el rango de temperaturas evaluadas.

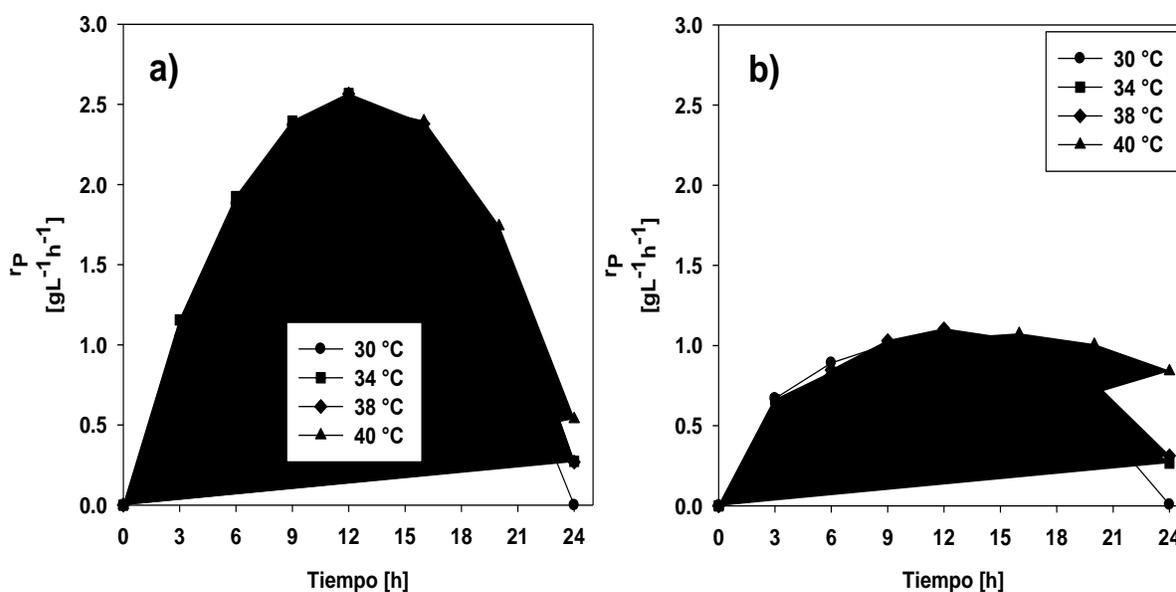


Figura 5.4 Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) a diferentes temperaturas en melazas.

5.2.2 Evaluación de la termotolerancia en miel B.

La evaluación del efecto de la temperatura miel B se muestra en esta sección, comenzando el análisis respecto a la producción de biomasa, en la Figura 5.5 se observa los perfiles de crecimiento de ambas levaduras en el rango de temperaturas evaluados. Para *S. cerevisiae* ITV-01 la concentraciones máxima de biomasa se alcanzó a la temperatura de 30 °C (8.5 gL⁻¹) y esta disminuía cuando la temperatura era incrementada, alcanzando un valor mínimo de 2.5 gL⁻¹ a la temperatura de 40 °C. Un fenómeno similar se dio para *S. cerevisiae* Ethanol Red dando su máxima concentración de biomasa a los 30 °C y la menor a los 40 °C. Cabe mencionar que la producción de biomasa en este medio fue mayor comparada con alcanzada en melazas, posiblemente a que la miel B contiene una mayor cantidad de compuestos (ver Tabla 1.3) de importancia para el crecimiento de levaduras respecto a la melaza (Walker, 1998).

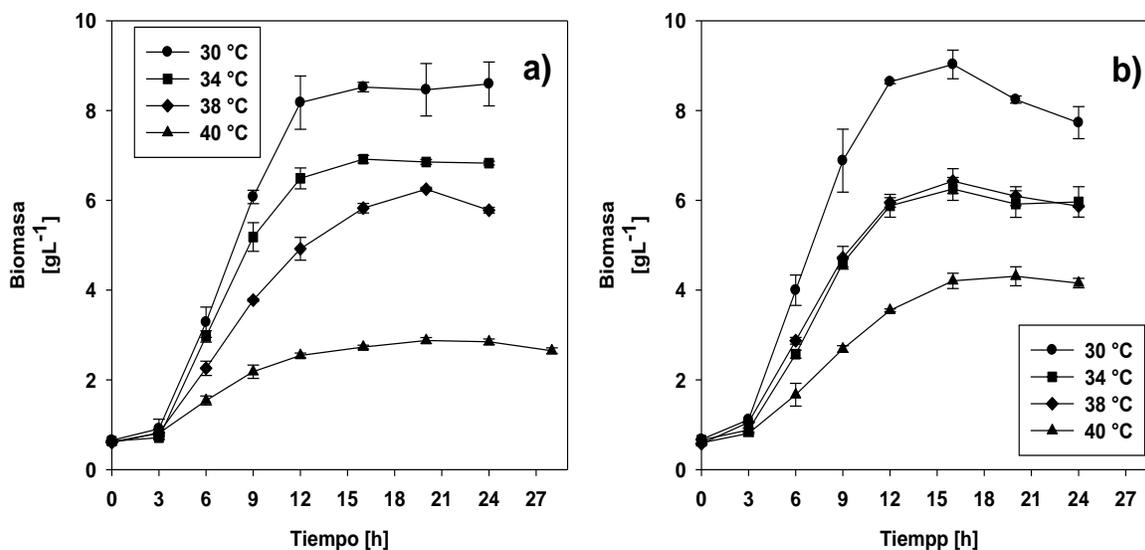


Figura 5.5 Crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en miel B a diferentes temperaturas.

En cuanto a los valores de μ_{\max} , esto se observan en la Tabla 5.4, donde se observa que *S. cerevisiae* ITV-01 no se vio afectada en rango de temperatura de 30-34 °C, pero cuando la temperatura se incrementó estos valores disminuían significativamente. Mientras que para *S. cerevisiae* Ethanol Red los valores de μ_{\max} no presentaron diferencia estadística en un rango de temperatura de 30-38 °C, pero cuando la temperatura se elevó a 40 °C una diferencia estadística se presentaba.

Hablando sobre los valores de $Y_{X/S}$ y Q_x , estos se vieron disminuidos cuando la temperatura se aumentó. Nuevamente *S. cerevisiae* Ethanol Red presento los mayores valores de $Y_{X/S}$, mientras que para Q_x estos valores no presentaron diferencia estadística en todas las temperaturas evaluadas.

Tabla 5.4 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en miel B a diferentes temperaturas.

Temperatura [°C]	Parámetros					
	μ_{\max} [h ⁻¹]		$Y_{X/S}$ [gg ⁻¹]		Q_x [gg ⁻¹]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
30	0.316 ^a	0.319 ^a	0.110 ^{ab}	0.142 ^a	0.357 ^a	0.321 ^{ab}
34	0.319 ^a	0.294 ^a	0.066 ^{cde}	0.104 ^{abc}	0.284 ^{bc}	0.248 ^c
38	0.225 ^b	0.289 ^a	0.056 ^{de}	0.111 ^{ab}	0.241 ^c	0.245 ^c
40	0.175 ^b	0.179 ^b	0.030 ^e	0.072 ^{bcd}	0.167 ^d	0.174 ^d

Los valore con letras diferentes presenta diferencia estadística.

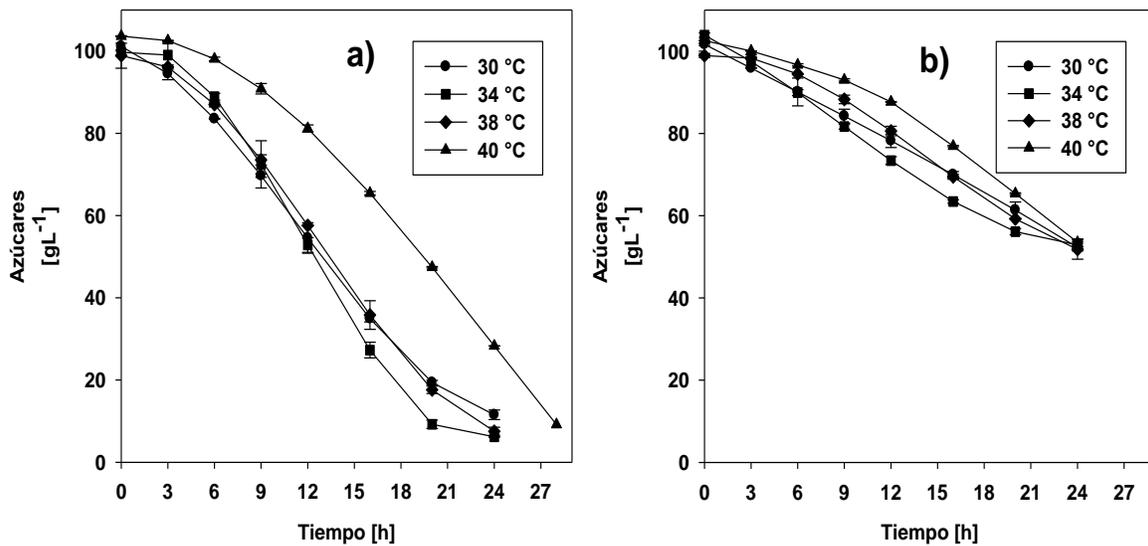


Figura 5.6 Consumo de azúcares de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en miel B a diferentes temperaturas.

