



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A NIVEL INDUSTRIAL

EVALUATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS FOR ETHANOL PRODUCTION AT INDUSTRIAL LEVEL

JUAN PABLO MARISCAL MORENO

INGENIERO QUÍMICO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Manizales, Colombia

2011

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A NIVEL INDUSTRIAL

JUAN PABLO MARISCAL MORENO

INGENIERO QUÍMICO

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:

JUAN CARLOS HIGUITA VÁSQUEZ. PhD

Codirector:

CARLOS ARIEL CARDONA ALZATE. PhD

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS QUÍMICOS, CATALÍTICOS Y BIOTECNOLÓGICOS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Arquitectura

Manizales, Colombia

2011

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincera gratitud a las siguientes personas e instituciones que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo:

A mi familia por su constante apoyo y esfuerzo.

A los profesores del departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales Ph.D. JUAN CARLOS HIGUITA VÁSQUEZ y Ph.D. CARLOS ARIEL CARDONA ALZATE, quienes dirigieron cada una de las etapas del proyecto y apoyaron de excelente forma su realización.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA sede Manizales por el apoyo financiero entregado durante parte de la investigación mediante la figura de ESTUDIANTE AUXILIAR y por facilitar las instalaciones, equipos y materiales necesarios para el correcto desarrollo del proyecto.

A COLCIENCIAS por el apoyo financiero gracias a la beca asignada mediante el programa JÓVENES INVESTIGADORES 2010.

A los integrantes del grupo de investigación en Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos por el interés demostrado y el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto.

RESUMEN

Este trabajo presenta un estudio de la fermentación etanólica empleando melaza de caña de azúcar como sustrato y una cepa aislada de *Saccharomyces cerevisiae*. Se analizan aspectos teóricos sobre fermentaciones y se presentan algunas técnicas de mejoramiento de microorganismos para su uso en procesos fermentativos.

El efecto de la concentración de azúcares totales en el sustrato, la temperatura de fermentación y el pH inicial del medio sobre la productividad de etanol y la viabilidad celular fue evaluado simultáneamente mediante la implementación de un diseño factorial. Los resultados permitieron establecer que las variables más influyentes sobre la productividad de bioetanol son la concentración de azúcares del medio y la temperatura de fermentación. La cepa aislada presentó un mejor comportamiento que la cepa alcohólica ATCC 9763, utilizada en este trabajo como levadura de referencia, y en el rango de valores experimentales se alcanzaron porcentajes de eficiencia de bioetanol entre 61.87% y 95.87%. Las mejores condiciones fueron 22° Bx y 32 °C de acuerdo con la metodología de superficies de respuesta (MSR).

Expresiones matemáticas para la predicción de la productividad de etanol, la generación de biomasa y la eficiencia del proceso fueron calculadas y la correlación indicó que el modelo representa adecuadamente las variables seleccionadas. Dos condiciones de operación fueron evaluadas experimentalmente a nivel piloto (i.e., 1 L y 300 L) y mediante simulación de procesos. Los resultados permitieron establecer la viabilidad energética y económica de procesos realizados a temperaturas elevadas y la adaptación de la cepa aislada a estas condiciones. Este comportamiento permite catalogar esta cepa como una levadura termotolerante.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que los criterios principales seleccionados en el diseño factorial pueden ser generalizados a escalas mayores. Por esta razón, y apoyado en criterios teóricos, se plantea un protocolo de selección de microorganismos aplicado a diferentes escenarios.

Palabras clave: Bioetanol, melaza de caña de azúcar, *Saccharomyces cerevisiae*, tamizaje de levaduras, diseño factorial, simulación de procesos.

ABSTRACT

A study of ethanolic fermentation using sugarcane molasses as substrate and an isolated yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* is presented. The analysis of fermentation processes and a review of techniques for development of new microorganisms are also showed.

The effect of total sugar concentration in the substrate, the fermentation temperature and the initial medium pH on the ethanol productivity and cell viability were simultaneously evaluated by implementing a factorial experimental design. The results indicate that the most influential variables on the productivity of bioethanol are the concentration of sugars in the medium and the fermentation temperature. The isolated strain presented a better performance than the alcoholic strain ATCC 9763, used in this work as reference yeast with efficiencies of bioethanol production between 61.87% and 95.87% of the theoretical value. The best fermentation conditions were 22°Bx and 32°C according to the response surface methodology (RSM) results.

Mathematical expressions for the prediction of the bioethanol productivity, biomass generation and product yielding were calculated and the correlation attained indicated that the model adequately represents the selected variables. Two conditions of high bioethanol yielding were evaluated at pilot level (i.e., 1 L and 300 L) and using process simulation. The results show the energetic and economical profitability of the processes performed at elevated temperatures and the good adaptation of the isolate strain to these conditions. The isolated strain could be catalogued as a thermotolerant strain since it reached high levels of efficiency at 38°C.

The obtained results demonstrate that the criteria selected in the factorial design can be generalized to larger scales. For this reason, and supported by theoretical approaches, a protocol for the selection of microorganisms applied to different scenarios are presented.

Keywords: Bioethanol, sugarcane molasses, *Saccharomyces cerevisiae*, yeasts screening, factorial design, process simulation.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIACIONES	IX
LISTADO DE FIGURAS.....	XI
LISTADO DE TABLAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN	XV
CAPÍTULO 1: PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA	1
1.1. PROCESOS FERMENTATIVOS A NIVEL INDUSTRIAL.....	1
1.2. PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA	2
1.3. CONCLUSIÓN	12
CAPÍTULO 2: FACTORES AMBIENTALES, CONDICIONES DE ESTRÉS Y MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN PROCESOS FERMENTATIVOS	15
2.1. FACTORES DE INFLUENCIA EN LA FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS AZUCARADOS... ..	16
2.2. MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA.....	18
2.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE FERMENTACIÓN	22
2.4. ÉXITO DE LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS Y DE NUEVAS CONDICIONES DE OPERACIÓN A NIVEL INDUSTRIAL.....	24
2.5. CONCLUSIÓN	24
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	25
3.2. MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS.....	26
3.3. MÉTODOS	27
3.4. FERMENTACIONES A NIVEL DE LABORATORIO (APLICACIÓN DEL DISEÑO FACTORIAL).....	28
3.5. FERMENTACIONES DE 1 L, 80 L Y 300 L	28

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE FACTORES EN LA FERMENTACIÓN DE MELAZA UTILIZANDO LEVADURA	31
4.1. EVALUACIÓN DE FACTORES DE FERMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR	32
4.2. DISEÑO FACTORIAL 2 ⁴	32
4.3. DISEÑO FACTORIAL COMPUESTO CENTRAL.....	39
4.4. FERMENTACIÓN DE MELAZAS A NIVEL PILOTO BAJO CONDICIONES ANAERÓBICAS.	47
4.5. SIMULACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO Y ANÁLISIS ECONÓMICO	50
4.6. FERMENTACIONES BAJO CONDICIONES DE AEROBIOSIS (EVALUACIÓN DEL EFECTO CRABTREE)	56
4.7. CONCLUSIÓN	59
CAPÍTULO 5: PROTOCOLO PARA LA SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA	61
5.1. CONSIDERACIONES INICIALES	62
5.2. CRITERIOS PRINCIPALES PARA LA SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.....	63
5.3. ESQUEMA GENERAL DE PROTOCOLO DE SELECCIÓN.....	66
5.4. CONCLUSIÓN	69
CONCLUSIONES GENERALES	71
PERSPECTIVAS FUTURAS	73
REFERENCIAS	75

LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIACIONES

Tabla I: Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad	Ecuación
A, B, C, D	Denominación de los factores en el diseño factorial	-	-
a, b	Constantes ajustadas	-	Ec.16
b	Coefficiente de regresión	-	Ec. 4
$^{\circ}Bx$	Grados brix	-	-
$DCEL$	Generación de biomasa	cel/ml	-
ETA	Concentración de etanol	g/L	-
e	Error ajuste	-	Ec. 4
$\%E$	Porcentaje de eficiencia de la producción de etanol con respecto al valor teórico	-	Ec. 7
$^{\circ}GL$	Grados Gay Lussac	-	-
K_i	Parámetro de inhibición de sustrato	m^3/kg	Ec. 13
K_s	Parámetro de saturación de sustrato	kg/m^3	Ec. 13
LO_i	Denominación cepas utilizadas	-	-
m_p	Constante de Luedeking–Piret no asociada al crecimiento	$kg/kg\ h$	Ec. 14
m_x	Parámetro límite de rendimiento celular	$kg/kg\ h$	Ec. 15
P	Concentración de producto	g/L	Ec. 12 - 13
P_{max}	Concentración de producto cuando el crecimiento celular se detiene	kg/m^3	Ec. 13
r_p	Tasa de formación de producto	$g/L\ h$	Ec. 14
r_s	Tasa de consumo de sustrato	$g/L\ h$	Ec. 15
r_x	Tasa de formación de biomasa	$g/L\ h$	Ec.13
S	Concentración de sustrato (azúcares totales)	g/L	Ec. 11, Ec.14
T	Temperatura	$^{\circ}C$	
TDP	Parámetros dependientes de la temperatura	-	Ec. 16
X	Denominación de las variables independientes en el diseño factorial	-	-
X	Concentración de biomasa	cel/ml	Ec. 13 - 15
X_{max}	Concentración de biomasa cuando el crecimiento celular se detiene	kg/m^3	Ec. 13
Y	Denominación de las variables de respuesta en el diseño factorial	-	-
Y_i	Respuesta ajustada	-	Ec. 4
Y_{ps}	Rendimiento producto sustrato. Gramos de etanol producidos por gramo de sustrato consumido	g/g	Ec. 6
Y_{px}	Constante de Luedeking–Piret asociada al crecimiento	kg/kg	Ec. 14
Y_x	Parámetro limite de rendimiento celular	kg/kg	Ec. 15

Tabla II: Siglas y abreviaciones

Término	Significado
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AR	Azúcares reductores
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
DNS	Ácido dinitrosalicílico. Reactivo utilizado para la cuantificación de azúcares reductores
DQO	Demanda química de oxígeno
ED	Entner Doudoroff
EMP	Embden Meyerhoff Parnas
ENO	Enolasa
FBA	Fructosa bifosfato aldolasa
FRK	Fructoquinasa
GLK	Glucoquinasa
GPDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HXK	Hexoquinasa
KDPA	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa
LS	Levanosacarasa
MSR	Metodología de superficie de respuesta
PDC	Piruvato descarboxilasa
PFK	Fosfofructoquinasa
PGD	6-fosfogluconato deshidratasa
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
PGK	3-fosfoglicerato quinasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
PK	Piruvato quinasa
RPM	Revoluciones por minuto
TDH	Triosa fosfato deshidrogenasa
TDI	Triosa fosfato isomerasa

Tabla III: Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad	Ecuación
μ_{max}	Tasa específica máxima de crecimiento	h^{-1}	Ec.13

Tabla IV: Subíndices

Subíndice	Término	Ecuación
O	Condición inicial	-
F	Condición final	-
i, j, k	Contadores sumatorias	Ec. 4

Tabla V: Superíndices

Superíndice	Término	Ecuación
m	Parámetro de inhibición celular	Ec. 13
n	Parámetro de inhibición de producto	Ec. 13

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Requerimientos generales de un proceso fermentativo	3
Figura 2: Ruta Embden Meyerhoff Parnas para la producción de etanol en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 3: Ruta Entner Doudoroff para la producción de etanol en <i>Zymomonas mobilis</i>	12
Figura 4: Principales factores de influencia sobre levaduras silvestres	16
Figura 5: Esquema general de un programa de mejoramiento y selección de microorganismos	19
Figura 6: Esquema detallado de un procedimiento de selección o tamizaje de microorganismos de interés industrial	21
Figura 7: Evolución de azúcares reductores durante la hidrólisis a 90 °C.....	26
Figura 8: Cromatograma de una muestra de melaza diluida	27
Figura 9: Crecimiento de la cepa LO ₁ en agar de melaza	28
Figura 10: Biorreactor marca Biotrón®	29
Figura 11: Resultados generales diseño factorial 2 ⁴	34
Figura 12: Representación gráfica de los efectos sobre ETA	35
Figura 13: Representación gráfica de los efectos sobre DCEL.....	35
Figura 14: Comparación entre los valores teóricos y experimentales para la producción de etanol.....	36
Figura 15: Comparación entre los valores teóricos y experimentales para la generación de biomasa	36
Figura 16: Comparación entre las cepas ATCC 9763 y LO ₁ con respecto a la producción de etanol.....	39
Figura 17: Comparación entre las cepas ATCC 9763 y LO ₁ con respecto a la generación de biomasa	39
Figura 18: Resultados generales diseño factorial compuesto central.....	41
Figura 19: Resultados generales del diseño factorial compuesto central en función de la temperatura y la concentración de azúcares. Producción de etanol (a) y generación de biomasa (b).....	42
Figura 20: Representación gráfica de los efectos sobre ETA	43
Figura 21: Representación gráfica de los efectos sobre DCEL.....	43

Figura 22: Superficie de respuesta para la producción de bioetanol como función de la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación	44
Figura 23: Superficie de respuesta para la generación de biomasa como función de la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación	45
Figura 24: Porcentaje de consumo de sustratos con respecto a la temperatura de fermentación	45
Figura 25: Ajuste del modelo cinético para la Condición 1 (a) y la Condición 2 (b)	50
Figura 26: Diagrama de la producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar....	50
Figura 27: Relación entre el bioetanol producido, vinaza generada y melaza alimentada para la Condición 1 y la Condición 2	54
Figura 28: Requerimientos energéticos del proceso bajo la Condición1 y la Condición 2	55
Figura 29: Evolución de la fermentación Crabtree 1.....	57
Figura 30: Evolución de la fermentación Crabtree 2.....	58
Figura 31: Esquema de protocolo de selección de microorganismos para la producción de etanol.....	67

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Principales productos generados a nivel industrial empleando microorganismos	2
Tabla 2: Productores mundiales de bioetanol	3
Tabla 3: Producción anual de alcohol carburante en Colombia y venta al mercado nacional	4
Tabla 4: Composición del jugo crudo de caña de azúcar.....	6
Tabla 5: Composición del jugo crudo de remolacha azucarera	6
Tabla 6: Composición promedio de las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera	7
Tabla 7: Producción anual, mercado nacional y exportaciones de melaza de caña de azúcar en Colombia.....	7
Tabla 8: Ventajas y desventajas según disponibilidad y costos de diferentes materiales para fermentación	8
Tabla 9: Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial.....	9
Tabla 10: Reportes en la literatura científica sobre parámetros evaluados en fermentaciones etanólicas	18
Tabla 11: Microorganismos utilizados en el desarrollo experimental.....	25
Tabla 12: Cantidades mínimas de nutrientes recomendadas para fermentar 100 kg de melaza	26
Tabla 13: Factores seleccionados y dominio experimental establecido en el diseño factorial 2 ⁴	33
Tabla 14: Matriz de experimentos para el diseño factorial 2 ⁴	33
Tabla 15: Efectos estimados para las variables de respuesta ETA y DCEL	34
Tabla 16: Resultado ANOVA para el diseño factorial 2 ⁴	35
Tabla 17: Factores seleccionados y dominio experimental del diseño factorial compuesto central.....	40
Tabla 18: Matriz de experimentos para el diseño factorial compuesto central	40
Tabla 19: Rendimiento de etanol y eficiencia alcanzada en cada experimento del diseño factorial compuesto central.....	41
Tabla 20: Efectos estimados para las variables de respuesta ETA y DCEL para el diseño factorial compuesto central.....	43
Tabla 21: Resultado ANOVA para el diseño factorial compuesto central	44

Tabla 22: Condiciones iniciales de fermentaciones a nivel piloto.....	48
Tabla 23: Comparación de eficiencias alcanzadas a nivel experimental y piloto	48
Tabla 24: Parámetros ajustados para el modelo cinético	49
Tabla 25: Información principal utilizada en la simulación del proceso.....	52
Tabla 26: Precios utilizados en el análisis económico.....	53
Tabla 27: Flujos másicos y composiciones de algunas corrientes de proceso para la producción de bioetanol bajo la Condición 1.....	53
Tabla 28: Flujos másicos y composiciones de algunas corrientes de proceso para la producción de bioetanol bajo la Condición 2.....	53
Tabla 29: Costos de producción de bioetanol para la Condición 1 y Condición 2	55
Tabla 30: Costos de producción de bioetanol a partir de diferentes materias primas.....	56
Tabla 31: Condiciones iniciales de fermentación Crabtree	57
Tabla 32: Resultado de fermentaciones Crabtree	57
Tabla 33: Criterios principales para la selección de microorganismos de acuerdo con la materia prima.....	63

INTRODUCCIÓN

El auge actual de los biocombustibles y la necesidad de aumentar su producción a nivel nacional e internacional ha impulsado la investigación concerniente a la obtención de bioetanol a partir de diferentes materias primas, empleando diferentes microorganismos y bajo diferentes tecnologías.

La rentabilidad de la producción de bioetanol depende de la disponibilidad y costo de las materias primas utilizadas, de la eficiencia del proceso de conversión biológica, del tipo de microorganismo empleado y de la configuración de la etapa de separación de productos y subproductos [1]. Aunque este bioproceso puede ser mejorado en cada una de las fases descritas, el éxito de las modificaciones en las etapas de pretratamiento de materias primas y de purificación de productos depende en cierta medida de la fermentación, más específicamente de las características metabólicas y fisiológicas del microorganismo utilizado. La producción nacional de etanol a nivel industrial (para consumo humano y biocombustible) está fundamentada en la utilización de materias primas provenientes del proceso de producción de azúcar [2]. Por esta razón y debido a la alta demanda de bioetanol, la disponibilidad de estos materiales ha disminuido y sus costos han aumentado lo que hace necesario elevar los rendimientos del proceso o buscar nuevas alternativas de materias primas, para lo cual emplear microorganismos apropiados es importante [3].

Seleccionar microorganismos adecuados para la fermentación, cuyas características metabólicas se ajusten con el tipo de sustrato, las condiciones de operación y otros requerimientos particulares, permite maximizar la productividad de etanol y tener un mejor control y conocimiento del proceso desarrollado [4]. Debido a que la fermentación etanólica es un proceso complejo y dada la cantidad de variables que intervienen, los procedimientos de selección de microorganismos no son realizados con frecuencia en las industrias productoras de bioetanol. Esto se debe principalmente a los elevados costos de experimentación, a los altos requerimientos de tiempo y de personal especializado además de la carencia de estudios que generen criterios y presenten herramientas claras para la valoración y selección de microorganismos, especialmente aquellos enfocados a la utilización de materias primas azucaradas.

De esta manera, el desarrollo de un trabajo experimental que estandarice algunas de las técnicas microbiológicas particulares de procesos de producción de bioetanol y genere un protocolo de selección basado en el efecto generado por las principales variables de operación, es de utilidad para disminuir los requerimientos de los procedimientos de selección. Este desarrollo soportado en la evaluación del comportamiento de microorganismos utilizando diseño experimental y simulación de procesos aumenta el conocimiento y las herramientas para la selección de condiciones de fermentación. Esto puede permitir emplear microorganismos aislados que presenten una mayor adaptación a las condiciones de operación impuestas en procesos fermentativos a nivel piloto e industrial.

A partir de la justificación acerca de la necesidad de establecer criterios de selección de microorganismos, este trabajo se fundamenta en la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

Es posible elaborar un protocolo general que presente herramientas para la evaluación y criterios para la selección de microorganismos (entre un conjunto de posibilidades) que se ajusten a condiciones de proceso y a sustratos definidos, generando rendimientos elevados en la producción de etanol en sistemas de fermentación en estado líquido.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto generado por las variables de operación más representativas sobre el comportamiento y productividad de algunos microorganismos en la fermentación etanólica (fase líquida) de sustratos azucarados a escala laboratorio y piloto.

ESPECÍFICOS

1. Implementar y documentar técnicas microbiológicas de aislamiento, incubación, reactivación y siembra de microorganismos, que son necesarios en los ensayos de laboratorio por realizar y que se ajusten a las características de cada microorganismo por evaluar.
2. Aplicar un modelo teórico para estudiar y predecir como la fermentación alcohólica es afectada por factores como tiempo de fermentación, temperatura, concentración de azúcares totales, entre otros, así como el efecto de su interacción.
3. Analizar los principales factores que afectan los procesos de fermentación y que han de ser evaluados en la simulación del proceso y en su seguimiento a escala piloto.
4. Generar un protocolo global para el análisis y selección de microorganismos para la producción de etanol a partir de una materia prima determinada.