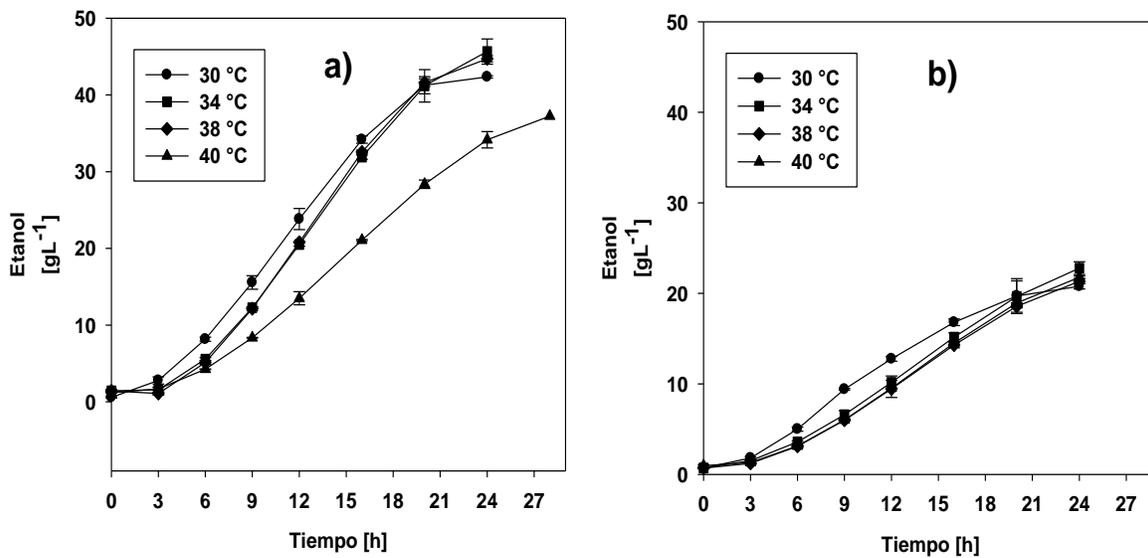


Figura 5.7 Producción de etanol por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en miel B a diferentes temperaturas.

Lo que refiere al consumo de sustrato, este se puede observar en la Figura 5.6. Para *S. cerevisiae* ITV-01 cantidad de azúcares residuales se mantuvo en entre 6-11 gL⁻¹, pero cuando la temperatura fue de 40 °C el consumo fue más lento. Mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro un comportamiento similar al presentado en melazas consumiendo solo un 50 % de los azúcares iniciales en el medio. Esta situación fortalece la hipótesis sobre la mayor demanda de nutrientes de esta levadura.

La producción de etanol en miel B para ambas levaduras se muestra en la Figura 5.7. Las máximas concentración de etanol se presentaron a la temperatura de 34 °C para *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red, con un valores de 45.7 gL⁻¹ y 22.8 gL⁻¹, respectivamente. Lo que refiere a los Y_{P/S}, esto valores fueron mayores para *S. cerevisiae* ITV-01 en un rango de temperatura de 30 °C a 38 °C (en esta última no hubo diferencia significativa), pero a la temperatura de 40 °C *S. cerevisiae* Ethanol Red alcanzo un mayor valor de rendimiento.

Tabla 5.5 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en miel B a diferentes temperaturas.

Temperatura [°C]	Parámetros					
	Y _{P/S} [gg ⁻¹]		Q _P [gL ⁻¹ h ⁻¹]		Eficiencia [%]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
30	0.413 ^{bcd}	0.397 ^{cd}	1.592 ^b	0.896 ^d	80.81 ^{bcd}	77.72 ^{cd}
34	0.471 ^a	0.429 ^{bc}	1.907 ^a	0.955 ^d	92.21 ^a	83.96 ^{bc}
38	0.475 ^a	0.440 ^{ab}	1.858 ^a	0.899 ^d	92.92 ^a	86.12 ^{ab}
40	0.386 ^d	0.424 ^{bcd}	1.330 ^c	0.913 ^d	85.54 ^d	83.00 ^{bcd}

Los valore con letras diferentes presenta diferencia estadística.

Por otro lado, los valores de Q_P nuevamente fueron superiores por parte de *S. cerevisiae* ITV-01 y su valor más alto se presentó a los 34 °C, sin embargo este valor no fue estadísticamente diferente al obtenido a 38 °C. Por otro lado, *S. cerevisiae* Ethanol Red alcanzó su valor máximo a los 34 °C pero no existió diferencia alguna con las demás temperaturas evaluadas. Lo anterior puede observarse de mejor forma en la Figura 5.8, donde se observa claramente el efecto de la temperatura sobre la r_P para ambas levaduras.

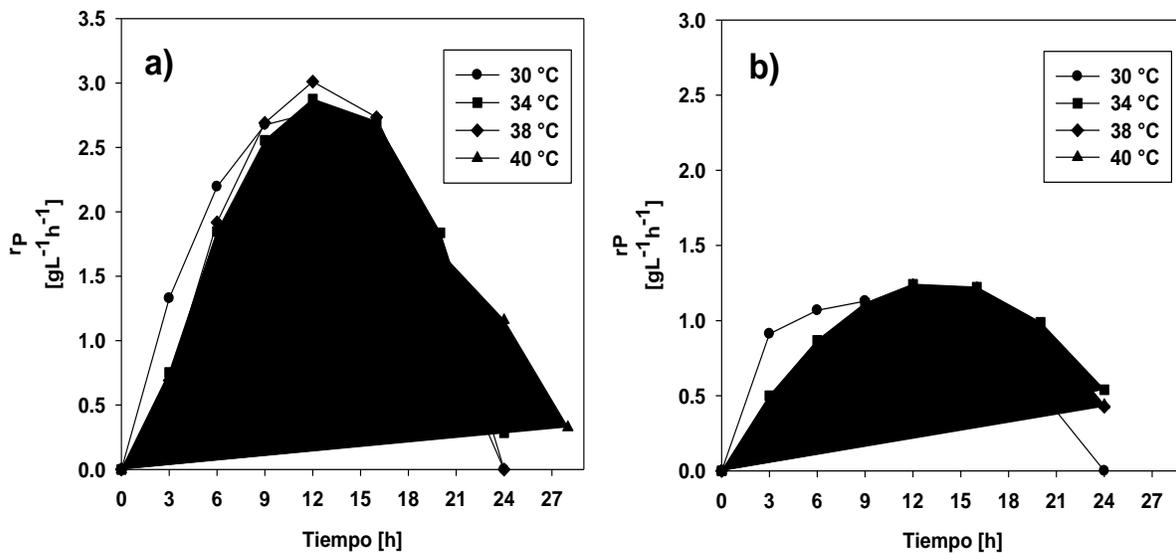


Figura 5.8 Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) a diferentes temperaturas en miel B.

5.3 Evaluación del efecto de la concentración de azúcares iniciales.

La evaluación del efecto de la concentración de azúcares iniciales sobre la producción de etanol se muestra en esta sección. Los datos experimentos fueron obtenidos variando la concentración de azúcares en un rango de 100-250 gL⁻¹, manteniendo una temperatura de 34 °C, ya que de acuerdo con los resultados obtenido en la sección anterior (evaluación de la termotolerancia) a esta temperatura la producción de etanol se vio favorecida. Reportes en la literatura indican que la producción de etanol y el crecimiento adecuado de biomasa se ve favorecida en un rango de temperatura de 30-36 ° C (Walker, 1998; Togarepi, *et al.*, 2012; Hashem, *et al.*, 2013).

5.3.1 Evaluación de la osmotolerancia en melazas.

Para el estudio del efecto de la concentración de azúcares iniciales las melazas fueron diluidas para alcanzar concentraciones de azúcares de 100, 150, 200 y 250 gL⁻¹ en el medio de fermentación. Respecto a la formación de biomasa en este medio, en la Figura 5.9 se muestra los perfiles de crecimiento a las diferentes concentraciones de sustrato, donde se observa que *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 presento un mayor crecimiento que *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red en el rango de concentraciones evaluadas manteniendo un valores de 6-7 gL⁻¹ y 5 gL⁻¹, respectivamente para cada levadura. Los valores de μ_{\max} para *S. cerevisiae* ITV-01 fueron estadísticamente similares en un rango de concentraciones de azúcares iniciales de 100-200 gL⁻¹, pero cuando la concentración se incrementó a 250 gL⁻¹ el valor de μ_{\max} disminuyó. Mientras que para *S. cerevisiae* Ethanol Red los valores de μ_{\max} fueron en aumento cuando la concentración de azúcares iniciales en el medio incrementaba de 100 a 200 gL⁻¹, pero un comportamiento similar al de *S. cerevisiae* ITV-01 fue observado cuando la concentración se incrementó a 250 gL⁻¹. Lo anterior puede ser debido al estrés al que las cepas son sometidas por un aumento en la presión osmótica en medio de fermentación generado por el incrementar en concentración de azúcares (Walker, 1998; Munnecke, 1981; Lin, *et al.*, 2012).

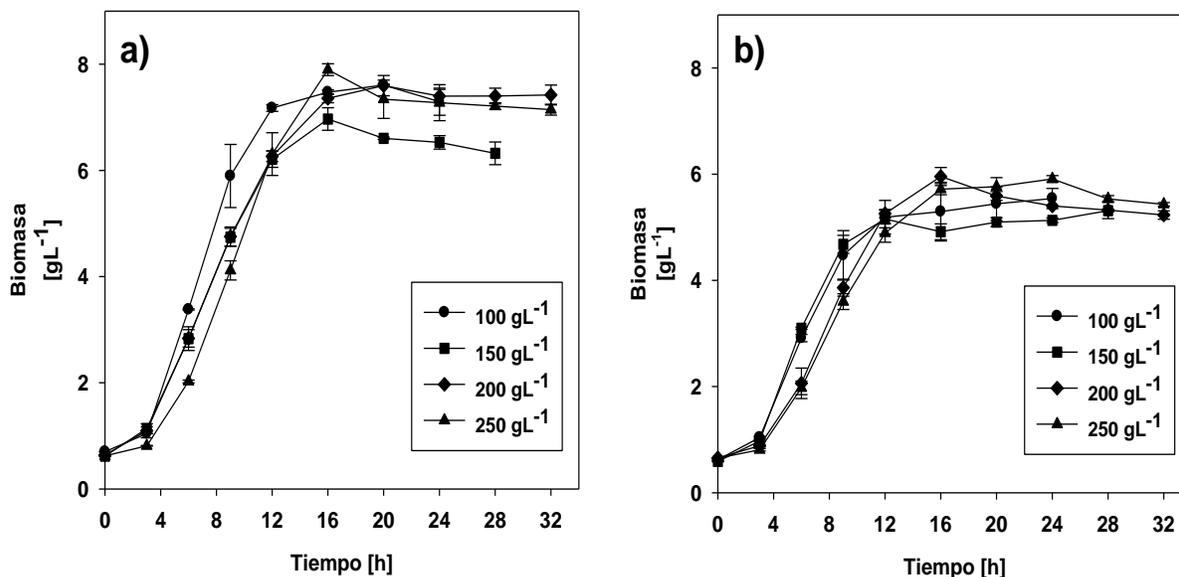


Figura 5.9 Crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

Tabla 5.6 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

[Azúcares] [gL ⁻¹]	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]		$Y_{x/s}$ [gg ⁻¹]		Q_x [gg ⁻¹]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
100	0.319 ^{ab}	0.286 ^b	0.072 ^b	0.115 ^a	0.303 ^a	0.231 ^b
150	0.323 ^{ab}	0.313 ^{ab}	0.046 ^{cd}	0.077 ^b	0.226 ^b	0.190 ^c
200	0.311 ^{ab}	0.333 ^a	0.042 ^d	0.061 ^{bc}	0.232 ^b	0.166 ^c
250	0.220 ^c	0.184 ^c	0.037 ^d	0.046 ^{cd}	0.223 ^b	0.173 ^c

Los valores con letras diferentes presentan diferencia estadística.

Por otro lado, los valores para $Y_{X/S}$ y Q_X (ver Tabla 5.6) fueron superiores a las menores concentraciones de azúcares iniciales, pero estos valores no fueron estadísticamente diferentes cuando la concentración de azúcares iniciales en el medio fue incrementada de 150 a 250 gL^{-1} para ambas levaduras.

Lo que concierne al consumo de azúcares, este se muestra en la Figura 5.10 donde se puede observar que la concentración de azúcares residuales aumentaba cuando se incrementaba la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación, siendo *S. cerevisiae* ITV-01 la levadura con mayor eficiencia en el consumo de sustrato, manteniendo al final del periodo de fermentación entre 8-10 gL^{-1} de azúcares residuales cuando se iniciaba la fermentación con 100-150 gL^{-1} de azúcares en el medio pero cuando esta se incrementaba a 200-250 gL^{-1} los azúcares residuales incrementaban entre 40-70 gL^{-1} . Mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red mantenía un consumo deficiente de sustrato de no más del 50 % respecto al inicial.

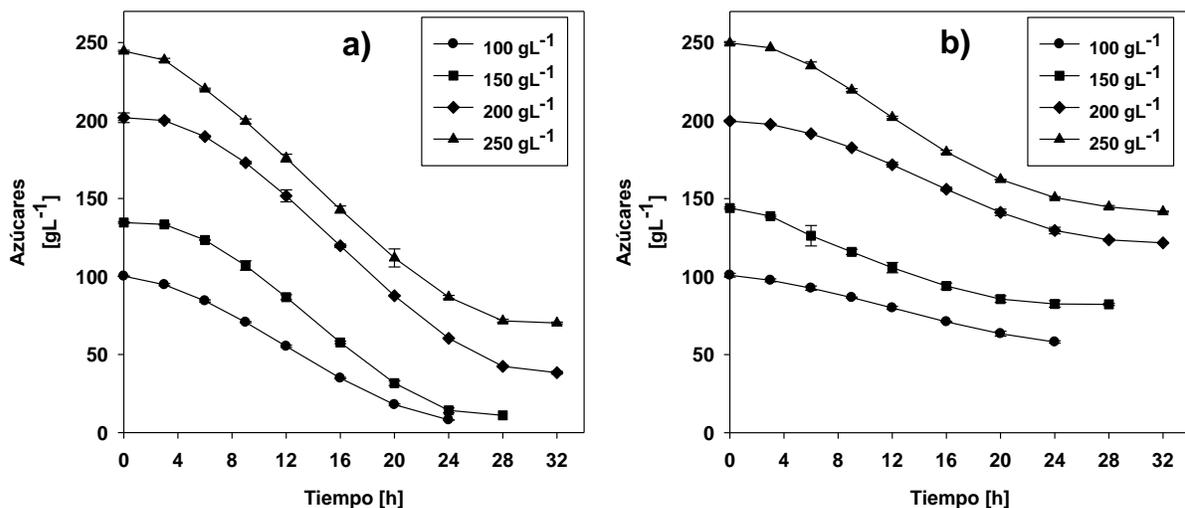


Figura 5.10 Consumo de azúcares de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

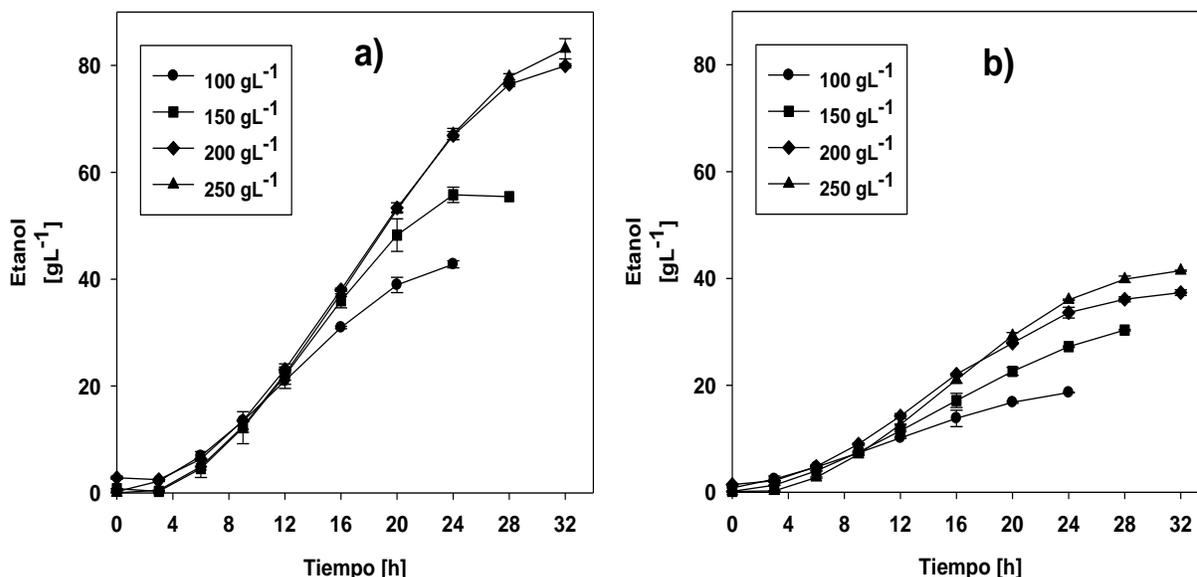


Figura 5.11 Producción de etanol por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (derecha) en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

Respecto a la formación de etanol, la Figura 5.11 muestra que la producción de se vio favorecida con un incrementó en la concentración de azúcares iniciales en el medio. Las máximas concentraciones de etanol alcanzadas para *S. cerevisiae* ITV-01 y para *S. cerevisiae* Ethanol Red se presentaron a 250 gL⁻¹ de azucares iniciales y fueron de 83 y 41 gL⁻¹, respectivamente. Los valores para el $Y_{P/S}$ se muestran en la Tabla 5.7 donde se muestra que *S. cerevisiae* ITV-01 no mostro diferencia estadística con aumentos en la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación, mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro sus mayores valores de rendimiento a 150 y 200 gL⁻¹, pero cuando la concentración de azucares se incrementó a 250 gL⁻¹ el valor de $Y_{P/S}$ decreció.

Tabla 5.7 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en melazas a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

[Azúcares] [gL ⁻¹]	Parámetros					
	Y _{P/S} [gg ⁻¹]		Q _P [gL ⁻¹ h ⁻¹]		Eficiencia [%]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
100	0.464 ^a	0.400 ^{bc}	1.807 ^c	0.783 ^e	90.90 ^a	78.22 ^{bc}
150	0.441 ^{ab}	0.489 ^a	1.992 ^b	1.083 ^d	86.33 ^{ab}	95.64 ^a
200	0.472 ^a	0.460 ^a	2.497 ^a	1.129 ^d	92.31 ^a	90.09 ^a
250	0.478 ^a	0.382 ^c	2.597 ^a	1.246 ^d	93.48 ^a	74.79 ^c

Los valores con letras diferentes presentan diferencia estadística.

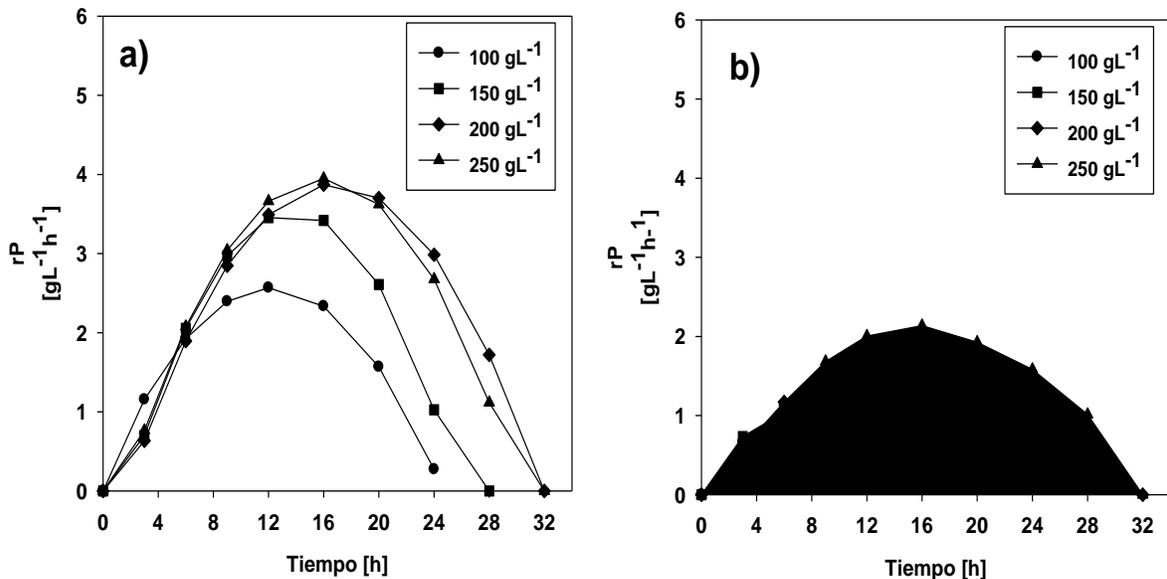


Figura 5.12 Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) a diferentes concentraciones de azúcares iniciales en melazas.