CAPÍTULO 1

PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA

El etanol (C_2H_5OH) también conocido como alcohol etílico, como alcohol carburante cuando es empleado como combustible o aditivo a la gasolina, o como bioetanol si es obtenido a partir de biomasa (i.e., materias primas ricas en azúcar, almidón o lignocelulosa), es el alcohol más ampliamente utilizado en el sector transporte a nivel mundial. Su uso masivo como fuente energética es reciente, mientras que las aplicaciones como bebida, solvente, antiséptico, etc. son muy antiguas. Por esta razón, los avances investigativos concernientes a la producción de este compuesto químico son muy amplios y tienen enfoques hacia cada una de las partes que componen la cadena productiva, estimulado actualmente por su aplicación como combustible y justificado en los beneficios ambientales que su uso conlleva.

En este capítulo se presentan generalidades acerca de procesos fermentativos, enfocándose principalmente en la producción de bioetanol, considerando los sustratos empleados y los principales microorganismos con capacidad productora.

1.1. PROCESOS FERMENTATIVOS A NIVEL INDUSTRIAL

1.1.1. PRINCIPALES PRODUCTOS GENERADOS VÍA FERMENTATIVA

La importancia de la implementación de procesos microbiológicos a nivel industrial se refleja en la enorme cantidad y usos de productos elaborados a partir de diversos microorganismos. El término fermentación ha tenido diferente significado para bioquímicos y para microbiólogos industriales. En un sentido bioquímico está relacionado con la generación de energía por el catabolismo de componentes orgánicos [5], mientras que en un contexto industrial se asocia con “cualquier proceso microbiano a gran escala realizado aeróbica o anaeróbicamente” [6]. Gracias a la gran variedad fisiológica y bioquímica de las células, es posible efectuar procesos productivos diversos enfocados a las industrias de alimentos y bebidas, industria farmacéutica y a la industria química entre otras muchas industrias. La Tabla 1 [5,7-9] muestra algunos productos manufacturados empleando microorganismos como agentes productores. Al ser la fermentación un proceso bioquímico, es esencial que cumpla con algunos requerimientos que van desde la identificación y elección del agente microbiano, hasta el mercadeo del metabolito producido a gran escala. Estos requerimientos se resumen en la Figura 1 [8].

Tabla 1: Principales productos generados a nivel industrial empleando microorganismos [5,7-9]

Producto	Microorganismo
Biomasa	
Cultivos "starter"	Bacterias ácido lácticas Levadura de panadería
Proteína celular	<i>Pseudomonas methylophilus</i> <i>Candida utilis</i>
Productos orgánicos	
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido glucónico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido láctico	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Ácido itacónico	<i>Aspergillus itaconicus</i>
Etanol	<i>Saccharomyces spp.</i>
Acetona / Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Polisacáridos extracelulares	
Dextrano	<i>Leuconostoc spp.</i>
Xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>
Enzimas	
α - Amilasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Glucoamilasa	<i>Aspergillus niger</i>
Celulasa	<i>Aspergillus spp.</i>
	<i>Trichoderma spp.</i>
Glucosa isomerasa	<i>Bacillus coagulans</i>
Lactasa	<i>Aspergillus spp.</i>
	<i>Kluyveromyces spp.</i>
Pectinasa	<i>Aspergillus niger</i>
Lipasa	<i>Mucorspp.</i>
	<i>Aspergillus spp.</i>
Proteasa	<i>Bacillus spp.</i>
	<i>Aspergillus spp.</i>
Quimosina	<i>Mucorspp.</i>
Vitaminas y aminoácidos	
B12	<i>Pseudomonas spp.</i>
L-Lisina	<i>Corynebacterium spp.</i>
Farmacéuticos	
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
	<i>Bacillus spp.</i>
Insulina	<i>E. coli (recombinante)</i>

1.2. PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA

La producción de etanol por la acción de levaduras sobre malta o extractos de fruta ha sido llevada a cabo a gran escala por muchos años y fue el primer proceso industrial para la producción de un metabolito microbiano. Es por la vía fermentativa que se obtiene la mayor cantidad de etanol a nivel mundial. El 95% del etanol en el mundo se obtiene por fermentación a partir de materias primas que contengan carbohidratos [10].

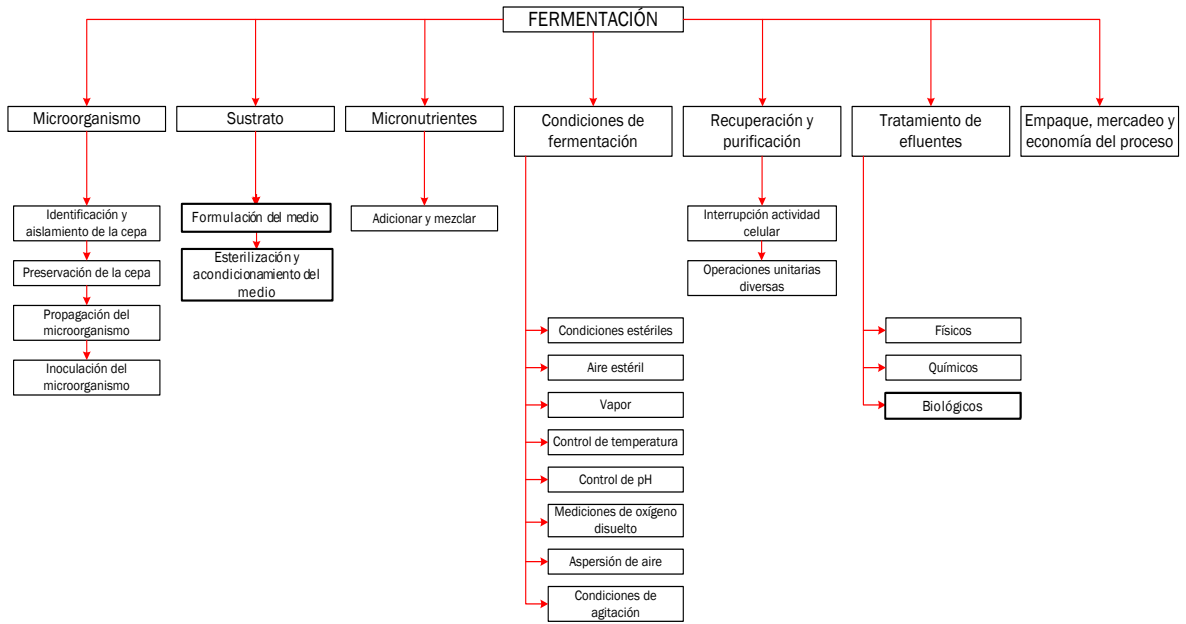


Figura 1: Requerimientos generales de un proceso fermentativo [8]

La gran aplicabilidad del etanol en procesos tradicionales (e.g., solvente, alimento, bebidas, etc.) y el actual interés que presenta como combustible líquido, promovido como solución para una variedad de problemas complejos relativos a energética y medio ambiente, lo convierten en uno de los compuestos de mayor importancia para la industria química y de mayores prospectos en el futuro, siendo por ejemplo el mercado de alcohol carburante el de más rápido crecimiento en América y Europa [11,12]. La obtención de combustibles líquidos para el sector transporte a partir de biomasa renovable ha sido un campo antiguo de investigación [13] que arroja resultados con gran velocidad. Muestra de ello es el crecimiento de la producción de bioetanol en aproximadamente 10% cada año durante la última década [14], destacándose la producción de Estados Unidos y Brasil, cuyas cifras se presentan en la Tabla 2 [15].

Colombia ocupa el puesto 15 entre los productores mundiales de etanol, con un creciente aumento en las cifras desde el inicio de la producción en 2005, año en el cual los ingenios azucareros incluyeron este compuesto como un coproducto de la cadena azucarera, estimulado gracias a la política de biocombustibles establecida desde el año 2001 [2]. La Tabla 3 [15] presenta las cifras de producción y comercialización nacional del bioetanol.

Tabla 2: Productores mundiales de bioetanol [15]

Productor	Producción anual (millones de litros)							
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Estados Unidos	7942	9416	11885	14158	16044	19689	26008	36399
Brasil	11525	12735	14568	15344	16120	17703	22221	27092
Unión Europea	2628	2559	2506	2491	2811	3402	3587	4315
China	3050	3150	3400	3500	3500	3550	3900	4150
India	1422	1397	1392	1133	1215	1780	2077	2100
Otros Europa	1262	1322	1379	1335	1379	1288	1359	1318

Productor	Producción anual (millones de litros)							
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Otros Asia	1102	1010	1078	915	875	1159	1160	1009
Canadá	333	330	330	330	355	365	800	1000
Otros Norte y Centroamérica	409	390	407	423	446	519	373	642
Otros Suramérica	428	411	444	472	454	498	553	584
Tailandia	77	202	207	247	309	390	411	577
Pakistán	42	63	80	100	137	230	350	405
Suráfrica	346	353	358	385	404	409	378	382
Otros África	164	161	182	198	204	220	274	302
Colombia	0	0	0	0	27	266	272	256
Oceanía	176	182	164	149	149	172	203	224
Total	30906	33681	38380	41180	44429	51640	63926	80755

Tabla 3: Producción anual de alcohol carburante en Colombia y venta al mercado nacional [15]

Año	2005	2006	2007	2008	2009
Producción (millones de litros)	27	266	272	256	325
Ventas al mercado nacional (millones de litros)	23	262	283	247	339

1.2.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRODUCCIÓN Y USO DE ALCOHOL CARBURANTE

Los combustibles de segunda generación, categoría en la cual se incluye el bioetanol, además de surgir como alternativa tras el agotamiento de los combustibles fósiles cuentan con una gran cantidad de beneficios debido principalmente a su naturaleza renovable (proceden de materias primas agrícolas o de residuos agroindustriales y urbanos principalmente) y trascienden gracias al menor impacto ambiental generado por su uso en comparación con los combustibles tradicionales [12]. Los beneficios de su uso son claros y profundamente investigados y reportados, pero algunas desventajas son generadas especialmente durante su producción. De una forma más clara, se presentan a continuación las principales ventajas y desventajas de la implementación de bioetanol como alcohol carburante.

Ventajas del empleo de alcohol carburante

- El mayor contenido de oxígeno y el alto número de octano permite reducir las emisiones de hidrocarburos, monóxido de carbono y material particulado. Además las emisiones de dióxido de carbono se catalogan neutrales, es decir, no tienen efecto neto sobre las emisiones globales de este gas de efecto invernadero, ya que el bioetanol es producido a partir de cultivos que en su crecimiento captan este gas durante la fotosíntesis [1].
- Surge como alternativa para la utilización de excedentes de la producción agrícola y/o residuos de la actividad agroindustrial, aumentando las ganancias de los pequeños productores siendo así un alivio ambiental, porque disminuye la cantidad de residuos generados por las empresas agroindustriales [12].

Desventajas del empleo de alcohol carburante

- La destinación de materias primas antes consideradas residuos para la producción de bioetanol afectaría la actividad de otros sectores productivos, ya que la disminución de la oferta de estos subproductos generaría un aumento en los costos de insumos. Tal es el caso de los sectores sucroquímico, de alimentos concentrados para animales, de alcohol bebida, de levadura de panificación, entre otros, los cuales emplean residuos de la industria azucarera como materia prima de sus procesos productivos [16].
- La producción de cultivos como el maíz y la caña de azúcar producen la erosión del suelo y presentan requerimientos de fertilizantes mayores a la de cualquier otro cultivo [1].
- La seguridad alimentaria mundial puede estar en riesgo si las principales materias primas para la producción de bioetanol siguen siendo productos agroindustriales. La rentabilidad tan alta del negocio del bioetanol (y en general de los biocombustibles como el biodiesel) puede generar que zonas productivas sean exclusivamente dedicadas al cultivo de materiales azucarados, amiláceos, lignocelulósicos u oleaginosos, disminuyendo con esto el área posible para cultivos dedicados al mantenimiento de la seguridad alimentaria [14].

1.2.2. MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS COMO SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

El bioetanol puede ser producido a partir de materias primas que contienen azúcares fermentables tales como la caña de azúcar y la remolacha azucarera, materiales que son ricos en sacarosa. Otras materias primas incluyen algunos polisacáridos que pueden ser hidrolizados para obtener azúcares asimilables por microorganismos productores de etanol. El almidón es el principal polímero utilizado actualmente para la producción de etanol, mientras que la biomasa lignocelulósica es la materia prima más promisoría debido a su gran disponibilidad y bajo costo. Actualmente la producción de bioetanol a partir de residuos o materiales lignocelulósicos está lejos de alcanzar niveles comerciales debido a las limitaciones microbiológicas y tecnológicas [1,12]. Con mayor detalle se presentan a continuación las diferentes materias primas y sus requerimientos para ser implementados en la producción de etanol.

Materiales ricos en azúcar

La caña de azúcar y la remolacha azucarera son las principales materias primas ricas en azúcares asimilables para la fermentación etanólica. El jugo extraído durante su procesamiento y las melazas obtenidas como subproducto de la generación de azúcar son los sustratos más utilizados por las industrias dedicadas a la generación de bioetanol. El cultivo de la caña de azúcar prevalece en los países tropicales como Brasil y Colombia y es la materia prima utilizada para la producción de este compuesto [17]. Por su parte, la remolacha azucarera es principalmente empleada por países europeos, pero las características climáticas de países como Colombia hacen de este cultivo una alternativa más para la generación de alcohol [11].

Dentro de las principales ventajas de las melazas y jugos de caña o remolacha azucarera, se destaca la integración ingenio azucarero – destilería, que aumenta en gran medida la rentabilidad de la producción de bioetanol [14] y los requerimientos para el pretratamiento son menores que aquellos necesarios para los materiales amiláceos y lignocelulósicos.

Algunas de las materias primas ricas en azúcares que son utilizadas en la producción de bioetanol se presentan a continuación.

Jugos de caña de azúcar y de remolacha azucarera

El jugo de caña es un líquido de color verdoso obtenido durante la molienda de la caña azucarera, primera etapa de la producción de azúcar. Su composición es muy variable de acuerdo con la variedad de caña cultivada, la región de la cual proviene y las condiciones de la molienda, pero valores promedio de la composición de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera son presentados en la Tabla 4 [2,11] y la Tabla 5 [18] respectivamente.

Tabla 4: Composición del jugo crudo de caña de azúcar [2,11]

Componente	Contenido (%w/w)
Agua	81 - 85
Sólidos solubles	15 - 19
Sales	0.23 - 0.67
Proteínas	0.08 - 0.11
Gomas - Almidones	0.05 - 0.11
Sacarosa	12.5 - 16.72
Glucosa	0.3 - 0.76
Fructosa	0.3 - 0.76
Materia orgánica (no azúcares)	0.5 - 1
Compuestos inorgánicos	0.2 - 0.6
Cuerpos nitrogenados	0.5 - 1

Tabla 5: Composición del jugo crudo de remolacha azucarera [18]

Componente	Contenido (%w/w)
Sólidos	17.3
Sacarosa	16.5
Rafinosa	0.07
Monosacáridos	0.15
Polisacáridos	0.019
Nitrógeno total	0.105
Sodio	0.015
Potasio	0.125
Cloruros	0.003
Nitritos	0.005
Nitratos	0.015
Fosfatos	0.047
Sulfatos	0.0199

Aunque el contenido de azúcares directamente asimilables por los microorganismos es bajo, la hidrólisis de la sacarosa es un procedimiento eficiente y sencillo, el cual se realiza a temperaturas de 90°C y valores de pH de 4, aproximadamente. Este es un requerimiento importante para garantizar la alta conversión de azúcar en etanol durante el metabolismo fermentativo de la levadura o de otro microorganismo que asimile glucosa y/o fructosa.

Melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera

La melaza es un subproducto del proceso de obtención de azúcar, generado durante las etapas de cristalización por evaporación y centrifugación de la masa cocida procedente de los evaporadores. Es un líquido viscoso, espeso y con una concentración más alta de impurezas y sales minerales en comparación con los jugos crudos. La composición de esta materia prima es muy variable, dependiente de las características del cultivo de la caña o de la remolacha azucarera, del tipo y eficiencia del procesamiento en el ingenio y de las características de su almacenamiento. Lo anterior implica una gran variación en el contenido de azúcares y demás nutrientes, así como en el color, viscosidad, sabor y aroma. La composición de las melazas de caña de azúcar y de remolacha se presenta en la Tabla 6 [11].

Tabla 6: Composición promedio de las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera [11]

Ítem	Unidad	Caña de azúcar	Remolacha azucarera
°Bx		79.5	79.5
Gravedad específica		1.41	1.41
Sólidos totales		75	77
Azúcares totales		46	48
Proteína cruda		3	6
Cenizas		8.1	8.7
Calcio	(%w/w)	0.8	0.2
Fósforo		0.08	0.03
Potasio		2.4	4.7
Sodio		0.2	1
Cloro		1.4	0.9
Azufre		0.5	0.5

Las melazas de caña de azúcar se han venido utilizando en nuestro país como materia prima principalmente en la producción de alimentos para animales, y en la industria microbiológica para la producción de una gran variedad de sustancias y materiales como la levadura de panificación, ácido cítrico y etanol (incluyendo el etanol para consumo humano). En este último caso su bajo costo y gran disponibilidad la hacen una materia prima ampliamente utilizada [19,20]. La producción nacional de melazas y especialmente la oferta al mercado nacional y extranjero ha disminuido en los últimos años debido a su uso directo por parte de los ingenios azucareros para la producción de alcohol carburante. La Tabla 7 presenta estas cifras [15].

Tabla 7: Producción anual, mercado nacional y exportaciones de melaza de caña de azúcar en Colombia [15]

Año	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Producción (toneladas)	489.3	480.3	572.5	594.6	618.5	581.3	270.2	250.3	226.5	278.6
Mercado Nacional	400.1	402.8	411.8	427.6	470.9	404.1	235.6	233.2	218.2	243.1
Exportaciones	89.2	28.5	145.6	113.6	130	106.1	36	142	0	24.6

Materiales amiláceos

El almidón es un polímero compuesto exclusivamente por unidades de glucosa, lo que lo constituye una materia prima muy importante para la producción de etanol. Tradicionalmente

esta materia prima se ha utilizado para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas, pero para su conversión en bioetanol con rendimientos elevados es necesaria la degradación del almidón hasta glucosa [11].

Este tipo de materia prima es utilizado masivamente en Norte América y Europa donde se utiliza el maíz, el trigo y otros cereales para la producción de etanol vía fermentativa previo pretratamiento del material e hidrólisis del almidón. En países tropicales otros cultivos ricos en almidón como los tubérculos, pueden ser implementados a nivel industrial para la generación de alcohol [11].

Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son una fuente de gran disponibilidad, dada su naturaleza de desecho agroindustrial, pero al igual que las materias primas amiláceas requieren de tratamientos preliminares para la degradación de los polisacáridos a unidades de azúcar asimilables por los microorganismos fermentadores. Estas técnicas conllevan costos que no hacen viable su implementación a nivel industrial en la actualidad, pero investigaciones científicas avalan su uso masivo en los próximos años. Los materiales más estudiados y cuya potencialidad ha sido determinada son el bagazo de caña, el rastrojo de maíz, pajas de cereales, residuos sólidos urbanos y pastos, entre otros. Algunas ventajas y desventajas de los diferentes sustratos se presentan en la Tabla 8 [11].

Tabla 8: Ventajas y desventajas según disponibilidad y costos de diferentes materiales para fermentación [11]

Material	Disponibilidad	Costos	
		Materia prima	Procesamiento
Azúcares	Relativa *	Bajo *	Moderado
Amiláceos	Alta	Bajo	Alto **
Lignocelulósicos	Muy Alta	Muy Bajo	Muy Alto **

*De acuerdo con su disponibilidad y otros usos a nivel industrial

**Requieren pretratamiento para su asimilación

1.2.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ETANOL

Una gran cantidad de microorganismos se reportan en la literatura para la producción de etanol a escala de laboratorio, pero muy pocos de estos tienen aplicación actualmente a nivel industrial. Cepas silvestres de diferentes microorganismos, por sus características bioquímicas, asimilan diferentes compuestos transformándolos en etanol, pero sus bajos rendimientos, su difícil propagación, la generación de subproductos, el estrecho abanico de sustratos asimilables, su baja tolerancia a distintas sustancias y condiciones, entre otras características, hacen que solo unas pocas tengan actual y exitosa aplicación a escala piloto o industrial.