Con lo que respecta a los valores para la Q_P , *S. cerevisiae* ITV-01 fue superior en todas las concentraciones de azúcares iniciales evaluadas respecto a la cepa comercial y los máximos valores se obtuvieron a 250 gL^{-1} , pero no existió diferencia estadística con respecto a la concentración de 200 gL^{-1} . Mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red presento su mayor valor de Q_P a los 250 gL^{-1} de azucares iniciales pero si diferencia estadística con los valores obtenidos a 150 y 200 gL^{-1} . En la Figura 5.12 puede apreciarse de manera más clara la superioridad de *S. cerevisiae* ITV-01, puesto que esta levadura mostro mayores velocidades de reacción respecto a la levadura comercial. Esto es de suma importancia para la producción de etanol a nivel industrial, puesto que es deseable la fermentación de altas concentraciones de azúcares para generar una mayor producción de etanol en el menor tiempo posible (Siqueira, *et al.*, 2008 y Ortiz-Zamora, *et al.*, 2009)

5.3.2 Evaluación de la osmotolerancia en miel B.

Para el estudio del efecto de la concentración de azúcares iniciales en miel B, esta fue diluida para alcanzar concentraciones de azúcares de 100 , 150 , 200 y 250 gL^{-1} en el medio de fermentación.

Respecto al crecimiento de biomasa, la Figura 5.13 muestra los perfiles para *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red, donde se puede observar que aumentos en la concentración de azúcares en el medio promovieron el crecimiento para *S. cerevisiae* ITV-01, sin embargo cuando la concentración de azúcares en el medio se incrementó a 250 gL^{-1} el crecimiento se vio limitado, un comportamiento similar se presentó para *S. cerevisiae* Ethanol Red ya que cuando la concentración de sustrato al inicio de la fermentación era incrementada se promovían la formación de biomasa sin que esta fuera afectada a la máxima concentración (250 gL^{-1}). Por otro lado, los valores para la μ_{\max} (ver Tabla 23) de estas levaduras alcanzaron su mayor valor a la concentración de 250 gL^{-1} de azúcares iniciales sin deferencia estadística con las otras concentraciones evaluadas (100 y 150 gL^{-1}) con excepción de los valores presentados a 200 gL^{-1} . Los máximos valores de $Y_{X/S}$ y Q_X para *S. cerevisiae* ITV-01

se obtuvieron a los 100 gL⁻¹ y estos valores disminuían cuando la concentración de azúcares iniciales en el medio era aumentada. Por otro lado, el valor de $Y_{X/S}$ para *S. cerevisiae* Ethanol Red fue mayor a los 100 gL⁻¹, mientras que el Q_x alcanzó su mayor valor cuando la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación fue de 150 gL⁻¹. Es importante destacar que ambas levaduras presentaron una mayor formación de biomasa en miel B respecto a la presentada en melazas, esto puede ser debido a que la miel B contiene en su composición vitaminas (factores de crecimiento) importantes para el crecimiento de *S. cerevisiae* como lo son la biotina, la tiamina y la piridoxina (Walker, 1998).

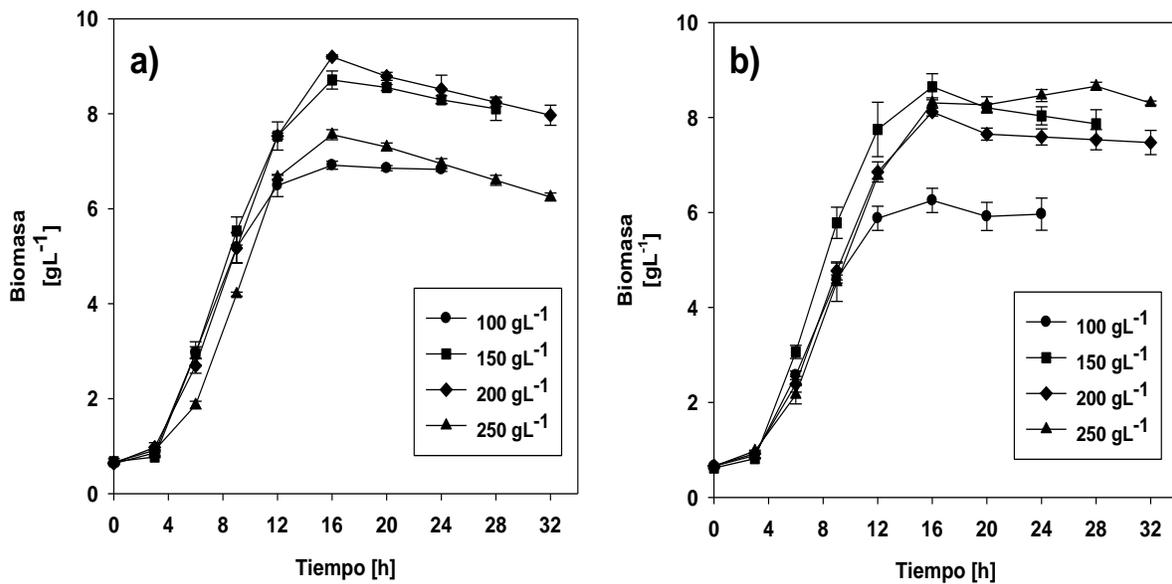


Figura 5.13 Crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

Tabla 5.8 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de biomasa en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

[Azúcares] [gL ⁻¹]	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]		$Y_{x/s}$ [gg ⁻¹]		Q_x [gg ⁻¹]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
100	0.319 ^a	0.294 ^{ab}	0.066 ^{cd}	0.104 ^a	0.284 ^{ab}	0.248 ^{bc}
150	0.296 ^{ab}	0.321 ^a	0.054 ^d	0.094 ^{ab}	0.290 ^a	0.281 ^{ab}
200	0.256 ^b	0.267 ^b	0.041 ^e	0.071 ^c	0.249 ^{bc}	0.235 ^c
250	0.333 ^a	0.326 ^a	0.029 ^e	0.086 ^b	0.195 ^d	0.271 ^{abc}

Los valores con letras diferentes presentan diferencia estadística.

Lo que concierne al consumo de sustrato en miel B, la Figura 5.14 muestra las curvas obtenidas por cada levadura a las diferentes concentraciones evaluadas. *S. cerevisiae* ITV-01 consumió más del 90 % del sustrato inicial cuando las concentraciones de sustrato se encontraban en un rango de 100-200 gL⁻¹, pero cuando la concentración fue incrementada a 250 gL⁻¹ el porcentaje de consumo disminuyó (75 %). Por otra parte, *S. cerevisiae* Ethanol Red mantuvo el comportamiento mostrado en las pruebas anteriores, donde el consumo de sustrato no superaba el 50 % respecto a la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación.

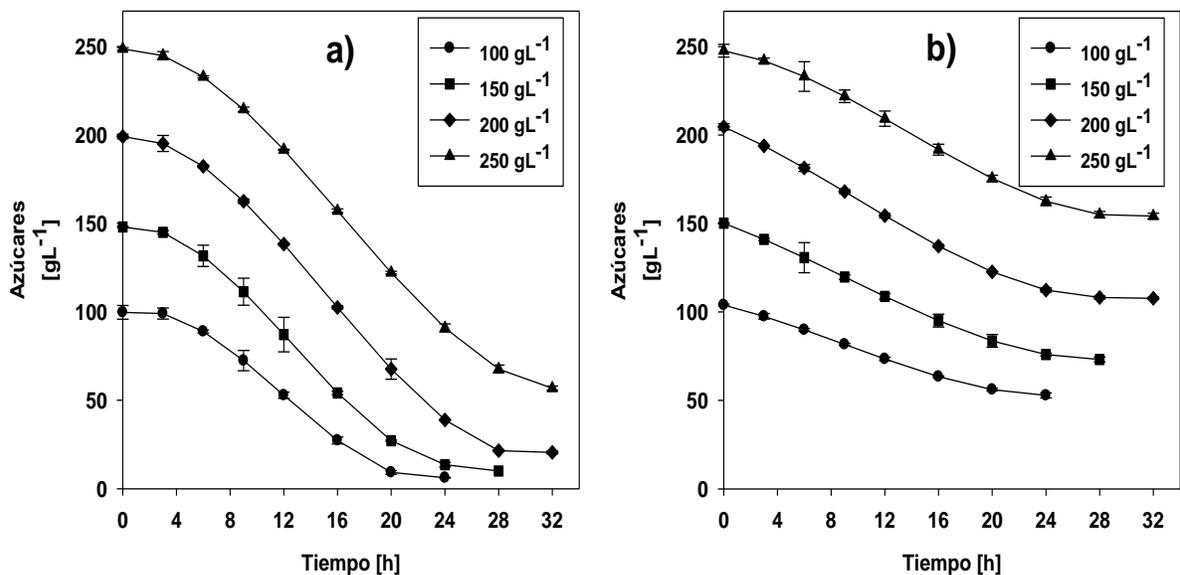


Figura 5.14 Consumo de azúcares de *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

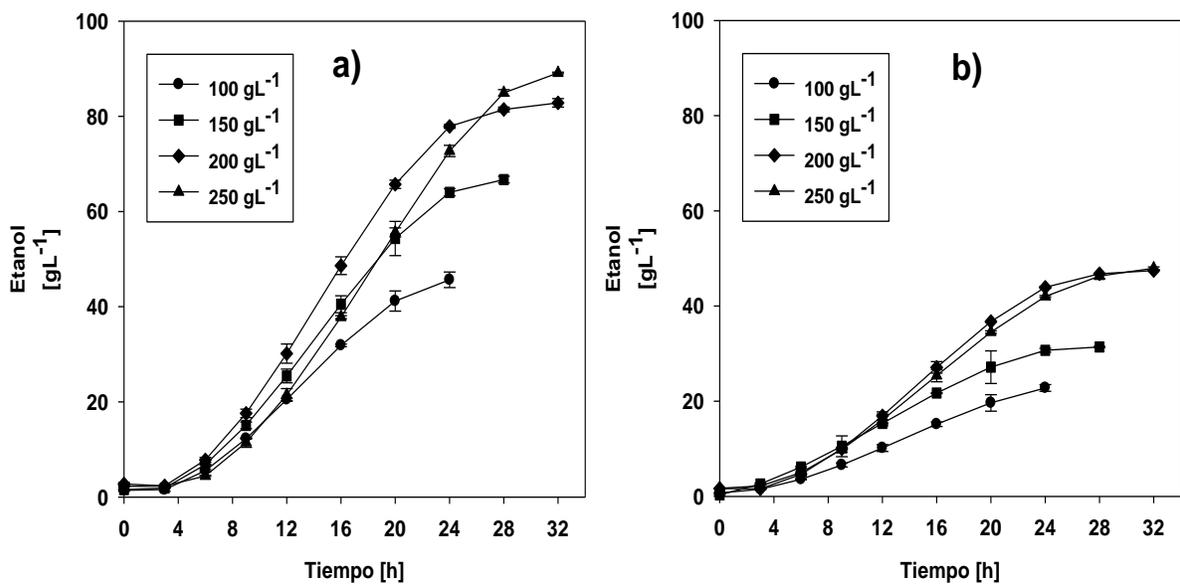


Figura 5.15 Producción de etanol por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

La producción de etanol se muestra en la Figura 5.15, donde se observa que aumentos en la concentración de azúcares iniciales promovieron la producción de etanol, sin embargo cuando la concentración de azúcares iniciales fue de 250 gL^{-1} la producción de etanol no fue diferente estadísticamente respecto al obtenida a 200 gL^{-1} . Respecto al $Y_{P/S}$ por parte de *S. cerevisiae* ITV-01, este alcanzó su mayor valor (0.472 gg^{-1}) cuando la concentración de azúcares iniciales fué de 150 gL^{-1} , aunque no existió diferencia estadística con los valores obtenidos a las demás concentraciones, dejando ver que la producción etanol no se vió afectada cuando la concentración de azúcares en el medio se incrementaba de $100\text{-}250 \text{ gL}^{-1}$. Por otro lado *S. cerevisiae* Ethanol alcanzó su mayor valor de $Y_{P/S}$ cuando la concentración de azúcares iniciales fue de 250 gL^{-1} , sin embargo esta no presento diferencia significativa con respecto a la obtenida a 200 gL^{-1} . Por último la Q_P fue superior para *S. cerevisiae* ITV-01 y su máximo valor ($2.785 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) se presentó cuando la concentración de azúcares en el medio fue de 250 gL^{-1} y este valor disminuía cuando la concentración de azúcares iniciales decrecía. Un comportamiento similar fue observado para la levadura comercial, pero los valores para Q_P a 200 y 250 gL^{-1} fueron estadísticamente similares. Lo anterior puede apreciarse de forma más clara en la Figura 5.16, donde se observa que *S. cerevisiae* ITV-01 presente una mayor r_P respecto a *S. cerevisiae* Ethanol Red, dejando en manifiesto la mayor eficiencia de levadura *S. cerevisiae* ITV-01 para la producción de etanol manteniendo consumos de sustrato adecuado y mayores velocidades de formación de producto a altas concentraciones de azúcares iniciales.

Tabla 5.9 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la producción de etanol en miel B a diferentes concentraciones de azúcares iniciales.

[Azúcares] [gL ⁻¹]	Parámetros					
	Y _{P/S} [gg ⁻¹]		Q _P [gL ⁻¹ h ⁻¹]		Eficiencia [%]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
100	0.471 ^{ab}	0.429 ^{cd}	1.907 ^d	0.955 ^g	92.21 ^{ab}	83.96 ^{cd}
150	0.472 ^{ab}	0.403 ^d	2.383 ^c	1.121 ^f	92.41 ^{ab}	78.92 ^d
200	0.449 ^{bc}	0.472 ^{ab}	2.589 ^b	1.462 ^e	87.77 ^{bc}	92.43 ^{ab}
250	0.453 ^{bc}	0.495 ^a	2.785 ^a	1.448 ^e	88.63 ^{bc}	96.88 ^a

Los valores con letras diferentes presenta diferencia estadística.

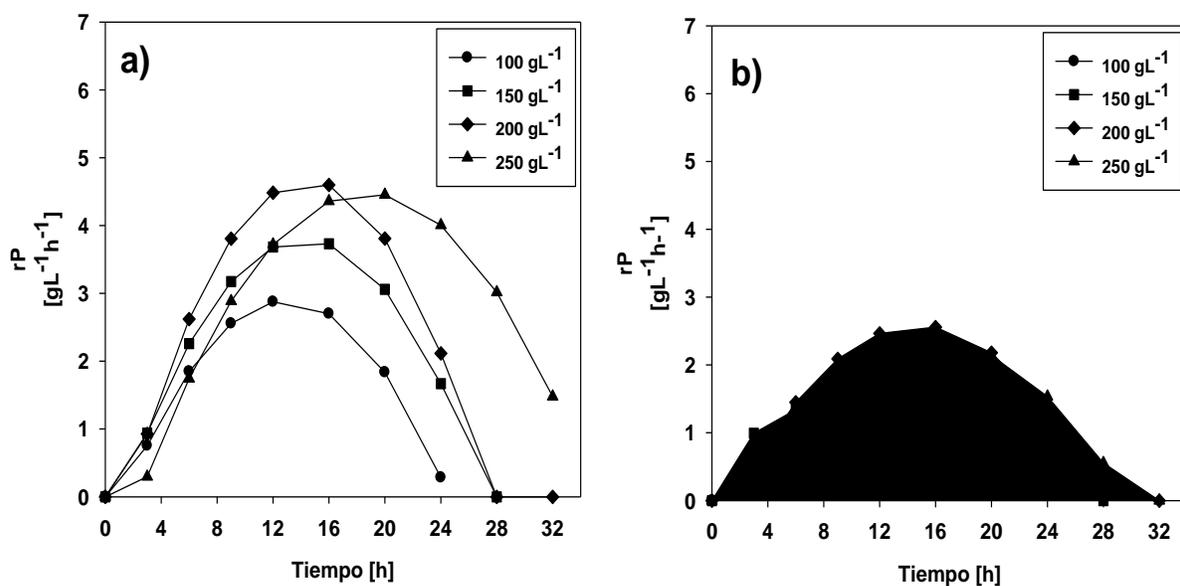


Figura 5.16 Velocidades globales de producción de etanol obtenidas por *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) a diferentes concentraciones de azúcares iniciales en miel B.

5.4 Evaluación de la producción de etanol en jugos e hidrolizados.

Con la finalidad de evaluar la capacidad fermentativa de las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red en diversos medios complejos con aplicación industrial, se realizaron fermentaciones en jugo de sorgo dulce e hidrolizado de grano de cebada agotada.

Para llevar a cabo las fermentaciones de jugo de sorgo dulce, previamente el jugo fue obtenido mediante la extrusión del tallo de sorgo, seguido de una filtración y éste fue almacenado hasta su uso. El jugo contenía una concentración de azúcares iniciales de 140 gL⁻¹. La Figura 5.17 muestra la producción de etanol y biomasa, así como el consumo de azúcares durante un periodo de 24 horas, donde se observa que *S. cerevisiae* Ethanol Red alcanzó una mayor concentración de biomasa al final del tiempo de fermentación respecto a *S. cerevisiae* ITV-01, pese a lo anterior no existió una diferencia estadística en la μ_{max} para ambas levaduras (ver Tabla 5.10), pero sí en los valores para $Y_{X/S}$. Mientras que el consumo de sustrato fue muy similar para ambas levaduras, *S. cerevisiae* ITV-01 consumió un 95 % del sustrato inicial y *S. cerevisiae* Ethanol Red consumió un 86 %. Comparando el consumo de sustrato mostrado por la levadura comercial en melazas, miel B y jugo de sorgo dulce, este último medio mejoró el consumo, probablemente a que este medio contiene una mayor cantidad de nutrientes respecto a los otros medios (Laopaiboon, *et al.*, 2010).

Tabla 5.10 Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de etanol a partir de jugo de sorgo dulce.

<i>S. cerevisiae</i>	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [gg ⁻¹]	$Y_{P/S}$ [gg ⁻¹]	Q_X [gL ⁻¹ h ⁻¹]	Q_P [gL ⁻¹ h ⁻¹]	Eficiencia [%]
ITV-01	0.307 ^a	0.051 ^b	0.465 ^a	0.313 ^b	2.594 ^a	89.16 ^a
Ethanol Red	0.304 ^a	0.069 ^a	0.430 ^a	0.370 ^a	2.197 ^b	84.17 ^a

Los valores con letras diferentes presentan diferencia estadística

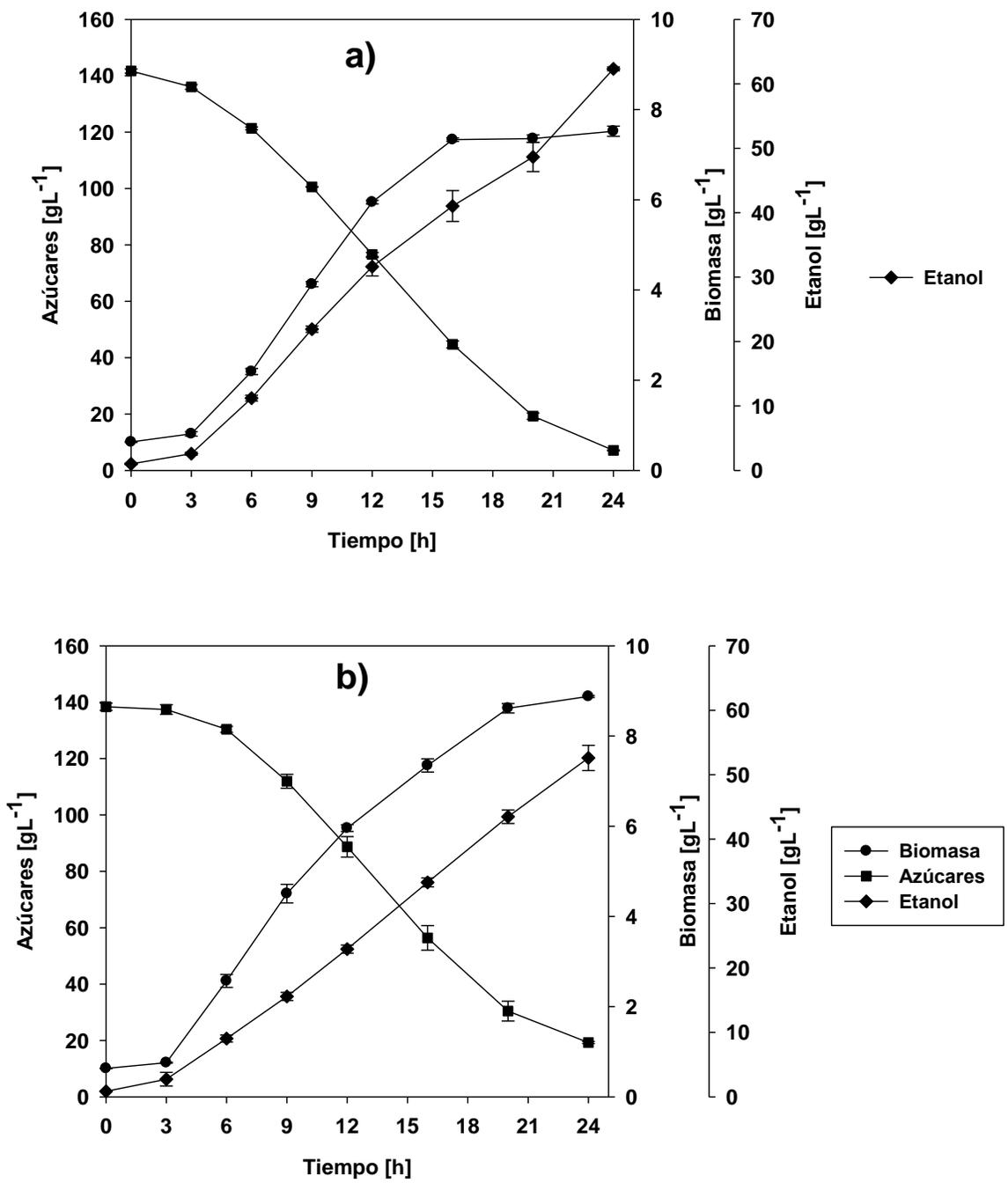


Figura 5.17 Producción de etanol por las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en jugo de sorgo dulce.