Los microorganismos más utilizados son las levaduras, siendo diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las de mayor aplicación así como algunas bacterias, destacándose la *Zymomonas mobilis*. La Tabla 9 [12,14] resume algunos de los microorganismos utilizados y/o investigados para la producción de etanol a partir de diversos sustratos.

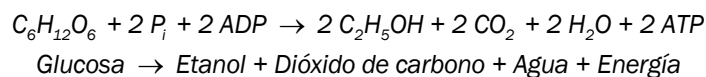
Saccharomyces cerevisiae

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es el organismo universal para la producción de bioetanol usando materias primas ricas en azúcar y almidón, razón por la cual esta levadura constituye uno de los más importantes microorganismos para el campo de la biotecnología [21]. Este microorganismo (el cual es usado actualmente para la producción de bioetanol en países como Brasil, Estados Unidos y Colombia) presenta grandes ventajas bioquímicas y fisiológicas, además de contar con miles de años de adaptación y domesticación.

Tabla 9: Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial [12,14]

Microorganismo	Sustratos fermentables	Condiciones de fermentación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa	Anaeróbico 30 - 37 °C
	Fructosa	
	Sacarosa	
	Maltosa	
	Maltotriosa	
	Galactosa	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Manosa	Anaeróbico 30 - 35 °C
	Glucosa	
	Fructosa	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Maltosa	Anaeróbico 40 - 45 °C
	Sacarosa	
<i>Candida shehatae</i>	Glucosa	Microaerofílico 20 - 31 °C
	Xilosa	
<i>Pichia stipitis</i>	Glucosa	Microaerofílico 26 - 35 °C
	Xilosa	
<i>Pachisolen tannophilus</i>	Glucosa	Microaerofílico
	Xilosa	
	Glicerol	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glucosa	Anaeróbico 30 °C
	Fructosa	
	Sacarosa	
<i>Clostridium thermocellum</i>	Glucosa	Anaeróbico 55 - 65 °C
	Celulosa	
<i>Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum</i>	Glucosa	Anaeróbico 60 °C
	Xilosa	

La producción de etanol es llevada a cabo vía glucolítica, también conocida como la ruta de Embden Meyerhoff Parnas (EMP), en la cual la glucosa es transformada en etanol bajo condiciones anaeróbicas. Un esquema de esta ruta es presentado en la Figura 2 [14] y la Ecuación 1 expresa la producción de etanol a partir de glucosa por esta ruta.



Ec. 1

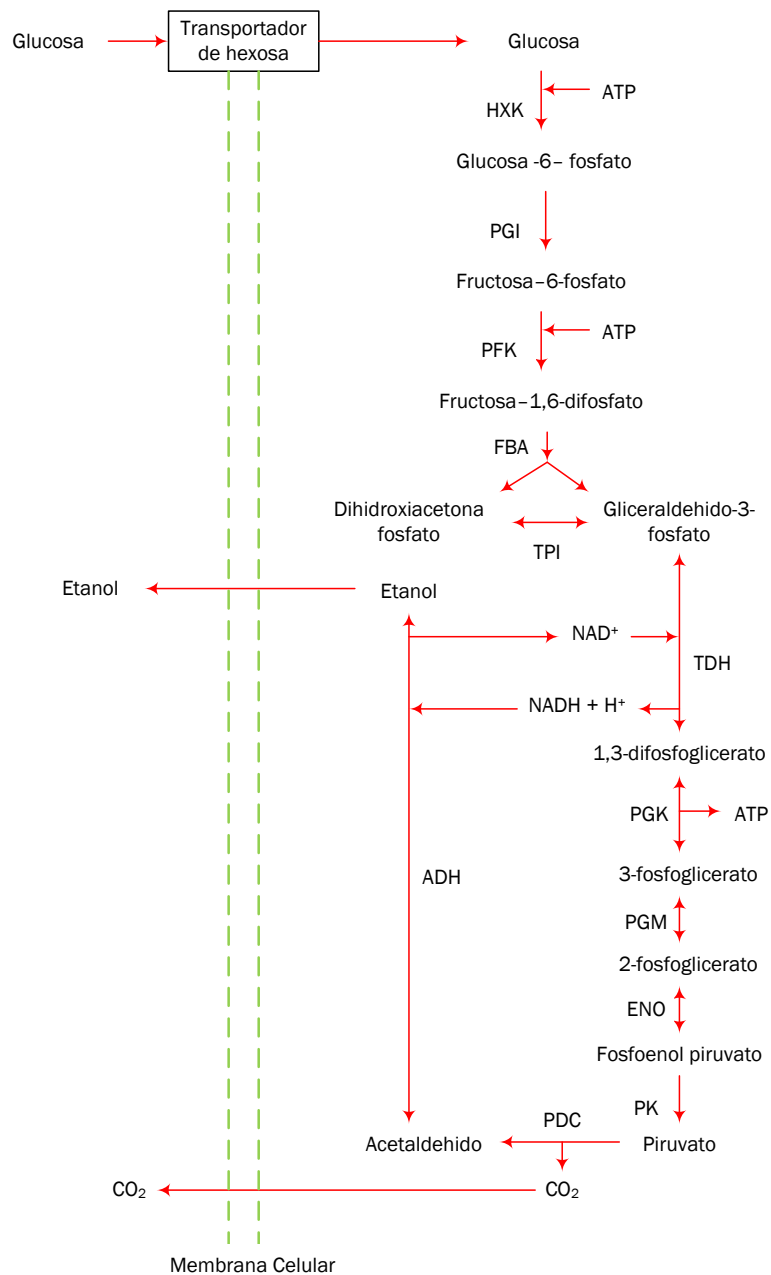


Figura 2: Ruta Embden Meyerhoff Parnas para la producción de etanol en *Saccharomyces cerevisiae* [14]

De acuerdo con la Ecuación 1, se determina que el rendimiento teórico alcanzado por esta ruta es de 0.51143 gramos de etanol por cada gramo de glucosa consumida. Pero este rendimiento teórico nunca es alcanzado en la práctica, debido principalmente a las siguientes razones:

- Los 2 ATP generados en la glucólisis son empleados de inmediato para la biosíntesis celular. De esta manera, el crecimiento está fuertemente ligado a la producción de etanol, por lo que la biomasa puede considerarse un subproducto de la fermentación generado a partir de glucosa [22].

- Intermediarios de la ruta glucolítica se desvían inevitablemente, generando otros subproductos como glicerol, ácidos orgánicos y alcoholes mayores [14].
- Durante la fermentación las levaduras nunca encuentran un ambiente fisiológicamente óptimo y están expuestas simultánea y secuencialmente a una serie de condiciones de estrés [23]. Estas condiciones impiden que los microorganismos se comporten normalmente y afecta su viabilidad, supervivencia y productividad.
- La contaminación bacteriana es la principal causa de la disminución del rendimiento de etanol. Bacterias, principalmente *Lactobacillus sp.* y *Bacillus sp.* además de consumir el sustrato, generan subproductos inhibitorios del crecimiento de la levadura [24].

Bajo condiciones ideales, los rendimientos alcanzados normalmente a nivel industrial pueden oscilar entre 90 – 93% del rendimiento teórico reportado [22].

Zymomonas mobilis

Aunque no es usada comercialmente en la actualidad, esta bacteria facultativa gram negativa es considerada el organismo más efectivo para la producción de etanol, debido a que sus características bioquímicas la hacen un organismo obligadamente fermentativo. Por esta razón, esta bacteria produce etanol a mayores tasas y mucho más rápidamente que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta bacteria degrada solo tres azúcares: D-glucosa, D-fructosa y sacarosa, por la vía de Entner Doudoroff (ED). Esta ruta metabólica emplea enzimas distintas a las utilizadas en la glucólisis o en la ruta de las pentosas fosfato (Figura 3) [14].

La diferencia principal entre las rutas EMP y ED la constituye la presencia de la enzima fosfofructoquinasa, enzima altamente reguladora de la glucólisis. La ausencia de esta enzima en la bacteria *Zymomonas mobilis* permite que la producción de etanol en este microorganismo esté desacoplada de la generación de energía, es decir, no se requiere crecimiento microbiano para la producción de etanol [14]. De esta manera alcanzar el rendimiento teórico solo es impedido por la generación de subproductos dentro de los cuales la biomasa no es considerada, por lo que rendimientos cercanos al 97% son reportados en la literatura. Otras ventajas de su implementación son los nulos requerimientos de oxígeno para mantener la viabilidad celular [25], mayor tolerancia al etanol y a la temperatura [14].

A pesar de las ventajas tan atractivas para su implementación a nivel industrial, algunas importantes desventajas impiden su uso comercial como son:

- No es apta para la degradación de materiales lignocelulósicos, debido a su estrecho rango de sustratos asimilables, ni para la degradación de sustratos provenientes de materiales amiláceos, los cuales son ricos en azúcares que no están incluidos dentro del estrecho rango de sustratos asimilables [11,14].
- No es apta para la degradación de materiales azucarados como melazas ya que en presencia de sacarosa, la *Z. mobilis* genera como subproductos sorbitol y un oligómero de fructosa llamado lévano que disminuyen el rendimiento de etanol. El lévano, aparte de disminuir el rendimiento teórico de etanol aumenta considerablemente la viscosidad del medio de fermentación, dificultando su manipulación y la separación del etanol en operaciones unitarias posteriores además de generar problemas de ensuciamiento e incrustaciones en las tuberías [26].
- Aunque la *Z. mobilis* es catalogada normalmente como un microorganismo seguro [27], su biomasa no es comúnmente aceptada para ser usada como alimento animal tal

como ocurre normalmente con la biomasa de levadura. En este sentido, la disposición de lodos será un inconveniente a considerar.

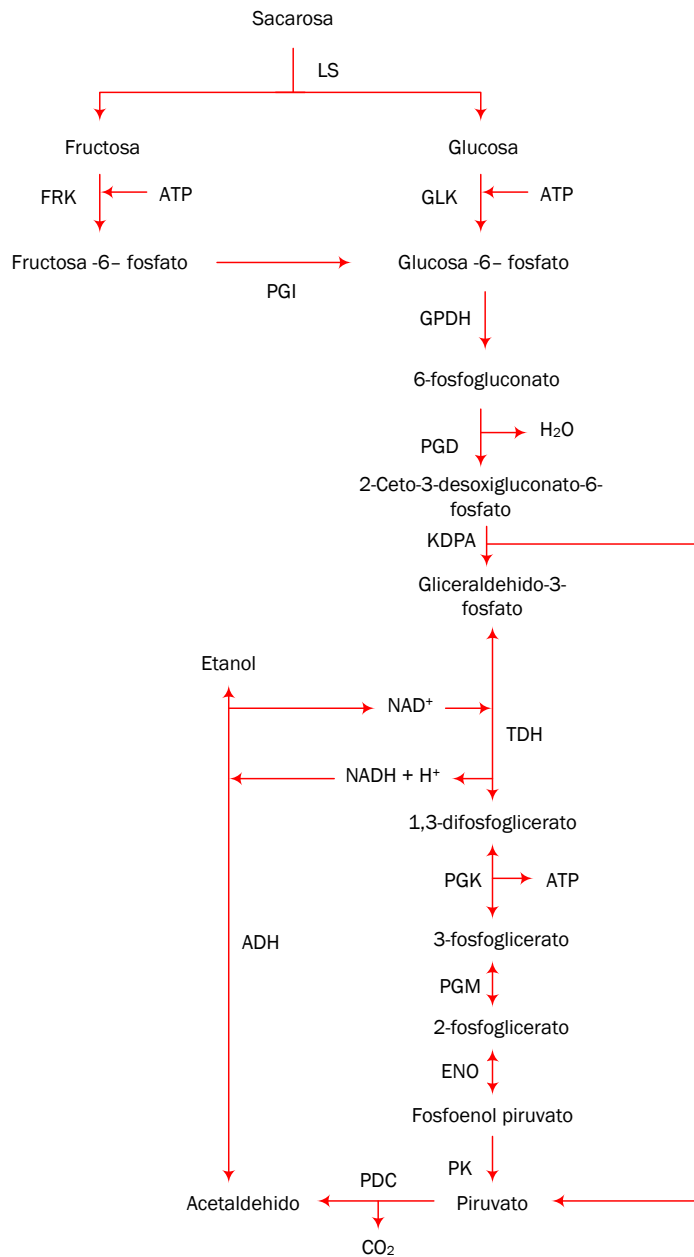


Figura 3: Ruta Entner Doudoroff para la producción de etanol en *Zymomonas mobilis* [14]

1.3. CONCLUSIÓN

Este capítulo presentó algunas generalidades de los procesos fermentativos y especialmente de la obtención de bioetanol. La diversidad de materias primas y de microorganismos hace de los procesos fermentativos un campo de gran importancia dentro del desarrollo de la biotecnología y respuesta a gran cantidad de necesidades. El bioetanol surge como un

compuesto de gran interés investigativo debido a su uso masivo como biocombustible y alternativa futura para reemplazar gran parte de los combustibles fósiles.

De acuerdo con lo anterior, el desarrollo de procesos de bioconversión de sustratos para la producción de bioetanol hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas a los procesos tradicionales, razón por la cual, el estudio del comportamiento de microorganismos fermentadores y la búsqueda de mejores especies es de gran utilidad. Estos aspectos serán considerados en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO 2

FACTORES AMBIENTALES, CONDICIONES DE ESTRÉS Y MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN PROCESOS FERMENTATIVOS

El proceso fermentativo es el mayor componente dentro del rápido desarrollo de los procesos para la producción de etanol y debido a su potencial es necesario adquirir un completo entendimiento de cada una de las etapas del proceso con el fin de avanzar en estrategias de optimización e identificación de oportunidades para su mejoramiento. Por esta razón, el proceso global debe ser discriminado (i.e., pretratamiento, fermentación, separación y purificación), identificando en cada etapa las características principales y los parámetros más relevantes. La fermentación es el principal paso en el proceso general, ya que limita la forma como las materias primas deben ser brindadas al microorganismo y la generación de productos debe ser considerada en las etapas de separación.

El uso de microorganismos no adaptados en la producción de bioetanol, justifica el incremento en las investigaciones y los esfuerzos para mejorar las capacidades metabólicas de cada especie implementada. En general, los procesos fermentativos deben ser constantemente optimizados con el fin de maximizar el potencial de cada una de las cepas [28], debido a que la producción de etanol depende de la actividad microbiana, particularmente de las levaduras [29].

Por lo tanto, existen diversas metodologías que buscan hallar microorganismos con metabolismos extremos, adaptarlos a nuevas condiciones o brindarle genéticamente nuevas propiedades. Cada aproximación está fundamentada en el conocimiento de los factores que afectan el metabolismo y la fisiología de los microorganismos, en especial como afectan al más utilizado a nivel industrial para la producción de etanol: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En este capítulo se presentan algunos de los factores fisicoquímicos que afectan el comportamiento fermentativo de algunos microorganismos. Con base en esto, se muestran algunos de los principales criterios reportados en la literatura para la selección y búsqueda de nuevos microorganismos productores de bioetanol y algunos campos de aplicación.

2.1. FACTORES DE INFLUENCIA EN LA FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS AZUCARADOS

Durante la producción de etanol y otros procesos industriales, las células de levadura usualmente no encuentran el medio ambiente óptimo y son expuestas simultánea y secuencialmente a una serie de condiciones de estrés [23].

Para propósitos de inoculación, la levadura es producida utilizando condiciones aeróbicas en procesos por lotes, los cuales son optimizados para la producción de biomasa. Durante esta etapa, las levaduras están expuestas a la oxidación, a estrés hiperosmótico, a estrés iónico, incrementos de temperatura, ácidos orgánicos, alcoholes, limitación de nutrientes e inanición. Tras el crecimiento, la levadura se concentra por centrifugación, es lavada y posteriormente es secada. Esto da como resultado un estrés secundario, principalmente por inanición, estrés hipoosmótico y desecación [23].

Cuando estas células activas de levadura seca se inoculan en el mosto, están sujetas nuevamente a un estrés hiperosmótico importante, debido a la alta concentración de azúcar en este medio (aproximadamente 200 g/L de una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa) y a medida que avanza el proceso de fermentación ellas tienen que hacer frente con la disminución progresiva de nutrientes y la producción de etanol. Dependiendo del proceso y el sustrato utilizado, otros factores de estrés en esta etapa podrían ser el aumento de la temperatura, la presencia de organismos competitivos, la presencia de compuestos inhibitorios como furaldehído 5-hidroxi-metil-furfural y el furfural, ácido acético y derivados fenólicos (cuando sustratos lignocelulósicos son utilizados) [30,31], entre otras condiciones de estrés.

Durante las etapas post-fermentativas, las levaduras pueden ser afectadas por diferentes tipos de estrés, dependiendo del procedimiento de producción, pero esencialmente estas deben hacer frente a las altas concentraciones de etanol y en algunos casos acetaldehído, ácidos orgánicos e inanición. Para una producción aceptable la levadura (u otro tipo de microorganismo fermentador) debe ser capaz de detectar y responder a estas condiciones de estrés sin pérdida de viabilidad importante [23]. En la Figura 4 [22] se presenta un esquema general de las principales condiciones que afectan la viabilidad y productividad de una célula de levadura.

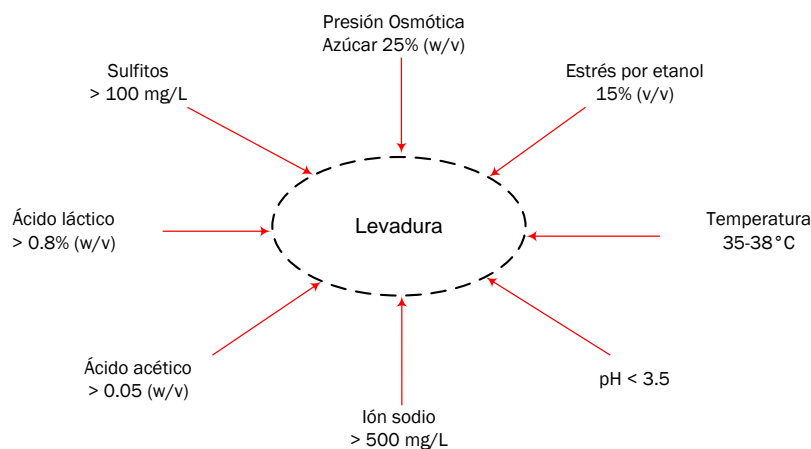


Figura 4: Principales factores de influencia sobre levaduras silvestres [22]

Todos estos factores causan que los rendimientos teóricos no sean alcanzados debido a que estas condiciones afectan la fisionomía y el metabolismo de los microorganismos. Una descripción más detallada de las principales condiciones de estrés es presentada a continuación:

Concentración de Etanol

Este factor afecta el comportamiento de los microorganismos fermentadores causando la inhibición del crecimiento microbiano, la asimilación y la conversión de nutrientes. En el caso de *S. cerevisiae*, 10% (v/v) es la concentración máxima que permite el crecimiento de la levadura mientras que 15% (v/v) es la máxima para el metabolismo fermentativo. El etanol ocasiona el aumento en la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular, generando fugas de iones y metabolitos intracelulares [14].

Temperatura

Algunos microorganismos como *Z. mobilis* pueden crecer a temperaturas entre 25°C y 40°C con una temperatura óptima de crecimiento de 30°C. La composición, la estructura y la concentración de fosfolípidos en la membrana citoplasmática son afectadas cuando la temperatura alcanza niveles cercanos a 40°C, causando la pérdida de la integridad estructural de la membrana. Además de esto, la alta temperatura y la alteración de la membrana ocasionan una acumulación intracelular de etanol, lo cual tiene un efecto negativo sobre la viabilidad celular [32]. En el caso de levaduras como *S. cerevisiae*, la tasa de producción de etanol incrementa constantemente hasta 30°C y suavemente hasta 36°C, pero decrece a temperaturas por encima de 37°C. Algunas cepas pueden crecer a temperaturas superiores de 37°C y son comúnmente referidas como termofílicas, mientras otras tienen una máxima temperatura de crecimiento superior a 45°C y son clasificadas como termotolerantes [33].

Las principales ventajas de implementar fermentaciones a temperaturas elevadas incluyen el incremento en las tasa de producción de etanol, ahorros energéticos a través de la reducción de volúmenes de agua de enfriamiento, disminución de constantes paradas del proceso por recalentamiento del medio de fermentación (problemas usualmente encontrados en áreas y temporadas con elevadas temperaturas ambientales), facilita la extracción continua de etanol durante la fermentación, reduce la posibilidad de contaminación del medio causada por microorganismos mesofílicos, entre otras ventajas [34,35]. Un creciente interés en el uso de cepas termotolerantes es estimulado por la implementación de procesos híbridos tales como sacarificación y fermentación simultáneas [35].