La producción de etanol en jugo de sorgo dulce para *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red fue de 62.3 gL⁻¹ y 52.6 gL⁻¹, respectivamente para cada levadura, pese a que *S. cerevisiae* ITV-01 presentó mayor concentración de etanol al final del tiempo de fermentación, los valores de $Y_{P/S}$ y eficiencia no presentaron diferencia estadística pero si los valores para Q_P .

La producción de etanol a partir del hidrolizado de grano de cebada agotada, fue realizada con la finalidad de evaluar la producción de etanol de segunda generación por ambas levaduras. Esta etapa experimental fue realizada en el laboratorio de biotecnología alimentaria de la universidad de Vigo (campus Ourense, España) bajo la dirección del Dr. José Manuel Domínguez González. el hidrolizado fue obtenido tras pretratar el grano de cebada agotada con H₂SO₄ [1.25 % w/w] a 120 °C por 17 minutos (1:8 w/w) con la finalidad de reducir la fracción de hemicelulasa; seguido de un tratamiento alcalino con NaOH [8 % w/v] a 120 °C por 60 minutos (1:10 w/w) y finalizando con una hidrólisis enzimática relación líquido-sólido de 30:1 (g:g) manteniendo una relación de celulasas-sustrato de 28:1 (FPU:g) y una relación celobiosa-celulasas 13:1 (IU:FPU)]. La concentración de azúcares iniciales en el hidrolizado fue de 31 gL⁻¹. La Figura 5.18 muestra la producción de etanol, biomasa y el consumo de sustrato en el hidrolizado de grano de cebada agotada por un periodo de 12 horas. Respecto a la formación de biomasa se puede observar que la levadura comercial alcanzó una mayor concentración celular al final de la fermentación respecto a *S. cerevisiae* ITV-01, lo anterior se vió reflejado en los valores para la μ_{max} , $Y_{X/S}$ y Q_X que mostraron una diferencia estadística favorable para *S. cerevisiae* Ethanol Red. Lo que respecta al consumo de sustrato, se observa que *S. cerevisiae* ITTV-01 consumió prácticamente en su totalidad los azúcares disponibles en el medio a las 12 horas, mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red consumió en su totalidad los azúcares a las 10 horas. La producción de etanol fue muy similar para *S. cerevisiae* ITTV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red y las máximas concentraciones fueron de 14.8 y 15.2 gL⁻¹, respectivamente. Los valores para el $Y_{P/S}$ y la eficiencia (ver Tabla 5.11) no presentaron diferencia significativa entre sí, mientras que la Q_P fue superior para *S. cerevisiae* Ethanol Red.

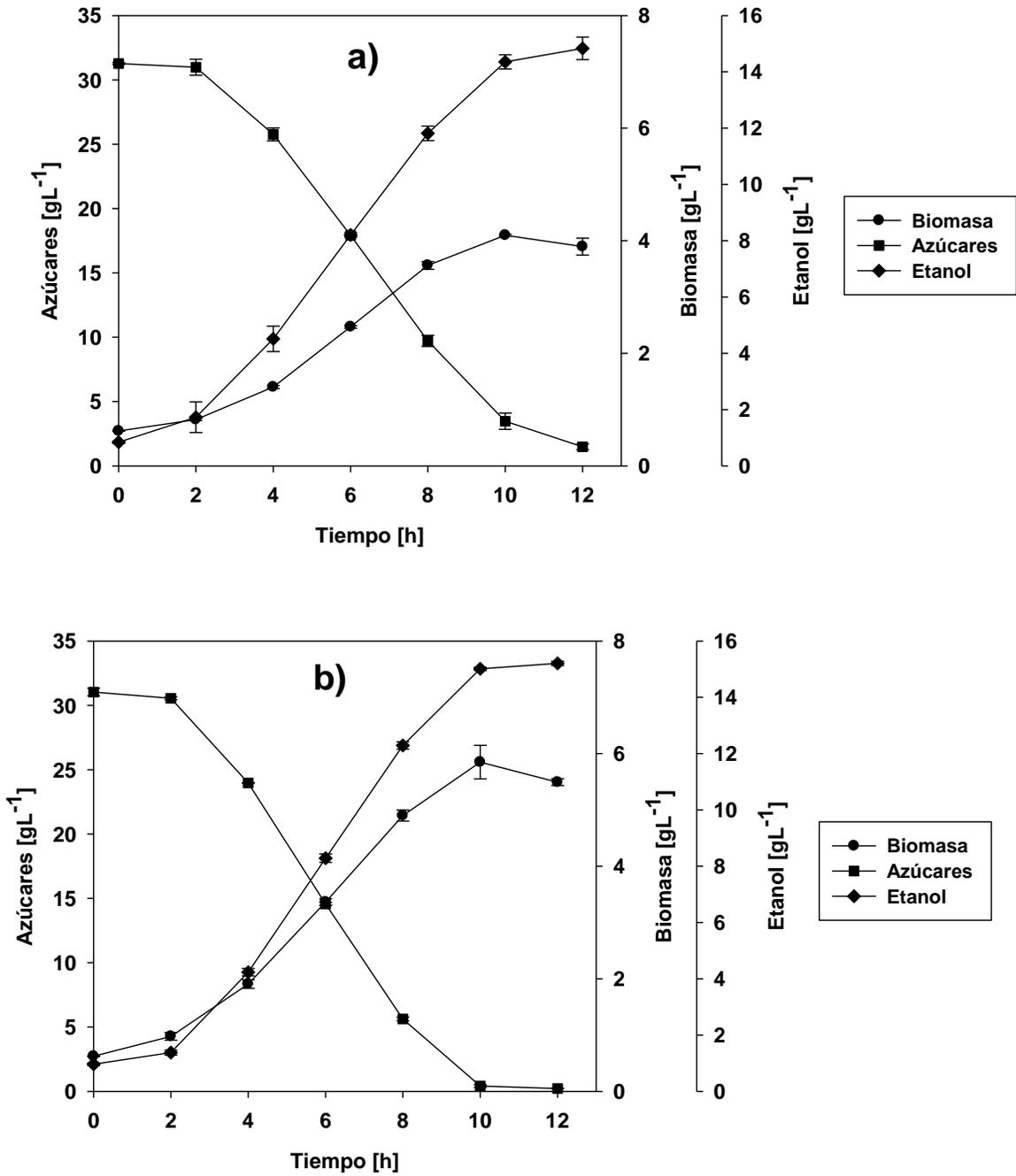


Figura 5.18 Producción de etanol por las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 (a) y *S. cerevisiae* Ethanol Red (b) en hidrolizados de grano de cebada agotada.

Tabla 5.11 Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de etanol a partir de hidrolizado de grano de cebada agotada.

<i>S. cerevisiae</i>	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$ [gg ⁻¹]	$Y_{P/S}$ [gg ⁻¹]	Q_X [gL ⁻¹ h ⁻¹]	Q_P [gL ⁻¹ h ⁻¹]	Eficiencia [%]
ITV-01	0.231 ^b	0.110 ^b	0.473 ^a	0.325 ^b	1.223 ^b	92.58 ^a
Ethanol Red	0.309 ^a	0.181 ^a	0.488 ^a	0.590 ^a	1.517 ^a	95.44 ^a

Los valore con letras diferentes presenta diferencia estadística

Realizando una comparación de los medios utilizados como el jugo de sorgo dulce e hidrolizado de grano de cebada agotada respecto a la miel B y melazas para ambas levaduras, podemos encontrar que los valores de μ_{max} son estadísticamente similares para en todos los medios evaluados, con excepción de *S. cerevisiae* ITV-01 que presento diferencia estadística el crecer en hidrolizado. Lo anterior puede ser debido al hecho que los hidrolizados enzimáticos generan compuestos inhibitorios que limita el crecimiento del microorganismo (Klinke, *et al.*, 2004). Respecto a los $Y_{P/S}$, se puede ver en la Tabla 5.12 que esto valores fueron estadísticamente similares por arriba de 0.44 gg⁻¹ (85 % respecto al valor teórico) para *S. cerevisiae* ITV-01 demostrando su potencial para la producción de etanol en diversos medios con aplicación industrial, mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro diferencias en sus valores de $Y_{P/S}$ dejando ver que el desempeño adecuado para esta levadura dependerá del medio en que sea utilizada. Por último, la Q_P mostro tener su mayor valor cuando el jugo de sorgo fue utilizado como medio de fermentación para ambas levaduras, resaltando así su amplio potencial de su uso para la producción de etanol. Los valores más bajos de Q_P se obtuvieron con el hidrolizado de grano de cebada agotada, debido a que la concentración de azúcares iniciales en el medio era de 31 gL⁻¹.

Tabla 5.12 Comparación de la producción de etanol en diferentes medios.

Medio	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]		Y_{Ps} [gg ⁻¹]		Q_p [gg ⁻¹]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
Melazas	0.323 ^a	0.313 ^a	0.441 ^{bc}	0.489 ^a	1.992 ^d	1.083 ^f
Miel B	0.296 ^a	0.321 ^a	0.472 ^{ab}	0.403 ^d	2.383 ^b	1.121 ^f
Jugo de sorgo	0.307 ^a	0.304 ^a	0.465 ^{abc}	0.430 ^{cd}	2.594 ^a	2.197 ^c
Hidrolizado GCA*	0.231 ^b	0.309 ^a	0.473 ^{ab}	0.488 ^a	1.223 ^f	1.517 ^h

Los valores con letras diferentes presentan diferencia estadística

* Concentración de azúcares iniciales de 31 gL⁻¹

5.5 Comparación a nivel planta piloto.

Con la finalidad de verificar si los valores para rendimientos, productividades y demás parámetros obtenidos a nivel laboratorio por las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red se mantenían similares a nivel planta piloto, se evaluó la producción de etanol en jugo de caña en un fermentador de 1500 L con ambas levaduras. Para lo anterior, el jugo de caña fue previamente obtenido tras la molienda de 5 toneladas de caña de azúcar y clarificado en un tanque sedimentador. El jugo de caña contenía una concentración de 135 gL⁻¹ de azúcares iniciales. Para llevar a cabo las fermentaciones en el fermentador de 1500 L se llevaron a cabo 2 etapas previas de precultivo para la proliferación de las levaduras (reactor de 60 L y tanque semilla de 400 L) y con el motivo de evaluar la adición de nutrientes al medio de fermentación, fueron añadidos 2 gL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ a los fermentadores.

La Figura 5.19 muestra los perfiles de biomasa producida para cada levadura con (CN) y sin adición de nutrientes (SN), donde se observa que *S. cerevisiae* ITV-01 presentó un mayor crecimiento respecto a la levadura comercial y ésta presentó un mayor

crecimiento cuando el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue adicionado al medio de fermentación. Fenómeno similar se presentó durante el crecimiento de *S. cerevisiae* Ethanol Red, lo anterior es debido a que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ proporciona 2 nutrientes esenciales (nitrógeno y sulfuro) para las levaduras con funciones estructurales y de importancia para la síntesis de aminoácidos (Walker, 1998).

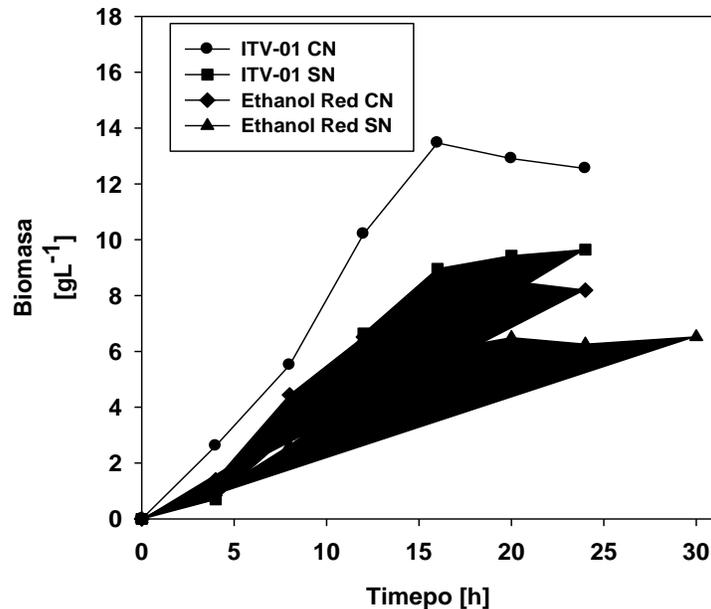


Figura 5.19 Producción de biomasa en jugo de caña de azúcar a nivel planta piloto.

Los valores de μ_{\max} para cada levadura variaron con la adición de nutrientes, estos valores fueron mayores cuando el medio fue suplementado para ambas levaduras y *S. cerevisiae* ITV-01 presentó el mayor (0.124 h^{-1}). Comparando los valores obtenidos a nivel laboratorio con los obtenidos a nivel planta piloto se observa una disminución de la μ_{\max} en ambas levaduras, esto puede ser debido a la inhibición generada por el estrés a los cuales las levaduras son sometidas cuando se realizan fermentaciones en tanques abiertos (Bai, Anderson y Moo-Young, 2008). Por otro lado, los valores de $Y_{X/S}$ y Q_x fueron mayores para *S. cerevisiae* ITV-01 comparado con *S. cerevisiae* Ethanol

Red cuando el medio fue adicionado con nutrientes y cuando este no fue suplementado.

Tabla 5.13 Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de biomasa en jugo de caña a nivel planta piloto.

(NH ₄) ₂ SO ₄	Parámetros					
	μ_{Max} [h ⁻¹]		Y _{X/S} [gg ⁻¹]		Q _x [gg ⁻¹]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
Con	0.137	0.124	0.123	0.066	0.663	0.435
Sin	0.101	0.056	0.081	0.063	0.547	0.449

Lo que respecta al consumo de sustrato, la Figura 5.20 muestra los perfiles seguidos por *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red cuando el medio fue suplementado y cuando este no fue suplementado. En la Figura 30 se observa que la levadura *S. cerevisiae* ITV-01 mostro una mayor velocidad en el consumo de azucares en el medio cuando el medio de fermentación fue adición con (NH₄)₂SO₄, sin embargo aun cuando el medio de fermentación no fue suplementado con nutrientes *S. cerevisiae* ITV-01 mantuvo el mismo porcentaje de consumo de sustrato (87.5 %) que cuando éste fue suplementado pero con en un mayor tiempo de fermentación. Por otro lado *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro una mayor eficiencia en el consumo de sustrato cuando el medio se suplemento, superando incluso el porcentaje de consumo de sustrato (91 %) mostrado por la *S. cerevisiae* ITV-01, sin embargo cuando la adición de (NH₄)₂SO₄ el porcentaje de consumo no fué superior al 75 % y el periodo de fermentación se alargó hasta las 30 horas.

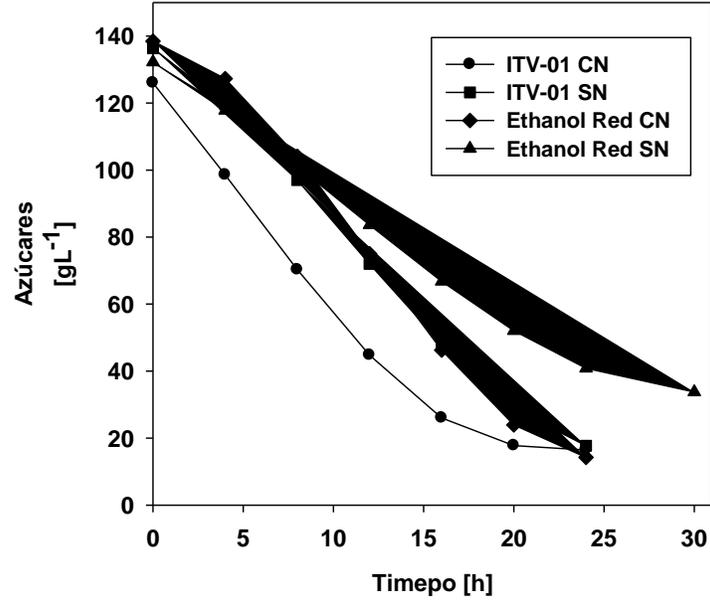


Figura 5.20 Consumo de azúcares en jugo de caña a nivel planta piloto.

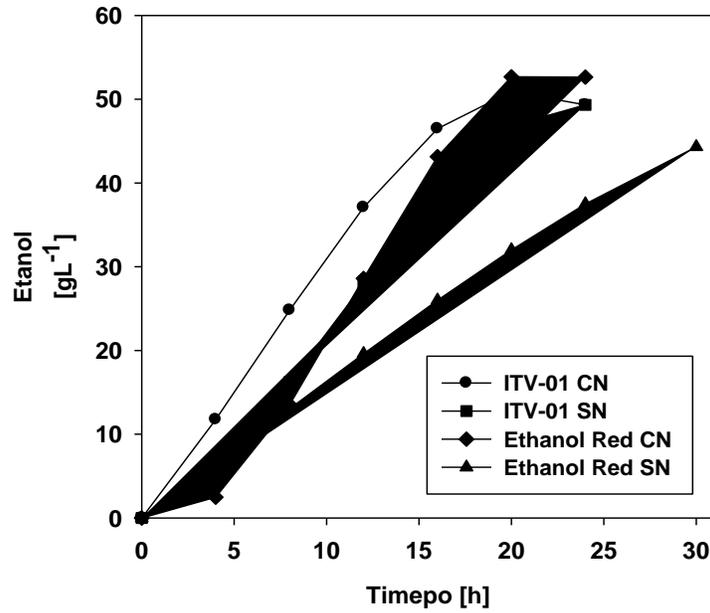


Figura 5.21 Producción de etanol en jugo de caña a nivel planta piloto

La producción de etanol en jugo de caña a nivel planta piloto se muestra en la Figura 5.21, aquí se puede observar que la producción de etanol para *S. cerevisiae* ITV-01 fue muy similar (49 gL^{-1}) cuando los nutrientes fueron adicionadas al medio y cuando estos no fueron añadidos, esto deja ver de forma evidente que *S. cerevisiae* ITV-01 es una levadura con bajos requerimientos nutricionales para la producción de etanol, este comportamiento fue previamente reportado por Partida-Sedas (2017) indicando que la producción de etanol fue similares en jugo de sorgo suplementado y sin suplementar. Mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red mostró una mejor producción de etanol cuando se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al medio de fermentación (52 gL^{-1}) y cuando el medio no fue suplementado la producción de etanol disminuyó (44 gL^{-1}) y el tiempo de fermentación fué de 30 horas. Lo anterior confirmó que el comportamiento mostrado por esta levadura en melazas y miel B fué debido a la falta de nutrientes en el medio de fermentación, dando evidencia clara de que *S. cerevisiae* Ethanol Red es una levadura con alta demanda nutricional.

Tabla 5.14 Parámetros cinéticos y estequiométricos para la producción de etanol en jugo de caña a nivel planta piloto.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Parámetros					
	$Y_{P/S}[\text{gg}^{-1}]$		$Q_P [\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$		Eficiencia [%]	
	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red	ITV-01	Ethanol Red
Con	0.467	0.435	1.983	2.236	91.47	85.20
Sin	0.416	0.449	2.055	1.478	81.32	87.90

Los valores de $Y_{P/S}$ para *S. cerevisiae* ITV-01(ver Tabla 5.14) alcanzaron su máximo valor cuando el medio fué suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, teniendo una eficiencia de fermentación superior al 90 %, sin embargo los valores de Q_P fueron similares. Mientras que *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro rendimiento similares cuando el medio

de fermentación fue suplementado con nutrientes y no cuando no lo fué, pero los valores de Q_P fueron superiores cuando el medio fue enriquecido con $(NH_4)_2SO_4$, dejando en claro la necesidad de adicionar nutrientes al medio de fermentación para esta levadura.