Los reportes científicos que evalúan características diversas en los procesos fermentativos para la producción de bioetanol son muy amplios. Estos estudios están dirigidos a evaluar el comportamiento del microorganismo ante ciertas condiciones de estrés durante el proceso, al mejoramiento genético de cepas para facultarlas de características particulares, entre otros. Una recopilación de las algunas variables reportadas se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10: Reportes en la literatura científica sobre parámetros evaluados en fermentaciones etanólicas

Microorganismo	Sustrato	Parámetro evaluado	Referencia
<i>Zymomonas mobilis</i>	Melaza	Temperatura y concentración de azúcares	[36]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza	Termotolerancia, tolerancia a la concentración de sales	[37]
Levadura de panadería	Melaza	Microfiltración del medio de cultivo	[38]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza	Esterilización del medio de cultivo	[39]
Levaduras de laboratorio e industriales	Glucosa	Actividad del agua, inhibición del etanol, efecto de iones metálicos y sales.	[40]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sacarosa	Muerte programada	[41]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Medio YEPD	Electropermeabilidad	[42]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Medio YP	Fermentación de xilosa	[31]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Glucosa	Inhibición por ácidos débiles	[43]
Levaduras de laboratorio	Glucosa	Propiedades antibacteriales	[44]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Medio GPY	Estrés por cromo	[45]

2.2. MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA

Debido a la importancia de los procesos fermentativos y dado que parte de ellos no se llevan a cabo en condiciones óptimas, es necesario mejorarlos. Los procedimientos para este mejoramiento pueden dirigirse hacia una gran cantidad de aspectos, que pueden resumirse en [5]:

- Buscar nuevos sustratos, que sean más económicos, de mayor disponibilidad y ecológicamente amigables.
- Buscar nuevas condiciones de fermentación.
- Buscar nuevas rutas de síntesis.

El éxito de cualquier modificación está limitado por el comportamiento del microorganismo seleccionado. Es por esto que considerar entre diversos microorganismos aquel que muestre de mejor manera las características deseadas, bajo condiciones ambientales específicas, es esencial [46]. Debido a esto, el éxito o fracaso de un proceso fermentativo depende del tipo de microorganismo y su selección debe considerar algunos requisitos generales [5]:

- El tipo de cepa a implementar debe ser genéticamente estable.
- Alta velocidad de crecimiento.
- Debe estar libre de contaminantes.
- Sus requerimientos nutricionales deben ser satisfechos con medios de cultivo económicos.
- Fácil conservación por periodos de tiempo elevados, preservando sus características metabólicas y fisiológicas.

- Debe llevar a cabo el proceso de fermentación completo en periodos cortos de tiempo.
- Debe generar alto rendimiento del producto y este debe ser fácilmente separable del medio de fermentación.
- Debe satisfacer características particulares según el tipo de producto.

Esta gran cantidad de características que hacen ideal algún microorganismo reflejan la complejidad de los procesos fermentativos y aun más, los problemas de encontrar microorganismos adecuados por rutas de mejoramiento y selección, aunque estos procedimientos suelen generar grandes beneficios.

2.2.1. PROGRAMA DE MEJORAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

La estructura de un programa de mejoramiento puede seguir distintos lineamientos, pero un esquema general se muestra en la Figura 5 [9]. En este esquema se representan las etapas principales dentro del programa de mejoramiento, presentando cada una gran cantidad de requerimientos y posibilidades que deben ajustarse de acuerdo con las necesidades, objetivos y limitaciones del proceso. Incluye, a partir de una serie de microorganismos potenciales, la ruta para la selección de aquellos con mejores características, seleccionados directamente a través de un programa de tamizaje o implementando técnicas de mejoramiento genético, para conferir facultades especiales a microorganismos silvestres.

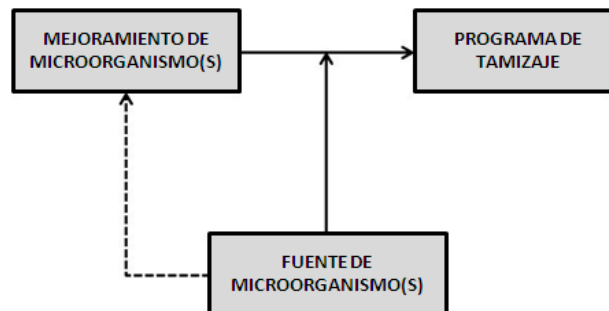


Figura 5: Esquema general de un programa de mejoramiento y selección de microorganismos [9]

Una forma de incrementar el rendimiento es a través de la optimización del medio de cultivo y de las condiciones de operación, pero el éxito está limitado por la capacidad de síntesis del producto deseado que tenga el microorganismo. Otra posibilidad es el mejoramiento genético de una cepa. Este procedimiento puede desarrollarse de tres formas principales: selección de mutantes naturales, inducción de mutaciones o mediante técnicas de recombinación genética [46].

La selección natural de los mutantes

En cada división celular de un microorganismo existe una pequeña probabilidad para la ocurrencia de cambios genéticos que causan la heterogeneidad de la población. Aunque estos cambios generan principalmente organismos con características de productividad más bajas, algunas mutaciones generan microorganismos sobreproductores que pueden ser aislados. La principal limitación de este método es la baja tasa de mutaciones y que las características modificadas se encuentran al azar [46,47].

Mutación Inducida

La mutación inducida también se considera un método aleatorio, en el que se lleva a cabo el proceso de mutación a través de un agente específico, ya sea físico o químico, que induce transiciones y combinaciones del material genético del microorganismo [9,47].

Recombinación Genética

Es el proceso en el cual los elementos genéticos contenidos en dos genomas separados se unen. Consiste en la incorporación de material genético derivado de una especie en otra donde este material se puede expresar. Esto significa que las características especiales sólo se conceden a un microorganismo nativo que no las tenía previamente. Este es un método directo, aunque debe ir acompañado de una búsqueda de las condiciones de operación apropiadas [47,48].

La modificación y mejoramiento de las características metabólicas es solo una parte del proceso global. El conjunto de microorganismos obtenidos después de la implementación de algún método de mejoramiento debe ser evaluado, con el fin de:

- Determinar si parte de la población expresa las características fisiológicas buscadas.
- Evaluar y cuantificar la actividad del organismo y el rendimiento del producto deseado.
- Verificar el comportamiento del microorganismo aislado bajo condiciones reales de proceso.

La selección de microorganismos industriales es un proceso sistemático, y puede usarse una estrategia similar a la mostrada en la Figura 6 [9]. Los elementos principales mostrados en el esquema, son:

Definir la actividad de interés

Fijar el objetivo u objetivos del proceso de selección: obtener un organismo resistente, seleccionar un microorganismo que muestre una gran actividad de cierta enzima de interés, etc.

Identificar microorganismos con esta actividad

Es importante conocer la fisiología de los microorganismos que expresan la actividad buscada para diseñar técnicas apropiadas y criterios para el proceso de enriquecimiento y selección.

Identificar fuentes de microorganismos

Las principales fuentes son:

- Colecciones de cultivos.
- Microorganismos provenientes de fuentes naturales.
- Microorganismos usados a nivel industrial.

Tamizaje

Es una determinación cualitativa para confirmar que la actividad deseada es expresada por el cultivo (tamizaje primario) y la evaluación del rendimiento del producto principal del microorganismo aislado (tamizaje secundario). El tamizaje secundario es un proceso importante, pues permite eliminar falsos positivos o falsos negativos rápidamente, antes de encaminarse en optimización de la producción y escalado [5,9].

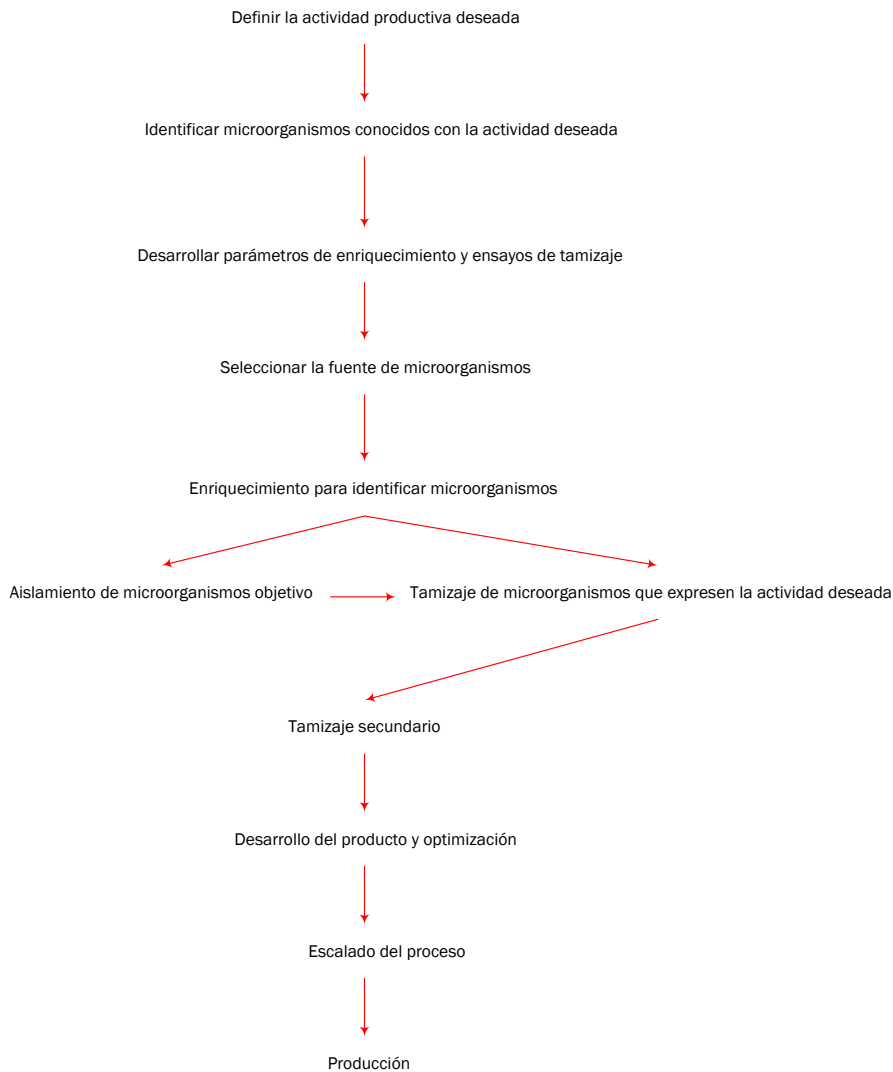


Figura 6: Esquema detallado de un procedimiento de selección o tamizaje de microorganismos de interés industrial [9]

Desarrollo y optimización del producto, escalado y producción

Si el proceso de tamizaje es exitoso, los microorganismos seleccionados deben ser probados en condiciones de planta piloto para evaluar el rendimiento real del producto y el comportamiento del microorganismo, antes de ser escalado.

2.2.2. CAMPOS DE APLICACIÓN DE PROGRAMAS DE SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Industria de vinos

La producción tradicional de esta bebida alcohólica se ha llevado a cabo mediante fermentaciones espontáneas por parte de cepas silvestres de diferentes microorganismos, principalmente levaduras. Estas cepas están presentes en las uvas y en las instalaciones donde se realiza la fermentación. Todos los microorganismos involucrados en este tipo de fermentación proveen bebidas con especiales y específicas características sensoriales. En estos procesos existe la gran necesidad de implementar cepas adaptadas que permitan estandarizar las condiciones de operación y las características deseadas del producto [49]. Para ello, una gran cantidad de estudios para la selección de microorganismos se han publicado reportando la aparición de levaduras (principalmente silvestres y cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*) con características fisiológicas y metabólicas especiales [23].

Industria de la producción de etanol

Los estudios actuales se enfocan fundamentalmente en la búsqueda de microorganismos con actividades específicas por medio de la tecnología de recombinación de ADN para la mejora de las cepas parentales [50]. Las principales tendencias son la obtención de microorganismos (especialmente levaduras y cepas de bacteria) con capacidad para la degradación de materiales alternativos como materiales lignocelulósicos, el aislamiento de cepas termotolerantes, microorganismos con una resistencia alta al etanol y, en general, el aislamiento de microorganismos que puedan sobrevivir en condiciones extremas [50].

Este conjunto de cambios genéticos son posibles solo con un amplio conocimiento de las vías bioquímicas relacionadas con el metabolito de interés y el conocimiento de los mecanismos de regulación enzimática [51].

2.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

Como se ha mencionado, mejoras significativas en la tecnología son necesarias con el fin de reducir los costos de producción y hacer del etanol un recurso más competitivo [52], debido a que estos costos son el impedimento clave para su uso masivo como combustible [36]. Por esta razón, la literatura científica es amplia en la búsqueda y selección de mejores condiciones de operación que permitan aprovechar al máximo las materias primas y generar un mayor rendimiento de producto. Para optimizar procesos de fermentación, es necesario conocer que variables influyen significativamente en el sistema, cómo afectan y en qué grado al resultado deseado. El elevado costo de la experimentación y las limitaciones de tiempo obligan a ejecutar solo experimentos imprescindibles [53].

Importancia y aplicación del diseño de experimentos

El método tradicional de experimentación (i.e., variar un factor a la vez, mientras que el resto de variables permanecen constantes) no suele ser la mejor opción, más aún en procesos biológicos donde una gran cantidad de variables entran en juego dentro del comportamiento

del sistema y del agente biológico. Este método, aparte de implicar mayor cantidad de experimentos, puede solo proporcionar información parcial que limitaría el alcance del análisis [54]. Por ejemplo, no mostraría si existe interacción entre factores de operación, siendo esta una limitación para los procesos de obtención de bioetanol en los cuales, interacciones entre factores (e.g., la concentración de etanol y la temperatura del sistema generan un efecto sinérgico sobre la actividad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) son de gran influencia en los rendimientos de etanol alcanzados y en algunas circunstancias llegan a ser más representativos que efectos individuales [14].

El diseño estadístico de experimentos contempla una amplia variedad de estrategias experimentales que son óptimas para generar y analizar la información que se busca y la que se obtiene. Una de las estrategias más utilizadas son el diseño factorial y la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), las cuales son una serie de técnicas estadísticas y matemáticas de utilidad para el desarrollo, mejoramiento y optimización de procesos [55]. Algunos de los reportes científicos que hacen uso de este tipo de estrategias estadísticas para el planteamiento y análisis de experimentos referentes a la producción de bioetanol se presentan a continuación.

Ergun y Mutlu [52] desarrollaron un diseño experimental para evaluar la influencia del pH, la concentración de sustrato y la influencia de la adición de un compuesto nitrogenado en la productividad de etanol a partir de melaza de remolacha azucarera empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en un sistema de fermentación por lotes (batch). Se implementó un diseño factorial de tres niveles y de acuerdo con el análisis de los resultados se ajustaron expresiones matemáticas que simulaban la influencia de los factores analizados y con esto, determinar las mejores condiciones de fermentación.

La producción de etanol a partir de melazas de caña de azúcar empleando la bacteria *Zymomonas mobilis* fue analizada experimentalmente por Cazzeta *et ál.* [36]. En este estudio, se aplicó un diseño factorial para conocer la influencia de la temperatura, la concentración de sustrato, la agitación del medio de cultivo y el tiempo de fermentación de melazas de caña de azúcar, así como su interacción en la producción de etanol y generación de biomasa. Además de ratificar la potencialidad de este microorganismo como productor de bioetanol, gracias a su alta productividad y a sus propiedades de osmotolerancia y etanol tolerancia, los resultados indicaron que la concentración de sustrato es el factor más influyente en esta fermentación, seguido de la temperatura. El análisis de los resultados permitió establecer condiciones ideales tales como concentraciones cercanas a 200 g/L de azúcares reductores totales y una temperatura de 30°C, alcanzando con esto concentraciones de producto (i.e., etanol) de aproximadamente 56 g/L.

Los procesos productivos que hacen uso de biomasa como materias primas contienen un número de variables en términos de tecnología y costos que deben ser considerados durante las etapas de diseño y optimización. En el caso de materias primas no convencionales, como es el caso de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol vía fermentativa, la cantidad de factores y sus interacciones aumentan. Aspectos como la tecnología de recolección y de conversión de materias primas son incluidos, lo que dificulta el análisis económico del proceso. En este sentido, Grado y Chandra [56] compararon el impacto relativo de varios parámetros sobre los costos de producción de bioetanol, aplicando un diseño factorial de 3 y 5 niveles. Entre los factores analizados se incluyen el tamaño de las instalaciones para la producción de bioetanol a partir de residuos madereros, el deterioro de las materias primas a causa del almacenamiento, el costo de las materias primas y la eficiencia de la conversión enzimática de la madera, principalmente. Este estudio representa una guía para la reducción de los costos finales de producción de bioetanol.

Muchos otros estudios han abordado problemas de optimización y de selección de condiciones de operación haciendo uso de diseño factorial de experimentos: fermentaciones en continuo con extracción de etanol [57], ensayos de sacarificación enzimática y fermentación de residuos alimenticios [58], la selección de nutrientes en un medio de fermentación de materiales lignocelulósicos utilizando *Clostridium thermocellum* [59], entre otros estudios.

2.4. ÉXITO DE LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS Y DE NUEVAS CONDICIONES DE OPERACIÓN A NIVEL INDUSTRIAL

Las limitaciones principales en el éxito de un programa de detección de microorganismos o de evaluación de condiciones adecuadas de operación están en implementarlo en un verdadero proceso bajo condiciones reales de fermentación a gran escala. Dos factores que no se pueden analizar en el laboratorio y a escala piloto son la persistencia y la prevalencia de la flora microbiana durante el período de fermentación. Basso *et ál.* [60] presentan los resultados de un procedimiento de 12 años para el barrido, selección y aislamiento de levaduras nativas en diferentes destilerías de Brasil. De las aproximadamente 350 diferentes cepas analizadas en este estudio, menos de 30 mostraron características deseadas (e.g., desempeño superior, alto rendimiento de etanol, escasa formación de espuma, floculación moderada y velocidad de sedimentación baja, entre otros), pero cuando se utilizan en el proceso industrial (continuo, con recirculación celular), sólo 14 mostraron un buen comportamiento durante los ciclos de producción que superan los 150 días de recirculación. Esto demuestra claramente las limitaciones y complejidad de un proceso de selección, pero si tiene éxito trae enormes beneficios.

2.5. CONCLUSIÓN

La importancia de los productos generados mediante procesos fermentativos hace necesaria la búsqueda constante de nuevas alternativas para su optimización y ajuste. Los avances en ciencias como la ingeniería genética y metabólica permiten obtener con mayor precisión las características específicas de ciertos microorganismos con el fin de mejorar la capacidad productiva y, junto con las técnicas de detección, seleccionar los microorganismos de interés industrial. Junto con esto, el desarrollo de diseños experimentales y la aplicación de herramientas estadísticas, permiten establecer nuevas condiciones de operación y determinar factores de mayor influencia sobre un microorganismo en un proceso fermentativo.

En este sentido, en los siguientes capítulos se presenta la aplicación de un diseño factorial para la determinación de los principales factores que afectan la productividad de etanol y la viabilidad celular de una cepa aislada de *Saccharomyces cerevisiae*, así como la cuantificación de estos efectos y el análisis de superficies de respuesta para la optimización del proceso de producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Se emplearon 4 cepas de levadura *S. cerevisiae*, 3 de estas aisladas de procesos fermentativos a escala piloto realizados en el Laboratorio de Procesos Productivos de la Universidad Nacional de Colombia y la cepa ATCC 9763 empleada en este trabajo como cepa de referencia. Las especificaciones generales, procedencia y observaciones generales de cada microorganismo utilizado se amplían en la Tabla 11.

Tabla 11: Microorganismos utilizados en el desarrollo experimental

Microorganismo	Denominación	Procedencia	Observaciones
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LO ₁	Microorganismo aislado de un proceso fermentativo realizado el día 17 de abril de 2009	Proceso fermentativo realizado empleando melaza diluida hasta 17° Bx, temperatura de 33°C
	LO ₂	Microorganismo aislado de un proceso fermentativo realizado el día 31 de marzo de 2009	Proceso fermentativo realizado empleando melaza diluida hasta 18° Bx, temperatura de 31°C
	LO ₃	Microorganismo aislado de un proceso fermentativo realizado el día 6 de marzo de 2009	Proceso fermentativo realizado empleando melaza diluida hasta 15° Bx, temperatura de 30°C
	ATCC 9763	ATCC – ARS Culture Collection. Provista por ANNAR Diagnóstica Import Ltda.	Empleada para la producción de etanol

3.1.1. CONDICIONES DE AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

Muestras de biomasa residual de los procesos fermentativos descritos son enriquecidos en medio líquido (caldo extracto de malta y melaza estéril de 15° Bx), sembrados por extensión en medio sólido (agar extracto de malta y agar de melaza) para identificar y conservar muestras puras. Las muestras de cada cepa fueron conservadas refrigeradas en agar inclinado, en medio sólido en caja de petri y criopreservadas en una solución de 80% en volumen de glicerol y 20% de medio de cultivo.

3.2. MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS

Melaza de caña provista por el Ingenio La Cabaña, diluida a diferentes concentraciones para ser utilizada como medio de crecimiento y fermentación líquido, o sólido al mezclarse con agar.

3.2.1. PRETRATAMIENTO

Dilución: Se utiliza agua destilada o potable, según el nivel de experimentación (laboratorio o piloto).

Eliminación de sólidos suspendidos: Mediante centrifugación a 6000 RPM durante 10 minutos, son separados los sólidos y la fase líquida es utilizada como medio de crecimiento sólido al ser mezclada con agar (1% w/v). La melaza utilizada en las etapas de crecimiento y fermentaciones en medio líquido no es sometida a esta remoción.

Hidrólisis: Con el fin de desdoblar la sacarosa presente en la melaza y aumentar la cantidad de sustrato directamente asimilable (glucosa, fructosa), se lleva a cabo una hidrólisis empleando ácido sulfúrico. Las condiciones de temperatura y el tiempo de hidrólisis fueron establecidos en 90 °C durante 3 horas.

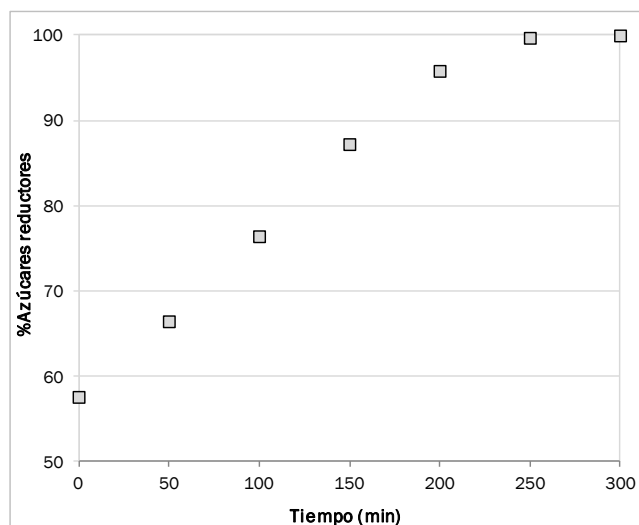


Figura 7: Evolución de azúcares reductores durante la hidrólisis a 90 °C

Adición de nutrientes: Con el fin de suplir las deficiencias de nutrientes que tiene el medio de fermentación, especialmente de nitrógeno y fósforo, se adicionan los nutrientes en las cantidades especificadas en la Tabla 12 [61], en forma líquida a partir de soluciones stock.

Tabla 12: Cantidades mínimas de nutrientes recomendadas para fermentar 100 kg de melaza [61]

Sustancia	Cantidad / 100 kg
Fosfato trisódico	101.2 g
Urea	212.2 g
Cloruro férrico	1.1 g
Sulfato de magnesio	1.1 g

Esterilización: Con el fin de eliminar microorganismos que puedan interferir con la actividad de la levadura, el medio de fermentación o crecimiento es esterilizado. Para cantidades menores a 1 L se emplea una esterilización en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Niveles de 80 L y superiores son esterilizados solo con el sometimiento al calor durante la etapa de hidrólisis.

3.3. MÉTODOS

Conservación de muestras: Las muestras son almacenadas en tubos eppendorf y crioconservadas a una temperatura de -80°C para detener completamente la actividad celular.

Determinación de azúcares: El contenido de azúcares reductores es determinado mediante colorimetría por el método DNS según Miller [62], empleando patrones de glucosa anhidra. Las muestras son previamente centrifugadas a 12000 RPM a 4°C. Un refractómetro portátil A. Krüss Optronic DR301-95 fue utilizado para la determinación del porcentaje (w/v) de sólidos solubles (°Bx). La concentración de, glucosa, fructosa y sacarosa fue determinada por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con un cromatógrafo HITACHI LaChrom Elite, detector de IR, columna Thermo Scientific HyperREZ XP Ca⁺⁺, agua como fase móvil, un flujo de 0.3 ml/min y una temperatura de columna de 85°C. Un cromatograma de muestra se presenta en la Figura 8.

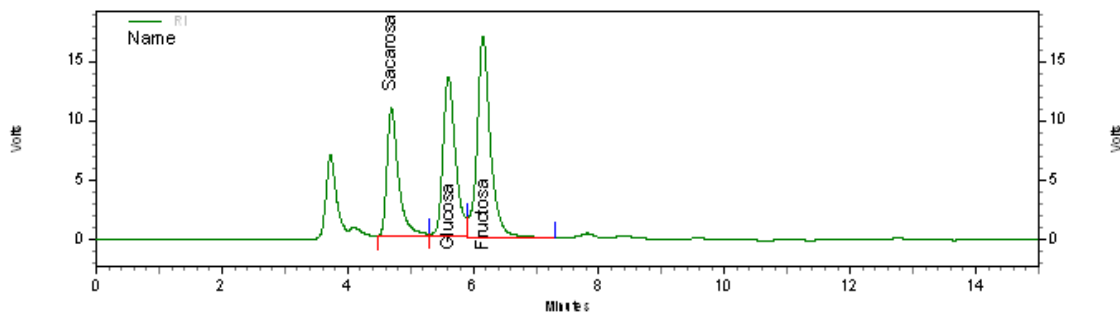


Figura 8: Cromatograma de una muestra de melaza diluida

Concentración de células: Células viables son determinadas mediante conteo en cámara de Neubauer. La muestra es previamente diluida y se utiliza azul de tripán como reactivo de tinción. También se determina la biomasa por gravimetría, centrifugando la muestra 2 veces a 12000 RPM a 4°C por 4 minutos, con lavados y resuspensión del pellet en agua destilada. El líquido sobrenadante es retirado y el tubo eppendorf es secado a 80°C por 24 horas o hasta peso constante.

Determinación de etanol: De acuerdo con el nivel de la fermentación (i.e., volumen de medio de fermentación) se utilizaron los siguientes métodos de cuantificación:

- Mediante cromatografía líquida, empleando el mismo método y el mismo equipo descrito para la cuantificación de azúcares.
- Se determina por destilación diferencial de 400 ml de mosto, y posterior medición de grados °GL.

- Muestras más pequeñas y previamente diluidas para disminuir el grado de viscosidad y ajustar la muestra dentro del rango de detección, son analizadas por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL GC, bajo las siguientes condiciones: $T_{HORNO}=70^{\circ}\text{C}$, $T_{INJ}=150^{\circ}\text{C}$, $T_{DETECTOR}=250^{\circ}\text{C}$, $P_{CARRIER}=8.3$ psi y helio como gas de arrastre.

3.4. FERMENTACIONES A NIVEL DE LABORATORIO (APLICACIÓN DEL DISEÑO FACTORIAL)

Medio y condiciones de crecimiento: Melaza diluida, hidrolizada y acondicionada de acuerdo con las condiciones de cada experimento y según la descripción previa es utilizada. Una colonia de levadura *Saccharomyces cerevisiae* conservada en agar de melaza (Figura 9) es diluida en agua destilada estéril y una alícuota (necesaria para alcanzar una concentración inicial de inóculo de 5×10^5 cel/ml) de esta solución es adicionada a 50 ml de melaza en un erlenmeyer de 250 ml. Esta solución se incuba a la temperatura establecida según el experimento bajo condiciones aeróbicas, con agitación orbital de 200 RPM para garantizar oxigenación y homogeneidad en la solución.

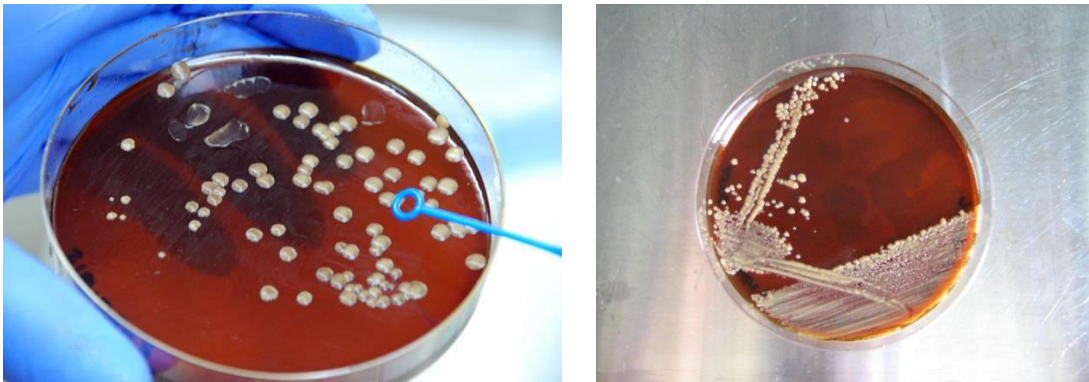


Figura 9: Crecimiento de la cepa LO₁ en agar de melaza

Condiciones de fermentación: Una alícuota del inóculo es centrifugada a 12000 RPM a 4°C y posteriormente lavada con agua destilada (procedimiento repetido 2 veces). La biomasa residual es sembrada en un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de melaza diluida y acondicionada según el experimento. Cada erlenmeyer cuenta con un tapón de gasa, algodón y es tapado con látex con el fin de garantizar condiciones de esterilidad y de anaerobiosis. Un orificio en el látex permite la salida del CO_2 generado en la fermentación. Una agitación orbital de 100 RPM es empleada para mejorar la homogeneidad de la solución y evitar una sedimentación excesiva de biomasa. Muestras son tomadas pasadas 24 horas para determinar concentración celular, °Bx, azúcares reductores y concentración de etanol.

3.5. FERMENTACIONES DE 1 L, 80 L Y 300 L

Un inóculo del 10% del volumen de fermentación es preparado partiendo de 1 colonia de *S. cerevisiae* (según cepa a utilizar) y es escalado hasta el volumen necesario con adición de

aire estéril o agitación axial vigorosa de la solución. Aproximadamente 5 horas antes de la inoculación al medio de fermentación, la aireación es suspendida con el fin de generar un “shock metabólico” en la biomasa y con esto disminuir la etapa de latencia al inicio de la fermentación. Las fermentaciones de 1 L se desarrollaron empleando un biorreactor con control de temperatura (Figura 10) y los niveles mayores se desarrollaron en marmitas con chaquetas para el suministro de medios de enfriamiento y calentamiento.



Figura 10: Biorreactor marca Biotrón®

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE FACTORES EN LA FERMENTACIÓN DE MELAZA UTILIZANDO LEVADURA

Con el fin de determinar la influencia de diferentes factores sobre la productividad y viabilidad de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación anaeróbica empleando melaza de caña de azúcar como sustrato, se utilizan dos diseños experimentales: 1) un diseño factorial 2^4 (en el cual se evalúa la concentración de azúcares totales, el pH inicial del medio, la temperatura de fermentación y el comportamiento de dos cepas de levadura) y 2) un diseño factorial compuesto central (para evaluar con mayor precisión el efecto de la temperatura, de la concentración de azúcares totales, determinar rendimientos alcanzados y consumo de sustratos) a partir de los cuales se obtienen relaciones matemáticas entre las variables de respuesta (etanol, generación de biomasa) y las variables de entrada. Un análisis estadístico de cada conjunto de experimentos permite determinar la influencia de cada uno de los factores así como la evaluación de efectos sinérgicos. Se implementó la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) con el fin de seleccionar condiciones óptimas del proceso.

Dos condiciones de fermentación con elevados rendimientos de producto según el análisis MSR fueron seleccionadas con el fin de realizar procesos a nivel piloto. Fermentaciones de 1 L y 300 L fueron llevadas a cabo con el fin de determinar el nivel de generalización de los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, analizar el comportamiento de la cepa LO₁ bajo estas condiciones y ajustar los parámetros de un modelo cinético para el proceso de producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar. Mediante simulación y análisis económico se compararon los requerimientos energéticos y la viabilidad económica del proceso fermentativo llevado a cabo bajo las condiciones seleccionadas.

La cepa LO₁, por presentar mejor comportamiento y rendimiento de etanol en las fermentaciones anteriormente descritas, fue utilizada para evaluar procesos no convencionales. Se realizaron fermentaciones con elevada concentración de azúcares totales en el sustrato y con aireación para evaluar el comportamiento de los microorganismos bajo estas condiciones (efecto Crabtree).

4.1. EVALUACIÓN DE FACTORES DE FERMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR

Algunos de los factores de fermentación y su efecto sobre el metabolismo y la fisiología de algunos microorganismos durante procesos fermentativos se presentaron en el Capítulo 2. En esta sección se pretende evaluar la influencia de los factores principales asociados a la fermentación de melazas por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mediante dos diseños experimentales a nivel de laboratorio:

1. El desarrollo de un diseño factorial 2^4 en el cual, mediante un análisis estadístico, se evalúa la influencia de la concentración de melaza, la temperatura de fermentación, el pH inicial del medio y el microorganismo empleado (levadura de panadería aislada de procesos fermentativos a escala piloto y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763). Se obtienen expresiones matemáticas que relacionan las variables de respuesta con las variables de operación seleccionadas.
2. Diseño factorial compuesto central, en el cual se evalúa el efecto de la concentración de sustrato y de la temperatura de fermentación sobre la producción de etanol y la generación de biomasa de la cepa LO₁. Se obtienen expresiones matemáticas que relacionan las variables de respuesta con las variables de operación seleccionadas, se determina el rendimiento obtenido en cada experimento y se analiza con mayor detalle el proceso fermentativo.

4.2. DISEÑO FACTORIAL 2^4

Las variables elegidas como independientes en el diseño experimental fueron: A) la concentración de azúcares iniciales en el medio ($^{\circ}\text{Bx}$), B) el pH inicial del medio, C) la temperatura de fermentación ($^{\circ}\text{C}$) y D) el tipo de cepa de *S. cerevisiae*. Las variables de respuesta o variables dependientes de interés son la producción de etanol (ETA, g/L) y la generación de biomasa (DCEL, cel/ml). Se seleccionan estas variables de operación por ser las de mayor importancia y de común seguimiento durante un proceso a nivel piloto e industrial. Los valores de cada uno de estos factores se seleccionaron de acuerdo a los valores límite, habituales en este tipo de procesos.

Las variables son codificadas con el fin de establecer con mayor facilidad las expresiones matemáticas que representen los diferentes efectos (individuales y sinérgicos) de las variables estudiadas. Las variables independientes son codificadas con valores -1 (al nivel inferior) y +1 (al nivel superior) para factores continuos (variables A, B, C). Para factores discretos como el tipo de cepa se emplea -1 y +1 indistintamente. En la Tabla 13 se presentan los factores y el dominio experimental, mientras que en la Tabla 14 se presenta la matriz de experimentos. Cada experimento se realizó por duplicado y se presentan los valores promedio de cada uno de ellos.

Un análisis de varianza ANOVA (empleando el software STATGRAPHICS CENTURION XV) se realizó con el fin de cuantificar las respuestas del diseño experimental. Esta información incluye el valor promedio obtenido de las variables de respuesta, el valor de los 4 efectos principales y el de 6 efectos de interacción entre 2 factores. Los efectos sinérgicos triples y superiores no tienen significancia [14] y por lo tanto no se incluyeron en este análisis. El

efecto de cada factor es cuantificado según la influencia que tiene sobre la productividad de bioetanol (g/L) y sobre la generación de biomasa (cel/ml).

Tabla 13: Factores seleccionados y dominio experimental establecido en el diseño factorial 2⁴

Variables	Código de valores	
	(-1)	(+1)
A: Concentración de melaza (°Bx)	12	20
B: pH inicial del medio	4	5.2
C: Temperatura de fermentación (°C)	28	35
D: Cepa utilizada	ATCC 9763	LO ₁

Tabla 14: Matriz de experimentos para el diseño factorial 2⁴

Exp No.	Variables			
	A	B	C	D
1	-1	-1	+1	-1
2	+1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	+1	-1
5	-1	-1	-1	-1
6	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	-1	-1
8	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	+1	+1
10	+1	-1	+1	+1
11	-1	+1	+1	+1
12	+1	+1	+1	+1
13	-1	-1	-1	+1
14	+1	-1	-1	+1
15	-1	+1	-1	+1
16	+1	+1	-1	+1

4.2.1. RESULTADOS DISEÑO FACTORIAL 2⁴

Los resultados generales del diseño factorial 2⁴ se presentan en la Figura 11 mientras que el efecto de cada uno de los factores sobre las variables de respuesta es mostrado tanto en la Tabla 15 y como en las Figuras 12 y 13. Los efectos sinérgicos dobles también se presentan en la Tabla 15.

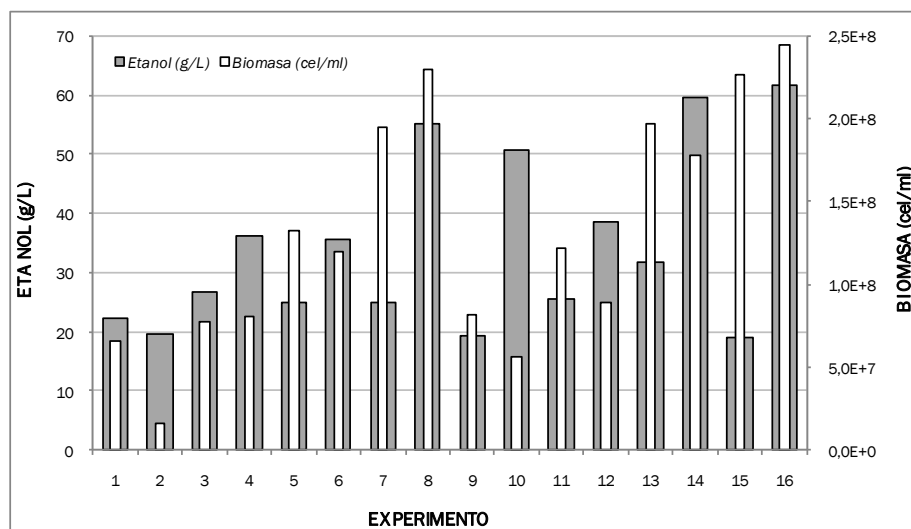


Figura 11: Resultados generales diseño factorial 2⁴

Tabla 15: Efectos estimados para las variables de respuesta ETA y DCEL

Efecto	ETA* (g/L)	DCEL* (cel/ml)
Promedio**	34.48 ± 1.66	1.32x10 ⁸ ± 3.39x10 ⁶
A	20.36 ± 3.33	-1.04x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
B	2.96 ± 3.33	5.24x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
C	-9.14 ± 3.33	-1.17x10 ⁸ ± 6.79x10 ⁶
D	7.54 ± 3.33	3.46x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
AB	3.50 ± 3.33	1.63x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
AC	-7.49 ± 3.33	-1.59x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
AD	8.43 ± 3.33	-4.51x10 ⁶ ± 6.79x10 ⁶
BC	0.81 ± 3.33	-1.51x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
BD	-7.16 ± 3.33	-1.02x10 ⁷ ± 6.79x10 ⁶
CD	-0.19 ± 3.33	-7.39x10 ⁶ ± 6.79x10 ⁶

*Reportado como: Valor estimado ± Error estándar

**Valor promedio de los 16 experimentos

La importancia de cada efecto sobre las variables de respuesta puede ser determinada de mejor manera mediante un análisis de varianza (ANOVA), con respecto a los valores del estadístico F. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 16.