6 CONCLUSIONES

Las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red fueron capaces de crecer en un rango de temperaturas de 30-40 °C mostrando una disminución del crecimiento con aumentos en la temperatura, pese a esto las levaduras fueron capaces de mantener su capacidad fermentativa con $Y_{P/S}$ y eficiencias de fermentación similares.

Ambas levaduras fueron capaces de crecer en un rango de concentración de azúcares iniciales de 100-200 gL⁻¹ sin mostrar efectos inhibitorios por la acción del sustrato, así mismo la producción de etanol no fue afectada con aumentos en la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación dejando en evidencia la capacidad de osmotolerantes de estas levaduras.

S. cerevisiae ITV-01 mostro ser una levadura con una mayor eficiencia en el consumo y la producción de etanol en melazas y miel B sin suplementar respecto a *S. cerevisiae* Ethanol Red que consumió solo un 50 % de los azúcares iniciales en el medio de fermentación, limitando así la producción de etanol.

La producción de etanol en jugo de sorgo dulce para ambas levaduras fue similar manteniendo valores de $Y_{P/S}$ y eficiencia iguales entre sí, sin embargo *S. cerevisiae* ITV-01 mostro una mayor productividad. Mientras que la producción de etanol en hidrolizado de grano de cebada agotada (medio enriquecido) fue similar para ambas levaduras ($Y_{P/S}$) pero en este medio *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro una mayor valora para Q_P respecto a *S. cerevisiae* ITV-01.

Las levaduras *S. cerevisiae* ITV-01 y *S. cerevisiae* Ethanol Red produjeron etanol a nivel planta piloto con eficiencias superiores al 90 y 85 % respectivamente cuando el medio de fermentación fue suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cuando el medio no fue suplementado las eficiencias fueron de superiores a 85 % para ambas levaduras, manteniendo la eficiencia de fermentación en ambos casos por encima del 80 % el cual es el valor mínimo requerido para el escalamiento de un proceso fermentativo.

S. cerevisiae ITV-01 demostró ser una levadura con bajos requerimientos nutricionales para la producción de etanol, mientras *S. cerevisiae* Ethanol Red mostro ser una levadura que para poder llevar un consumo de sustrato eficiente y adecuada producción de etanol necesita la incorporación de nutrientes como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

BIBLIOGRAFÍA

Bai, F.W., Anderson, W.A. y Moo-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances* 26, pp. 89-105.

Balat, M., Balat, H. y Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in energy and combustion science*, 34, pp. 551-573.

Barbosa, H.S., Silveira, E.A., Miranda Jr., M. y Ernandes, J.R., 2016. Efficient very high gravity fermentation of sugarcane molasses by industrial yeast strains. *Journal of the institute of brewing and distilling*. 122, pp. 329-333.

Bosso, L.C., Basso, T.O. y Rocha, S.N., 2011. Ethanol production in Brazil: The industrial process and impact on yeast fermentation. *Biofuel production-recent developments and prospects*. pp. 87-100.

Campos, J., 2008 Establecimiento de un proceso de producción de etanol partir de jugo de caña y miel intermedia B con *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01. Tesis de Maestría, UNIDA-ITV. México.

Cardona, C.A. y Sánchez, O.J., 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencias*, 30, pp. 671-678.

Cardona, C.A. y Sánchez, O.J., 2007. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresourse Technology*. 98, pp2415-2457

Chandel, A.K., Chan, E., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Roa, V. y Ravindra, P., 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and molecular biology*, 2 (1), pp. 14-32.

Demirbas, A., 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33, pp.1-18.

Devantier, R., Schiethauer, B., Villas-Boa, S.G., Pederson, S. y Olsson, L., 2005. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations.

D'Amore, T. y Stewart, G.G., 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 9, pp 322-330.

Faba, L., Díaz, E. y Ordóñez, S., 2013. La biomasa como material prima para la obtención de biocombustibles líquidos. [En línea] Disponible en:<<http://www.ambientum.com/revista/2013/junio/biomasa-como-materia-prima-para-obtencion-combustibles-liquidos.asp#>> [Consultado el 7 de Enero del 2018].

Fakruddin, M., Quayum, M., Ahmed, M.M. y Choudhury. N., 2012. Analysis of key factors affecting ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. *Asian Network for Scientific Information*. 11, pp. 248-252.

Fernández-López, C.L., Torrestiana-Sánchez, B., Salgado-Cervantes, M.A., García, P.G., Aguilar-Uscanga, M.G., 2011. Use of sugarcane molasses “B” as an alternative for ethanol production with wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations. *Bioprocess Biosystem Engineering*. 35, pp: 605-614.

Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. y Covarrubias-Robles. A.A., 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*.46, pp. 24-46.

García, C.A., Fuentes, A., Hennecke, A., Riegelhaupt, E., Monzini, F. y Maser, O., 2011. Life-cycle greenhouse gas emissions and energy balance of sugarcane ethanol production of México. *Applied Energy*.

Gutiérrez-Rivera, B., Ortiz-Muñiz, B., Gómez-Rodríguez, J., Cárdenas-Cagal, A., Domínguez-García, J.M. y Aguilar-Uscanga, M.G., 2015, Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses B in a mixed yeast culture. *Renewable Energy*. 74, pp. 399-405.

Gutt, S. y Gutt, G., 2009. Factors influencing the fermentation process and ethanol yield. *Romanian Biotechnological Letters*. 14, pp. 4648-4657.

Hashem, M., Zohri, A.N. y Ali, M., 2013. Optimization of the fermentation condition for ethanol production by new thermotolerant yeast strain of *Kluyveromyces sp.* *African journal of microbiology research*. 7, pp 4550-4561.

Imam, T. y Capareda, S., 2011. Fermentation kinetic and ethanol production from different sweet sorghum varieties. 4, pp. 33-40.

Iwahashi, H., Obuchi, K., Fui, A. y Komatsu, Y., 1995. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and molecular biology*. 11. 317-325.

Jan, A. y Chaurasia, S.P., 2014. Bioethanol production in membrane reactor (MRS) system: a review. *Intenrnation journal of environmental research and development*, 4, pp. 387-394.

Klinke, H.B., Thomsen, A.B. y Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre.treatment of biomass. *Applied microbiology and biotechnology*. 66, pp. 10-26.

Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P. y Laopiaboon, P., 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbial Biotechnology*. 23, pp. 1497-1501.

Laopaiboon, L., Naunpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P. y Laopaiboon, P., 2010. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology. Effect of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource technology*. 100, pp. 4176-4182.

Lin, Y., Zhagn, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. y Kong, H., 2012. Factors affectig ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenegy*.

Mathews, C.K., Van Holde, K.G. y Ahern, K.E., 2002. *Bioquímica*. Tercera edición. Editorial Addison-Wesley.

Munnecke, D.M., 1981. Basic principles of ethanol fermentation. *Biomass conversión processes for enegy and fuel*. pp. 339-355.

Nelson. L.D. y Cox, M.M., 2005. *Principios de bioquímica Lehninger*. Cuarta edición. Barcelona: Editorial Omega.

Renewable Energy Policy Network, 2012. Renewable 2012; Global Status Report. [pdf] Disponible en: <
[http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR2012_low%20res_FINAL.p
df](http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR2012_low%20res_FINAL.pdf)> [Consultado el 15 de Noviembre del 2016].

Olbrich. H., 1963. *The Molasses; Fermentation Technologist*, Berlin Institut für Zuckerindustrie.

Partida-Sedas, G., 2017. Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* L. Moench) mejorado genéticamente. Tesis de Doctorado. UNIDA-ITV. México.

Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sánchez, B. y Aguilar-Uscanga, M.G., 2010. Kynetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV 01 yeast isolated from sugar cane molasse. *Journal of Chemical Tecnology & Biotechnology*.

Ortiz-Zamora, O., 2006. Obtención de cepas autóctonas, osmotolerantes, resistentes a altas concentraciones de etanol y con actividad kiler. Tesis de Maestría. UNIDA-ITV. México.

Quintero, J.A., Montoya, M.I., Cardona, C.A. y Sánchez, O.J., 2007. Evaluación de la deshidratación de etanol carburante mediante simulación de proceso. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 5 (2).

Sarmiento-Forero, S. C. y Fajardo-Castillo, E. E, 2007. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Grado: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

Secretaria Nacional de Energía (SENER), 2014. Análisis de la propuesta para la introducción de etanol anhidro en las gasolinas que comercializa Pemex. [pdf] Disponible en: < <http://www.bioenergeticos.gob.mx/wp-content/uploads/2015/08/ANALISIS-Y-PROPUESTA-PARA-INTRODUCIR-ETANOL-ANHIDRO-EN-LAS-GASOLINAS-DE-MEXICO.pdf> > [Consultado el 17 de Noviembre del 2016].

Siqueira, P.F., Karp, S.G., Carvalho, J.C., Sturm, W., Rodríguez-León, J.A., Tholozan, J.L., Singhanía, R.R., Pandey, A. y Soccol, C.R., 2008. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scale. *Bioresource Technology*. 99, pp. 8156-8163.

Souza, C.S., Oliveira, K.F., Trevisan, H.C. y Lluce, C., s.f. A strategy to compare a yeast strain and improve cell survival in ethanol production processes above 30 °C. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*.

Togarepi, E., Mapiye, C., Muchanyereyi, N. y Dzomba, P., 2012. Optimization of fermentation parameters of ethanol production from *Ziziphus mauritiana* fruit pulp using *Saccharomyces cerevisiae* (NA33). *International journal of biochemistry research & review*. 2, pp. 60-69.

Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M. y Mas, A., 2002. Effects of Fermentations temperatura on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Intenational Journal of Food Mycrobiology*. 80, pp. 47-53.

Verduyn, C., Postman, E., Scheffers, W.A. y Van Dijken, J.P., 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 8, pp. 501-517.

Walker, G.M., 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Inglaterra: Jhon Wiley & Sons.