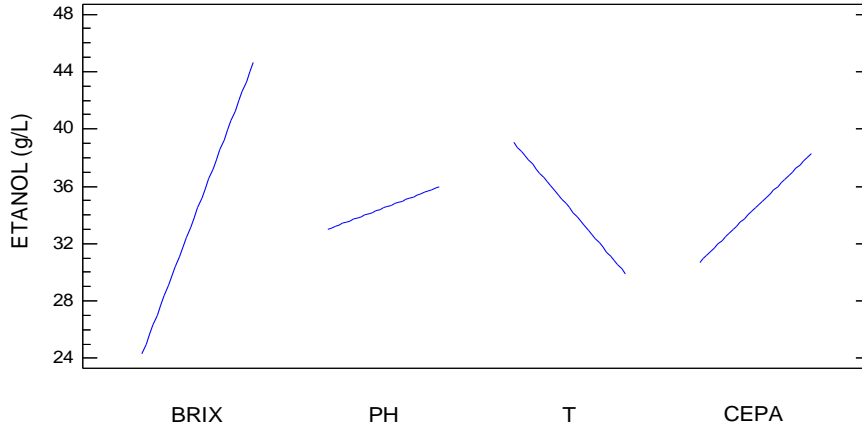


Figura 12: Representación gráfica de los efectos sobre ETA

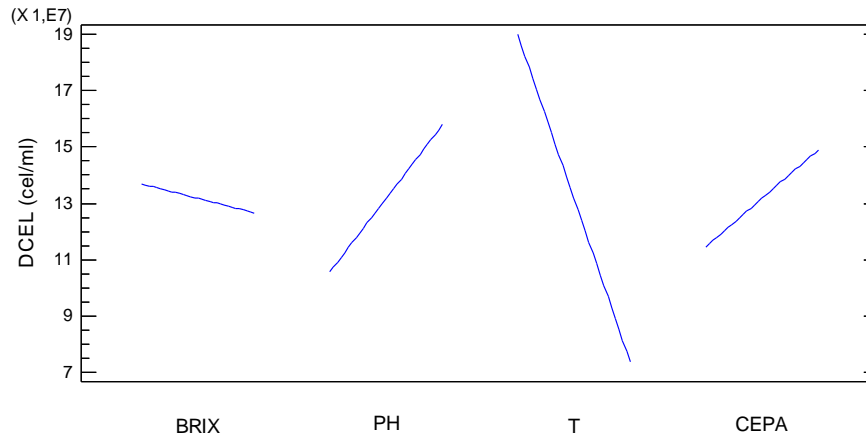


Figura 13: Representación gráfica de los efectos sobre DCEL

Tabla 16: Resultado ANOVA para el diseño factorial 2⁴

Efecto	ETA (g/L)	DCEL (cel/ml)
	Valor-P*	Valor-P*
A:Concentración	0.0017	0.1874
B:pH	0.4151	0.0006
C:T	0.0406	0
D:Cepa	0.0729	0.0038
AB	0.3412	0.0614
AC	0.0742	0.0666
AD	0.0524	0.5356
BC	0.8175	0.0772
BD	0.0841	0.1928
CD	0.955	0.3261

*P ≤ 0.05 Indica que el efecto es estadísticamente significativo

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de ETA y de DCEL en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen

una valor-P menor que 0.05 (para el etanol) y 3 efectos tienen un valor-P menor que 0.05 (para la generación de biomasa), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%.

A partir del conjunto de experimentos, se correlacionan los datos experimentales con el fin de presentar un modelo de cada variable de respuesta. La correlación entre los valores predichos por el modelo ajustado y los valores experimentales se muestran en las Figuras 14 y 15 así como en las Ecuaciones 2 y 3, para ETA y DCEL respectivamente.

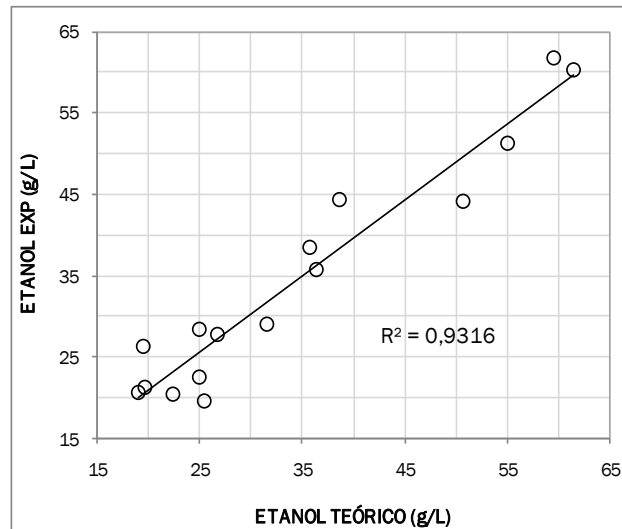


Figura 14: Comparación entre los valores teóricos y experimentales para la producción de etanol

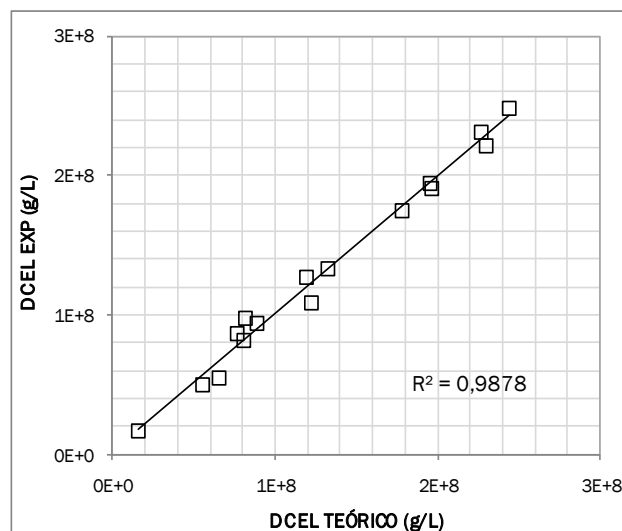


Figura 15: Comparación entre los valores teóricos y experimentales para la generación de biomasa

$$ETA (g/L) = -29.74 + 7.62 A + 15.26 D - 15.28 B + 2.09 C + 1.05 AD + 0.73 AB - 0.27 AC - 5.97 BD - 0.03 CD + 0.19 BC$$

Ec. 2

$$DCEL \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = -7.92 \times 10^7 + 917187 A + 9.87 \times 10^7 D + 1.02 \times 10^8 B + 8.91 \times 10^6 C - 564063 AD \\ + 3.40 \times 10^6 AB - 566518 AC + 8.51 \times 10^6 DB - 1.055 \times 10^6 CD - 3.59 \times 10^6 BC$$

Ec. 3

4.2.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2⁴

Según la concentración de etanol alcanzada en cada experimento, tras 24 horas de fermentación, se muestra que las mejores condiciones son aquellas establecidas en los experimentos 16, 14 y 8, en los cuales se alcanzaron concentraciones de producto de 61.5, 59.6 y 55 g/L respectivamente. Los 3 experimentos corresponden a una concentración de 20°Bx, pH de 5.2 y temperatura de 28°C, empleando la cepa LO₁ en 2 de los 3 niveles más altos presentados. Esto permite preliminarmente establecer como mejores condiciones concentraciones de melaza cercanas a 20°Bx, temperaturas de 28°C, pH cercanos a 5. Se destaca también la mayor capacidad fermentativa de la cepa LO₁ sobre la cepa comercial ATCC 9763.

Con respecto a la generación de biomasa, las mejores condiciones son aquellas establecidas en los experimentos 16, 8 y 15 en los cuales la generación de células fue de 2.44x10⁸, 2.3x10⁸ y 2.26x10⁸ cel/ml respectivamente durante 24 horas de fermentación. Podría decirse que una mayor generación de biomasa no siempre se traduce en una mayor productividad de etanol como es el caso de los resultados mostrados en los experimentos 10 y 15 (i.e., en el experimento 10 se obtuvo una concentración alta de etanol y baja generación celular, en contraste con el experimento 15 en el cual una tasa alta de generación celular fue obtenida con un bajo nivel de bioetanol).

Efecto de las variables de operación

La producción promedio de bioetanol es de 34.5 g/L, con un nivel inferior de producción cercano a 20 g/L y nivel máximo de etanol de 60 g/L.

Los efectos individuales de cada factor analizados sobre la producción de etanol y sobre el crecimiento celular tras 24 horas de fermentación fueron presentados en la Tabla 15 y en las Figuras 12 y 13. La concentración de sustrato (A) y el pH del medio (B) generan efectos positivos sobre la productividad de etanol, es decir, al pasar de 12 a 20°Bx y de 4 a 5.2 unidades de pH, la productividad de etanol se ve favorecida en un aumento de 20.36 y 2.96 g/L respectivamente. A su vez la temperatura (C) genera un detrimento en la productividad ya que al aumentar la temperatura de 28°C a 35°C la concentración de etanol disminuye 9.14 g/L en promedio. El comportamiento de ambas cepas (D) es diferente, ya que la cepa LO₁ alcanzó una productividad promedio mayor de etanol que la cepa ATCC 9763 (i.e., un incremento de 7.54 g/L en promedio de etanol).

Por otra parte, la viabilidad celular disminuye por aumento en la temperatura y la concentración de sustrato, y se ve favorecida con aumentos de pH de 4 a 5.2 unidades. Esto demuestra el efecto negativo del aumento de la temperatura del medio y de la presión osmótica sobre la integridad celular. La cepa LO₁ se adaptó de mejor manera a las condiciones de fermentación y generó en promedio 3.46x10⁷ cel/ml más que la cepa de referencia ATCC 9763.

La descripción grafica de los efectos (Figuras 12 y 13) permite observar la mayor influencia de la concentración de sustrato y de la temperatura sobre la productividad de etanol, y de la temperatura y el pH sobre la generación de biomasa. El análisis de varianza (ANOVA)

corroborar lo establecido, mostrando como las variables A ($^{\circ}$ Bx) y C (T) tienen un efecto estadísticamente mayor sobre la productividad de etanol, mientras que C ($^{\circ}$ C) y B son más influyentes sobre la generación de biomasa en ambas cepas de levadura.

La interacción entre factores se muestra también en las Tablas 15 y 16. La interacción más representativa estadísticamente sobre la producción de etanol son AC, AD y BD. De acuerdo con esto, la interacción entre A y D es positiva, indicando que la productividad de etanol es mejorada empleando la cepa LO₁ y una concentración de melaza de 20 $^{\circ}$ Bx, combinación que genera en promedio un aumento en el nivel de etanol de 8.43 g/L. Otra interacción positiva es entre A y B, mostrando que la productividad de etanol se favorece a pH altos y concentraciones elevadas de melaza. Cabe destacar que su efecto no es tan considerable, aumentando la concentración de etanol producida en 3.5 g/L. Por su parte, efectos negativos son generados por la interacción entre la concentración de melaza y temperatura (AC) y entre pH y la cepa utilizada (BD).

El análisis de efectos interactivos sobre la generación de biomasa indica que las interacciones más importantes son aquellas establecidas entre AB, AC y BC. Concentraciones altas de sustrato generan mayor cantidad de biomasa cuando el pH del medio es cercano a 5.2, indicando que medios más ácidos potencian el efecto negativo de la presión osmótica sobre la viabilidad celular. El efecto negativo que genera la interacción entre la concentración de azúcares y la temperatura afecta en promedio la generación celular en 1.59×10^7 cel/ml cuando se emplean medios con altos niveles de azúcares y temperaturas altas o de baja concentración y baja temperatura.

Correlación entre variables

Los experimentos relacionados permitieron obtener un modelo que relaciona con buen ajuste las variables de operación principales sobre la producción de etanol y la generación de levadura durante un proceso fermentativo. La correlación obtenida es de 93.2% y 98.8% para el etanol producido y la biomasa generada después de 24 horas de fermentación respectivamente.

Comparación entre las cepas LO₁ y ATCC 9763

La cepa LO₁ presenta un mejor comportamiento comparada con la cepa ATCC 9763 como se planteó anteriormente. Las Figuras 16 y 17 presentan la comparación entre ambas cepas en condiciones de fermentación similares en la producción de etanol y en la generación de biomasa.

En términos generales, ambas cepas presentaron un mejor comportamiento a pH de 5.2 en comparación con pH de 4, condiciones bajo las cuales se alcanzó un mayor nivel de etanol y de biomasa. La cepa ATCC 9763 alcanzó mayor productividad de etanol que la LO₁ a bajas concentraciones de azúcares totales (12 $^{\circ}$ Bx), resultado que se invierte a condiciones de 20 $^{\circ}$ Bx. Como se mostró anteriormente, en promedio la cepa LO₁ presenta un mejor comportamiento que la cepa de levadura ATCC 9763, influenciado por su mejor adaptación a concentraciones mayores de sustrato. La cepa LO₁ genera mayores niveles de biomasa en cualquier condición de fermentación. Las mejores condiciones de fermentación para ambas cepas son 20 $^{\circ}$ Bx, 28 $^{\circ}$ C y pH de 5.2.

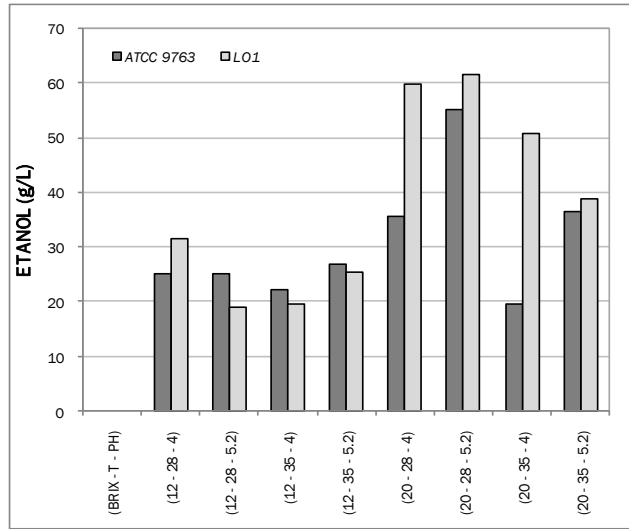


Figura 16: Comparación entre las cepas ATCC 9763 y LO1 con respecto a la producción de etanol

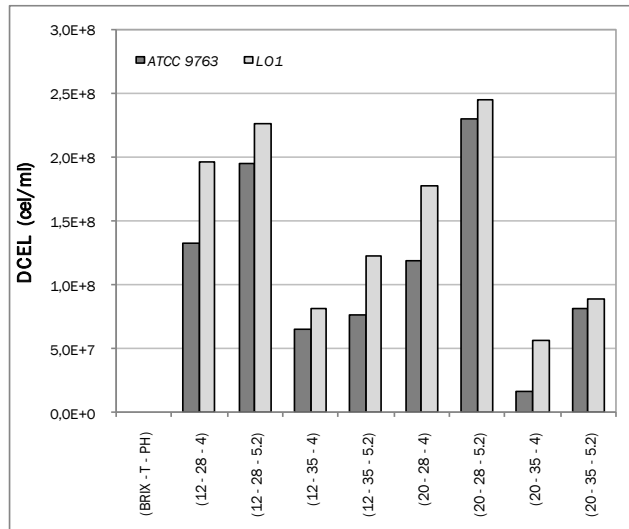


Figura 17: Comparación entre las cepas ATCC 9763 y LO1 con respecto a la generación de biomasa

4.3. DISEÑO FACTORIAL COMPUESTO CENTRAL

De acuerdo con los resultados del diseño factorial anterior, se establece que las variables más influyentes sobre la producción de etanol son la concentración de azúcares totales y la temperatura. Por esta razón, con el fin de mejorar el análisis del proceso fermentativo y la correlación entre variables de operación, se realizó un diseño factorial compuesto central para estudiar el efecto de estos dos factores.

La concentración de azúcares iniciales en el medio (A, °Bx) y la temperatura de fermentación (B, °C) fueron elegidos como variables independientes en el diseño experimental. Las variables de respuesta o variables dependientes de interés son la producción de etanol (ETA, g/L) y la generación de biomasa (DCEL, cel/ml).

El pH del medio se fijó en 4 unidades, a pesar de que en el estudio anterior valores de pH cercanos a 5 mejoraban el rendimiento de etanol. En procesos fermentativos a nivel industrial que emplean melaza o jugos de caña, valores de pH cercanos a 4 son comunes debido a la necesidad de evitar la contaminación bacteriana [24] y además, el efecto del pH no es estadísticamente considerable sobre la productividad de etanol como se presentó en la Tabla 15. La cepa de levadura utilizada por su mejor comportamiento en el diseño factorial anterior fue la LO₁.

En la Tabla 17 se presentan los factores y el dominio experimental, mientras que en la Tabla 18 se presenta la matriz de experimentos. Cada experimento se realizó por duplicado, y se presentan los valores promedio de cada uno de ellos.

Tabla 17: Factores seleccionados y dominio experimental del diseño factorial compuesto central

Variables	Código de valores				
	$(-\sqrt{2})$	(-1)	(0)	$(+1)$	$(+\sqrt{2})$
A: Concentración de melaza (°Bx)	10	12	16	20	22
B: Temperatura (°C)	28	30	34	38	40

Tabla 18: Matriz de experimentos para el diseño factorial compuesto central

Exp No	Valores codificados	
	A	B
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	$-\sqrt{2}$
7	$+\sqrt{2}$	0
8	0	$+\sqrt{2}$
9	$-\sqrt{2}$	0

Un análisis de varianza ANOVA (empleando el software STATGRAPHICS CENTURION XV) se realizó con el fin de cuantificar las respuestas del diseño experimental. Esta información incluye el valor promedio obtenido de la variable de respuesta, el valor de los 2 efectos principales y el de 2 efectos de interacción entre los factores. El efecto de cada factor es cuantificado según la influencia que tiene sobre la productividad de etanol (g/L) y sobre la generación de biomasa (cel/ml). Los coeficientes del diseño factorial compuesto central 2² y del análisis MSR fueron ajustados de acuerdo con el modelo polinomial mostrado en la Ecuación 4.

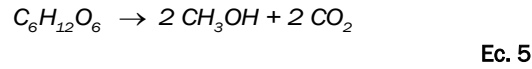
$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ij} X_i^2 + \sum_{i<j}^k \sum_j^k b_{ij} X_{ij} + e$$

Ec. 4

Donde Y_i es la respuesta ajustada, b es el coeficiente de regresión, ij son los coeficientes cuadráticos, k representa el numero de factores estudiado y e es el error del ajuste.

4.3.1. RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL COMPUESTO CENTRAL

Los resultados generales del diseño factorial se presentan en las Figuras 18 y 19. El rendimiento alcanzado en cada experimento y el porcentaje de eficiencia alcanzado se presenta en la Tabla 19. El rendimiento teórico máximo de etanol fue calculado de acuerdo con la relación estequiométrica representada por la Ecuación 5, (i.e., 51.1 gramos de etanol por cada 100 gramos de hexosa consumida). El rendimiento producto sustrato y la eficiencia alcanzada en cada experimento fueron calculadas de acuerdo con las Ecuaciones 6 y 7 [17].



$$Y_{ps} = \frac{(P_f - P_o)}{(S_o - S_f)}$$

Ec. 6

$$\%E = \frac{100 (P_f - P_o)}{0.511 (S_o - S_f)}$$

Ec. 7

Donde Y_{ps} representa el rendimiento de producto con respecto al sustrato consumido (g/g) y %E es la eficiencia de la producción de etanol con respecto al valor teórico. S y P representan la concentración de sustrato (azúcares totales) y de producto (g/L) respectivamente. Los subíndices F y O corresponden a estado final e inicial.

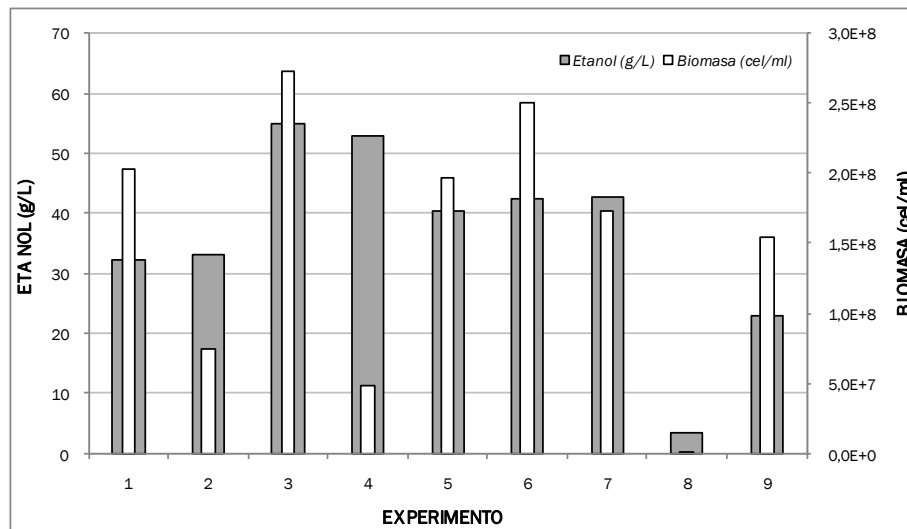
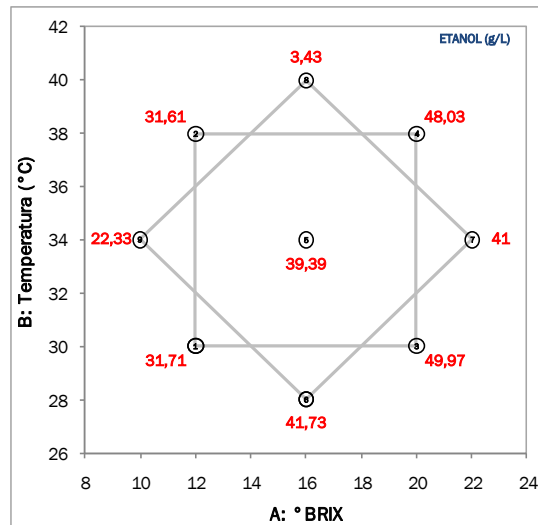


Figura 18: Resultados generales diseño factorial compuesto central

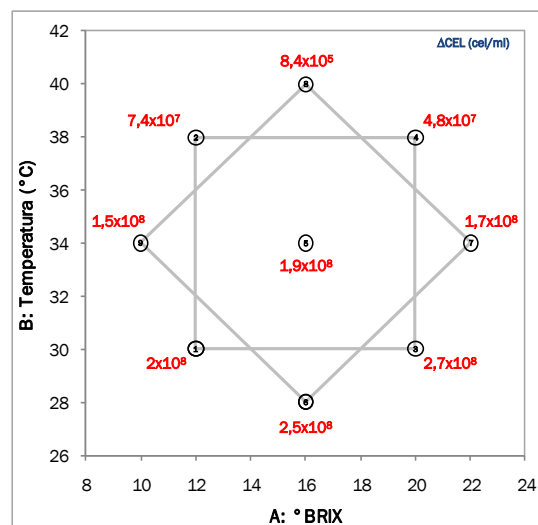
Tabla 19: Rendimiento de etanol y eficiencia alcanzada en cada experimento del diseño factorial compuesto central

Exp No.	Y_{ps} (g/g)	%E
1	0.497	95.87
2	0.496	95.57
3	0.452	86.98
4	0.485	93.32
5	0.434	83.54
6	0.480	92.35

Exp No.	Y_{ps} (g/g)	%E
7	0.318	61.17
8	0.423	78.98
9	0.424	81.88
Promedio	0.445	85.52



(a)



(b)

Figura 19: Resultados generales del diseño factorial compuesto central en función de la temperatura y la concentración de azúcares. Producción de etanol (a) y generación de biomasa (b)

El efecto de cada uno de los factores sobre las variables de respuesta es mostrado tanto en la Tabla 20 como en las Figura 20 y 21. El efecto de la interacción entre ambos factores también se presenta en la Tabla 20.

Tabla 20: Efectos estimados para las variables de respuesta ETA y DCEL para el diseño factorial compuesto central

Efecto	ETA* (g/L)	DCEL* (cel/ml)
Promedio**	43.74 ± 16.15	1.96x10 ⁸ ± 5.54x10 ⁶
A	25.35 ± 16.84	2.48x10 ⁷ ± 5.78x10 ⁶
B	-21.10 ± 16.84	-2.56x10 ⁸ ± 5.78x10 ⁶
AB	-3.28 ± 36.83	-1.06 x10 ⁸ ± 1.26 x10 ⁷

*Reportado como: Valor estimado ± Error estándar

**Valor promedio de los 9 experimentos

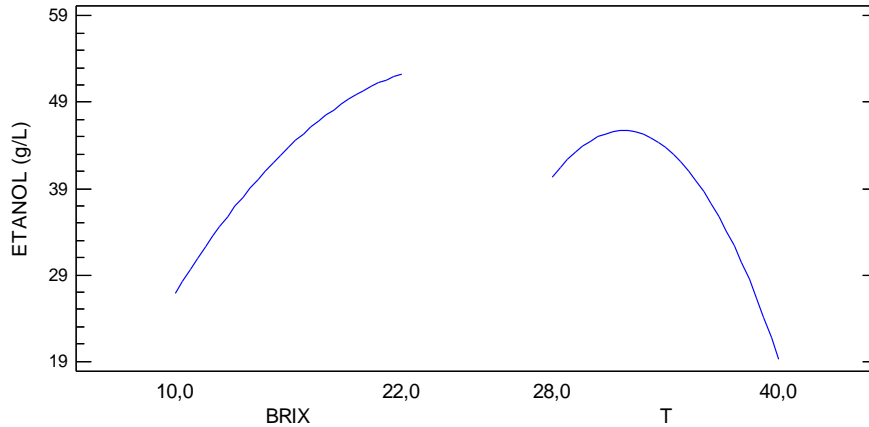


Figura 20: Representación gráfica de los efectos sobre ETA

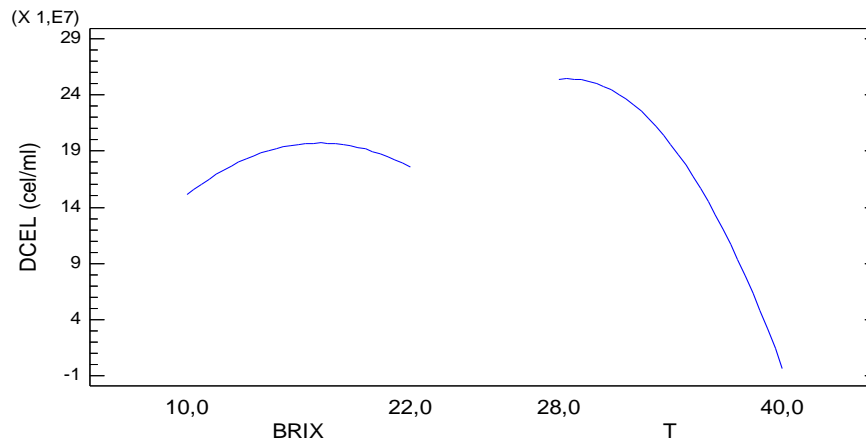


Figura 21: Representación gráfica de los efectos sobre DCEL

La importancia de cada efecto sobre las variables de respuesta puede ser determinada de mejor manera mediante un análisis de varianza, con respecto a los valores del estadístico F. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 21.

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de ETA y de DCEL en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, ninguno de los efectos tiene un valor-P menor que 0.05 (para la concentración de bioetanol) y los 3 efectos

tienen un valor-P menor que 0.05 (para la generación de biomasa), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 21: Resultado ANOVA para el diseño factorial compuesto central

Efecto	ETA (g/L)	DCEL (cel/ml)
	Valor-P*	Valor-P*
A:Concentración	0.2293	0.0233
B:Temperatura	0.2991	0.0000
AB	0.9346	0.0036

* $P \leq 0.05$ Indica que el efecto es estadísticamente significativo

A partir del conjunto de experimentos, se correlacionan los datos experimentales con el fin de presentar un modelo para la producción de bioetanol como para la generación de biomasa en función de la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación. Las superficies de respuesta y los gráficos de contorno se presentan en las Figuras 22 y 23. Las ecuaciones del modelo ajustado y la respectiva correlación se muestran en las Ecuaciones 8 y 9.

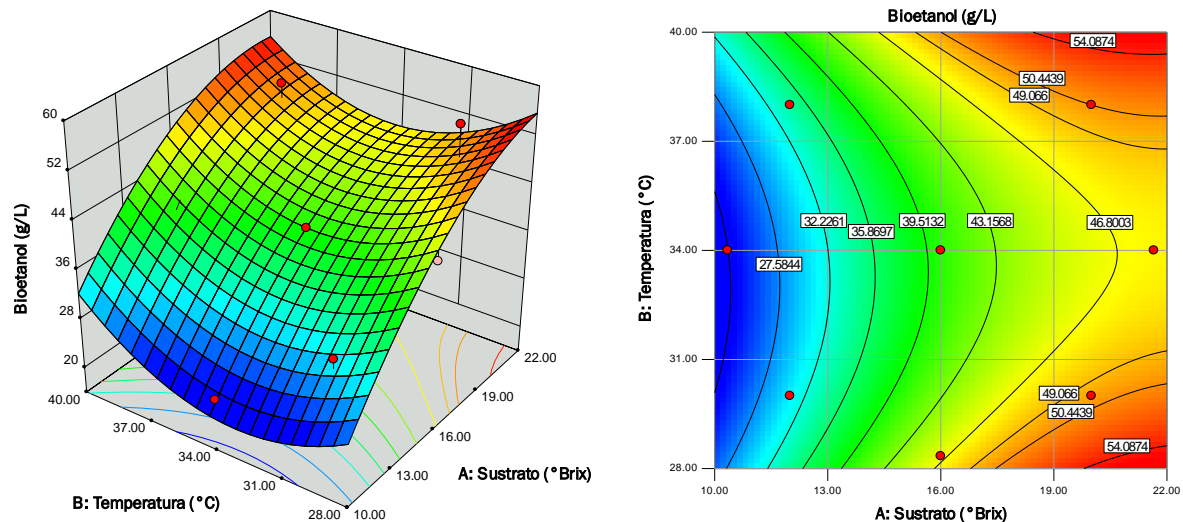


Figura 22: Superficie de respuesta para la producción de bioetanol como función de la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación

La forma como son consumidos los sustratos disponibles en el medio de fermentación es un indicativo de la actividad celular y permite evaluar que condiciones favorecen a uno u otro sustrato y cuál es más rápidamente asimilable por la levadura. En el caso de disponibilidad de sacarosa, glucosa y fructosa, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* hidroliza la sacarosa y asimila glucosa y fructosa para metabolizarlos por la ruta EMP, pero la presencia de glucosa limita la utilización de fructosa [14]. Estas características son función de las condiciones de fermentación, una de las cuales es la temperatura. En la Figura 24 se muestra el porcentaje de consumo de cada uno de los sustratos disponibles en función de la temperatura de cada experimento.

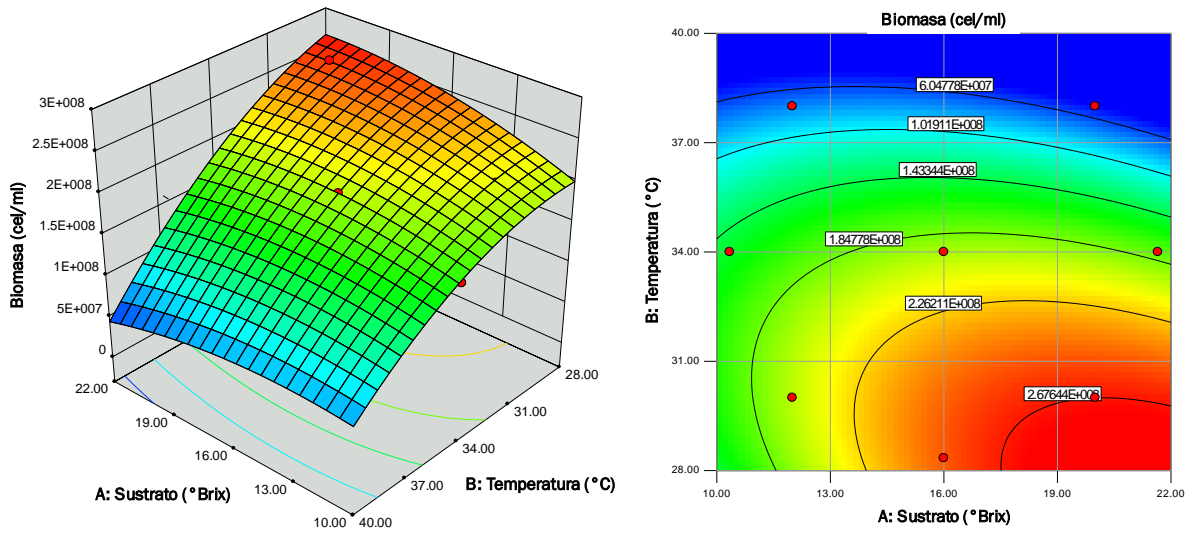


Figura 23: Superficie de respuesta para la generación de biomasa como función de la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación

$$ETA \left(\frac{g}{L} \right) = 199.33 + 9.29 A - 15.02 B - 0.173 A^2 - 0.0045 A B + 0.235 B^2$$

$$R^2 = 0.9077$$

Ec. 8

$$DCEL \left(\frac{cel}{ml} \right) = -2.526 \times 10^9 + 8.36 \times 10^7 A + 1.41 \times 10^8 B - 9.67 \times 10^5 A^2 - 1.48 \times 10^6 A B - 2.05 \times 10^6 B^2$$

$$R^2 = 0.9985$$

Ec. 9

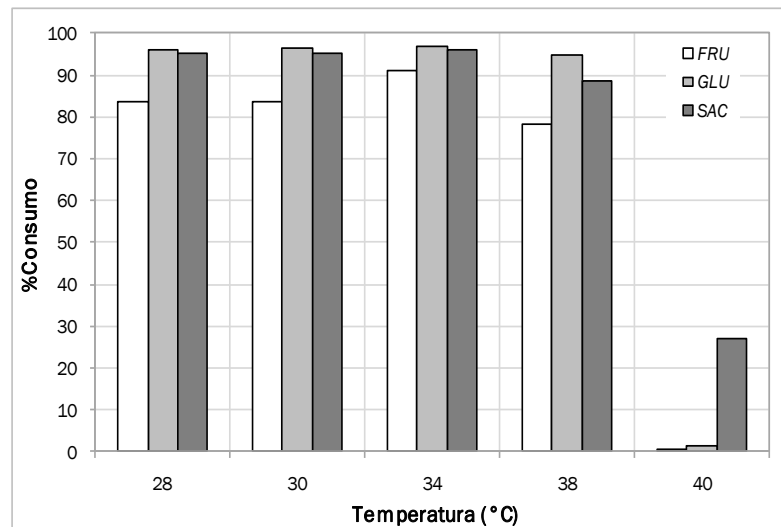


Figura 24: Porcentaje de consumo de sustratos con respecto a la temperatura de fermentación

4.3.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL COMPUESTO CENTRAL

Los experimentos realizados permiten corroborar los resultados obtenidos en el diseño factorial ²⁴. Las mejores condiciones son las de los experimentos 3 y 4 en cuanto a la producción de etanol y los experimentos 3 y 6 para la generación de biomasa, condiciones de alta concentración de sustrato. A pesar de esto, el rendimiento alcanzado y el porcentaje de eficiencia (con respecto al rendimiento estequiométrico) son resultados más representativos para determinar los mejores experimentos ya que permiten establecer el nivel de uso de sustrato para su conversión en etanol. Según la Tabla 18 los niveles de eficiencia alcanzados oscilan entre 61.17% y 95.78%, con una eficiencia promedio de 85.52%. Los experimentos 1, 2, 4 y 6 alcanzaron niveles de eficiencia superiores a 90%, valor que permite catalogarlos como altos de acuerdo con el criterio presentado por Vásquez & Dacosta [63]: rendimientos reportados como altos oscilan entre 90% y 95% para fermentaciones experimentales y entre 88% y 93% para procesos a gran escala.

Efecto de las variables de operación

La Figura 19 permite visualizar el efecto de las variables de operación sobre la producción de etanol y la generación de células. En 19 (a) se observa como a temperatura constante un aumento en la concentración de azúcares totales genera mayores niveles de etanol, aumento que es más representativo a 30°C que a 34°C o 38°C. Por otra parte a concentración constante de azúcares totales, un aumento en la temperatura genera una disminución en la productividad de etanol y a 40°C la eficiencia y la productividad decaen considerablemente.

En la Figura 19 (b) la generación de biomasa es mayor a temperatura de 30°C y disminuye con el incremento tanto de la temperatura como de la concentración del sustrato, demostrando el efecto negativo de temperaturas altas y de la presión osmótica sobre la viabilidad y la actividad celular.

La descripción de efectos se complementa con las Tablas 20 y 21 y las Figuras 20 y 21. La Tabla 20 cuantifica el efecto promedio de cada factor sobre la productividad de etanol y la generación de biomasa. Cambios en la concentración de sustrato de 10°Bx a 22°Bx generan un aumento promedio en la productividad de etanol de 25.35 g/L y de 2.48×10^7 cel/ml. La temperatura, a diferencia de la concentración de azúcares totales, genera un detrimento en la producción de etanol y en la generación de biomasa ya que al pasar de 28°C a 40°C la concentración de etanol disminuye en promedio 21.1 g/L mientras que la concentración celular decae 2.56×10^8 cel/ml. En la Figura 20 se muestra como un mayor efecto positivo sobre la concentración de etanol después de 24 horas de fermentación (45.3 g/L) es alcanzado a una temperatura de 32°C y a 22°Bx, mientras que las condiciones que generan un mayor efecto positivo sobre la generación de biomasa son 17°Bx y 28°C, como se muestra en la Figura 21.

El resultado del análisis de varianza y los ajustes realizados para cada variable de respuesta en función de la temperatura y la concentración de sustrato arrojan una muy buena correlación en la predicción de la generación de biomasa y una baja correlación en la predicción de etanol. Esto discrepa de las correlaciones alcanzadas en el diseño factorial ²⁴ en el cual la predicción de la concentración de etanol y de la generación de biomasa superó el 90% de ajuste. Esta diferencia permite establecer que el aumento en el rango de las variables (28°C – 40°C, 10°Bx – 22°Bx) afecta la exactitud en la predicción de las respuestas de cada fermentación. Las Figuras 22 y 23 presentan las superficies de respuesta, los contornos y la ecuación del modelo para la producción de etanol y para la generación de biomasa en función

de la temperatura de fermentación y de la concentración del sustrato, en este caso melaza de caña de azúcar.

Consumo de sustrato

El porcentaje de consumo de cada uno de los sustratos durante las 24 horas de fermentación de melaza indica que la sacarosa y la glucosa son los sustratos más rápidamente empleados y procesados por la levadura durante el proceso. La sacarosa es hidrolizada con una muy elevada eficiencia mientras que la glucosa reprime el consumo de fructosa, ya que este sustrato es el de menor consumo en cada uno de los experimentos. Los niveles de consumo están fuertemente influenciados por la temperatura de fermentación:

- A 28 °C, 30 °C y 34 °C el nivel de hidrólisis de la sacarosa se mantiene entre 95% y 97%, el consumo de glucosa entre 96% y 98% y el consumo de fructosa entre 83% y 95%.
- A 38 °C el porcentaje de hidrólisis y asimilación de sustratos disminuye considerablemente y es función de la concentración de azúcares totales en el medio de fermentación, ya que a mayor concentración de azúcares totales en el medio, menor es el porcentaje de consumo. El consumo de sacarosa es de 96% y 81%, el de glucosa de 96% y 93% y el de fructosa es de 83% y 73% para fermentaciones de 12 °Bx y de 20 °Bx respectivamente.
- La eficiencia en el consumo de sustratos decae representativamente a 40 °C, lo que se traduce en menor productividad de etanol y menor generación de biomasa. El consumo de sacarosa alcanzado a esta temperatura es de 27%, la asimilación de glucosa de 1.5% y de fructosa 0.62%. La gran diferencia entre los porcentajes de hidrólisis de sacarosa en comparación con las tasa de asimilación de azúcares reductores, son un claro indicativo de que a temperaturas elevadas la capacidad enzimática para la hidrólisis de la sacarosa no se afecta en igual proporción que el transporte de sustrato al interior de la levadura para su posterior procesamiento.

4.4. FERMENTACIÓN DE MELAZAS A NIVEL PILOTO BAJO CONDICIONES ANAERÓBICAS

Dos condiciones de altos rendimientos fueron seleccionadas con el fin de desarrollar fermentaciones a nivel piloto utilizando la cepa LO₁. La selección incluye una condición de fermentación convencional (i.e., 16 °Bx y 28 °C) y una fermentación a temperaturas elevadas (i.e., 20 °Bx y 38 °C), de interés debido al auge de procesos realizados a condiciones de termotolerancia. Las condiciones son presentadas en la Tabla 22. Los materiales, métodos y procedimientos se explicaron en el Capítulo 3.

Un biorreactor (Biotrón LiFlus GX) con control de de temperatura y de agitación fue utilizado para realizar las fermentaciones de 1 L. La agitación fue controlada en 100 RPM y los resultados del seguimiento de las variables permitieron ajustar los parámetros de un modelo cinético. Las fermentaciones de 300 L se realizaron con control de temperatura y sin control de la agitación del medio. Los resultados de estas fermentaciones se presentan en la Tabla 23.

Tabla 22: Condiciones iniciales de fermentaciones a nivel piloto

Variable	Condición 1	Condición 2
Cepa		LO ₁
Temperatura (°C)	28	38
Concentración de sustrato (°Bx)	16	20
pH		4
Tiempo de fermentación (h)		24
%E a nivel experimental*	92.35	93.32

*Alcanzado en el diseño factorial compuesto central

Tabla 23: Comparación de eficiencias alcanzadas a nivel experimental y piloto

Volumen	Temperatura (°C)	Concentración (°Bx)	%E	Referencia	
100 ml	30	12	95.87	Este trabajo	
	38	12	95.57		
	38	20	93.32		
	28	16	92.35		
1 L	38	20	88.7		
	28	16	90.1		
300 L	38	20	85.74		
	28	16	88.16		
Nivel experimental			90 - 95%		[63]
Nivel industrial			87 - 93%		
Nivel industrial con medios ricos en sacarosa			93%	[13]	

Modelo cinético del proceso fermentativo

Un modelo que incluye 3 tipos de inhibición (i.e., sustrato, producto y crecimiento celular), reportado por de Andrade *et al.* [64] fue utilizado. Los parámetros fueron ajustados usando un método de minimización de los datos adquiridos en función del tiempo de fermentación (i.e., sustrato consumido, bioetanol producido y biomasa generada). Las expresiones matemáticas del modelo se presentan en las Ecuaciones 10 a la 15.

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad \text{Ec. 10}$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad \text{Ec. 11}$$

$$\frac{dP}{dt} = -r_p \quad \text{Ec. 12}$$

$$r_x = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n X \quad \text{Ec. 13}$$

$$r_p = Y_{px} r_x + m_p X \quad \text{Ec. 14}$$

$$r_s = \left(\frac{r_x}{Y_x} \right) + m_x X \tag{Ec. 15}$$

Donde X es la concentración de biomasa, r_x la tasa de formación de biomasa (g/L h), r_s la tasa de consume de sustrato (g/L h), r_p la tasa de formación de producto (g/L h), μ_{max} la tasa específica máxima de crecimiento (h⁻¹), K_s el parámetro de saturación de sustrato (kg/m³), K_i el parámetro de inhibición de sustrato (m³/kg), X_{max} la concentración de biomasa cuando el crecimiento celular se detiene (kg/m³), P_{max} la concentración de producto cuando el crecimiento celular se detiene (kg/m³), m y n representa parámetros de inhibición celular y de producto respectivamente, Y_{px} la constante de Luedeking–Piret asociada al crecimiento (kg/kg), m_p la constante de Luedeking–Piret no asociada al crecimiento (kg/kg h), Y_x el parámetro limite de rendimiento celular (kg/kg) y m_x el parámetro limite de rendimiento celular (kg/kg h).

De acuerdo con la anterior descripción, existen 11 parámetros a ser estimados a partir de las observaciones experimentales y algunos de estos son parámetros dependientes de la temperatura (i.e., μ_{max} , X_{max} , P_{max} , Y_x y Y_{px}). Esta dependencia de la temperatura es descrita por la Ecuación 16.

$$TDP = a + bT \tag{Ec. 16}$$

Donde TDP representa cada uno de los parámetros dependientes de la temperatura, a y b son las constantes ajustadas y T la temperatura de fermentación (°C).

En la Tabla 24 se presentan los valores de los parámetros ajustados del modelo cinético. La Figura 25 muestra el ajuste par a las fermentaciones realizadas bajo las Condiciones 1 y 2 descritas anteriormente. El porcentaje de error alcanzado es de 7.2% y 9.1% para ambas condiciones. Estos valores son satisfactorios debido a los bajos niveles de error y este modelo puede ser utilizado confiablemente.

Tabla 24: Parámetros ajustados para el modelo cinético

Parámetro	Unidades	Valor	
K_s	kg/m	4.1	
K_i	kg/m	0.0028	
m_p	kg/kg h	0.1	
m_x	kg/kg h	0.2	
m	-	1	
n	-	1	
		A	B
μ_{max}	h ⁻¹	6.3738	-0.0196
X_{max}	kg/m	-2261.2	7.5962
P_{max}	kg/m	-254	0.9623
Y_x	kg/kg	6.2057	-0.0197
Y_{px}	kg/kg	-108.49	0.3652

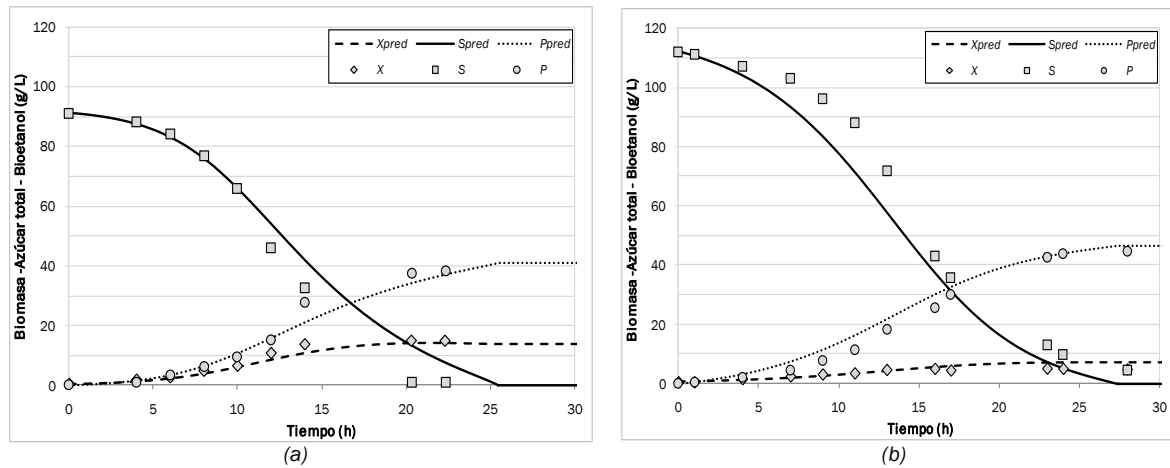


Figura 25: Ajuste del modelo cinético para la Condición 1 (a) y la Condición 2 (b)

4.5. SIMULACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO Y ANÁLISIS ECONÓMICO

4.5.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

El proceso de producción de bioetanol puede ser descrito como un proceso de 5 etapas: (i) pretratamiento de materias primas, (ii) hidrólisis de la sacarosa, (iii) fermentación, (iv) separación y deshidratación del bioetanol, y (v) tratamiento de aguas residuales. El esquema general para la producción de bioetanol a nivel industrial a partir de melaza de caña de azúcar se muestra en la Figura 26.

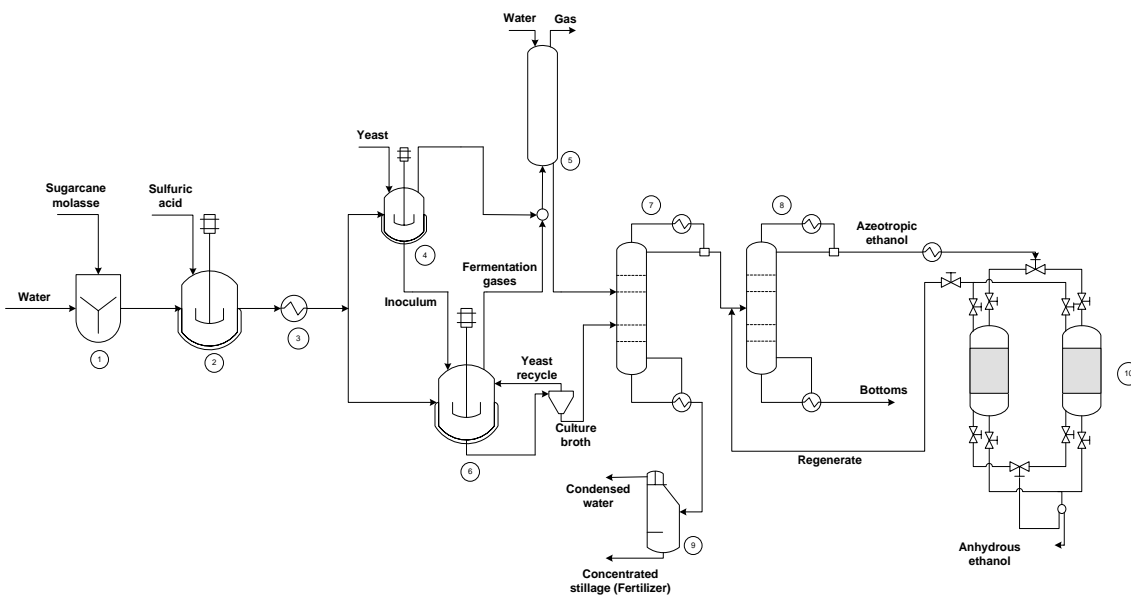


Figura 26: Diagrama de la producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar. 1. Mezclador, 2. Reactor de hidrólisis, 3. Intercambiador de calor, 4. Tanque de propagación de levadura, 5. Columna de absorción, 6. Tanque de fermentación, 7. Columna de concentración, 8. Columna de rectificación, 9. Evaporador para tratamiento de vinazas, 10. Deshidratación vía tamices moleculares

Durante la producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar, el pretratamiento de la materia prima incluye la dilución de la melaza previo a la hidrólisis ácida de la mezcla (90 °C) con el fin de esterilizar y desdoblar las moléculas de sacarosa en glucosa y fructosa. El hidrolizado es posteriormente enfriado hasta alcanzar la temperatura de fermentación. La fermentación es llevada a cabo empleando la cepa de levadura *S. cerevisiae*, la cual es separada de la mezcla por centrifugación y recirculada al fermentador donde es mezclada con levadura “fresca” proveniente del tanque de propagación. Finalizada la fermentación, el caldo de fermentación contiene aproximadamente 8% (w/w) de bioetanol, el cual es recuperado en el paso de separación que consiste en dos columnas de destilación. En la primera columna (concentración) la solución acuosa de etanol es concentrada hasta 63% (w/w) y en la segunda (rectificación) la concentración de la corriente alcanza una composición cercana a la del azeótropo de la mezcla (95.6%w/w). La deshidratación de bioetanol es llevada a cabo principalmente empleando un sistema de tamices moleculares [65].

4.5.2. PROCEDIMIENTO DE SIMULACIÓN Y ANÁLISIS ECONÓMICO

Con el fin de evaluar y comparar la rentabilidad de la producción de etanol a partir de melaza de caña de azúcar bajo las condiciones seleccionadas a través del análisis MSR (i.e., Condición 1 y Condición 2), se realizó una evaluación energética de los procesos y el cálculo de los costos de producción. La simulación del proceso fue la base para la evaluación de los requerimientos energéticos y económicos de ambas condiciones y se llevó a cabo utilizando el software Aspen Plus (Aspen Technology Inc., EE.UU.). Los datos de entrada para la simulación del proceso se muestran en la Tabla 25. Algunos de los parámetros y especificaciones son reportados por Triana *et ál.* [66] y Quintero *et ál.* [2]. Para los dos procesos, la simulación utilizó una capacidad aproximada de producción de 8000 kg/h de etanol anhidro y la materia prima necesaria se calculó de acuerdo con los rendimientos reportados en el diseño factorial mencionado anteriormente. Parte de los datos de propiedades físicas de los componentes necesarios para las simulaciones (e.g., biomasa, cenizas, azúcares), se obtuvieron de Wooley y Putsche [67]. El modelo termodinámico NRTL se utilizó para calcular los coeficientes de actividad en la fase líquida y la ecuación de estado de Hayden O'Connell fue utilizada para modelar la fase vapor.

Las especificaciones preliminares de las columnas de destilación se determinaron utilizando el método DSTWU incluido en Aspen Plus. Este procedimiento proporciona una estimación inicial del número mínimo de etapas teóricas, la relación de reflujo mínimo, la localización de la etapa de alimentación y los productos de división de la columna [2,66]. Con esta información, se realiza el cálculo riguroso de las columnas de destilación mediante el módulo RadFrac de Aspen Plus. La estimación del consumo de energía se llevó a cabo sobre la base de los datos de simulación de energía térmica requerida por los reactores, intercambiadores de calor, rehervidores y las unidades relacionadas. Los procesos de hidrólisis ácida y de fermentación se simularon utilizando un reactor discontinuo, con expresiones cinéticas (i.e., modelo descrito anteriormente) que consideran la conversión de la sacarosa en glucosa y fructosa, así como la transformación de la sacarosa, glucosa y fructosa en la biomasa celular, alcohol etílico, dióxido de carbono y ácido acético. Otros productos de la fermentación no fueron considerados.

El análisis económico se realizó utilizando el paquete Aspen Icarus Process Evaluator (Aspen Technology, Inc., EE.UU.). Este software calcula los costos de capital de las unidades de proceso, así como los costos de operación, entre otros datos, utilizando la información proporcionada por el diseño de Aspen Plus y los datos introducidos por el usuario [66]. Este análisis se ha estimado en dólares de EE.UU. para un período de 10 años, con una tasa de

interés anual del 16.02% (típico de la economía colombiana), teniendo en cuenta el método de depreciación en línea recta y un impuesto sobre la renta del 33%. Los precios y los datos económicos utilizados en este análisis corresponden a las condiciones colombianas y se determinan con una tasa de cambio de 1800 pesos colombianos por dólar de los EE.UU. La información de costos de materia prima, costos de servicios y los costos de los productos se muestran en la Tabla 26.

Tabla 25: Información principal utilizada en la simulación del proceso

Característica	Valor	
	Condición 1	Condición 2
Materia prima	Melaza de caña de azúcar	
Composición	Agua 18.8%, Hexosa 8.9%, Sacarosa 71.3%, Cenizas 0.89%	
Pretratamiento	Hidrólisis ácida	
Agente	H ₂ SO ₄	
Concentración del ácido	13.5 g/kg melaza	
pH	4	
Temperatura	90 °C	
Presión	1 atm	
Tiempo de residencia	3 h	
Fermentación	Proceso por lotes	
Agente	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LO ₁	
Pre inóculo	10% del volumen total de fermentación	
Densidad celular inicial	5x10 ⁶ cel/ml	
Temperatura	28 °C	38 °C
Concentración de azúcares	16 °Bx	20 °Bx
pH	4	
Tiempo de residencia	20 h	23 h
Separación	Concentración y rectificación.	
Numero de etapas	10	
Tipo de condensador	Total	
Presión	1 atm	
Deshidratación de bioetanol	Tamices moleculares	
Número de unidades	2	
Temperatura	116 °C	
Presión	1.7 atm (adsorción), 0.14 atm (desorción)	
Tiempo de ciclo	10 min	

4.5.3. RESULTADOS SIMULACIÓN DEL PROCESO

Las Tablas 27 y 28 muestran algunos resultados de la simulación del proceso para las dos condiciones evaluadas. Las composiciones de las corrientes calculadas por simulación concuerdan muy bien con los resultados reportados para procesos comerciales e informes de la literatura como la presentada por Quintero *et ál.* [2].

Tabla 26: Precios utilizados en el análisis económico

Ítem	Unidad	Costo
Materias primas		
Melaza	US\$/kg	0*
Subproductos		
Vinaza concentrada	US\$/kg	0.0204
Servicios		
Electricidad	US\$/kWh	0.03
Agua de enfriamiento	US\$/m ³	0.01
Vapor de baja presión	US\$/ton	8.18
Otros		
Labor operario	US\$/h	3.3
Labor supervisor	US\$/h	4.95

*Subproducto de la producción de azúcar en una destilería

Tabla 27: Flujos másicos y composiciones de algunas corrientes de proceso para la producción de bioetanol bajo la Condición 1

Componente	Corriente			
	Melaza diluida (%w/w)	Medio de fermentación (%w/w)	Bioetanol anhidro (%w/w)	Vinazas concentradas (%w/w)
Etanol	0	0.07	99.5	0.02
Agua	84.77	84.73	0.41	42.46
Sacarosa	13.38	4.43	0	6.27
Hexosa	1.67	10.22	0	17.89
Ceniza	0.16	0.23	0	0
Levadura	0	0.06	0	0
Otros	0	0.25	0.09	33.35
Total (kg/h)	134475	133743.26	7771.32	985.15

Tabla 28: Flujos másicos y composiciones de algunas corrientes de proceso para la producción de bioetanol bajo la Condición 2

Componente	Corriente			
	Melaza diluida (%w/w)	Medio de fermentación (%w/w)	Bioetanol anhidro (%w/w)	Vinazas concentradas (%w/w)
Etanol	0	0.1	99.5	0.01
Agua	80.97	81.03	0.34	42.55
Sacarosa	16.72	0.45	0	6.14
Hexosa	2.09	0.75	0	17.76
Ceniza	0.2	0.26	0	0
Levadura	0	0.03	0	0
Otros	0	17.36	0.16	33.53
Total (kg/h)	107601.62	106921.93	8070.43	992.85

La cantidad de vinaza generada en el proceso por cada litro de etanol obtenido a partir de la simulación (i.e., 11.4 y 8.46 L de vinaza / L de bioetanol, tanto para la Condición 1 y Condición 2) está dentro del rango reportado por Quintero *et ál.* [2] a partir de datos

experimentales (i.e., entre 10 y 20 L vinazas / L de bioetanol). Esta relación junto con la cantidad de bioetanol producido por unidad de melaza (L/kg) se muestra en la Figura 27.

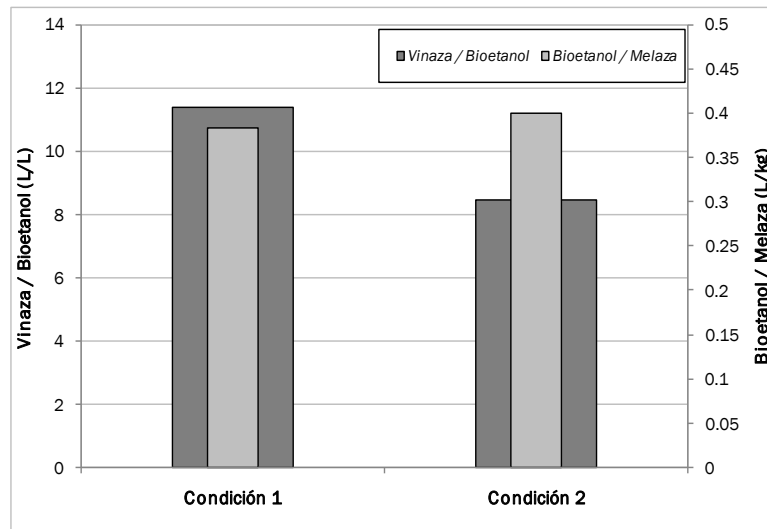


Figura 27: Relación entre el bioetanol producido, vinaza generada y melaza alimentada para la Condición 1 y la Condición 2

La reducción en la generación de vinaza se traduce en menores costos de energía durante el tratamiento (evaporación), así como en una reducción del impacto ambiental de esta corriente en caso de que se descargue a un cuerpo receptor sin ningún tratamiento. El potencial de contaminación de las vinazas es considerable ya que puede superar valores de demanda química de oxígeno (DQO) de 100 g/L [68].

Un parámetro importante es la comparación de los requerimientos energéticos de los diferentes procesos. Los valores de la demanda total de energía para las principales etapas de los procesos evaluados se muestran en la Figura 28. El proceso bajo la Condición 2 es energéticamente más favorable, con un consumo energético total de un 18.7% menos que el proceso bajo la Condición 1. Esto se debe a un menor consumo de energía durante la etapa de enfriamiento después de la hidrólisis ácida y al menor requerimiento de agua para la dilución de la melaza y para el enfriamiento de las corrientes de proceso y reactores. La etapa que consume más energía es la etapa de separación (50 - 60%), seguido de un tratamiento previo paso (20 - 30%) y finalmente con el menor requerimiento es la unidad de la fermentación (13 - 15%).

Es interesante analizar la unidad de la fermentación, porque una de las ventajas de una cepa termotolerante es la eficiencia a temperaturas alrededor de 40 ° C. La temperatura del caldo de fermentación en los países tropicales como Colombia puede aumentar aproximadamente 10 ° C sólo debido a la exotermicidad del proceso [34]. Debido a esto, fermentaciones llevadas a cabo a temperaturas más bajas requieren más agua de enfriamiento para evitar el estrés térmico de la levadura y con esto la disminución de la productividad de bioetanol [34].

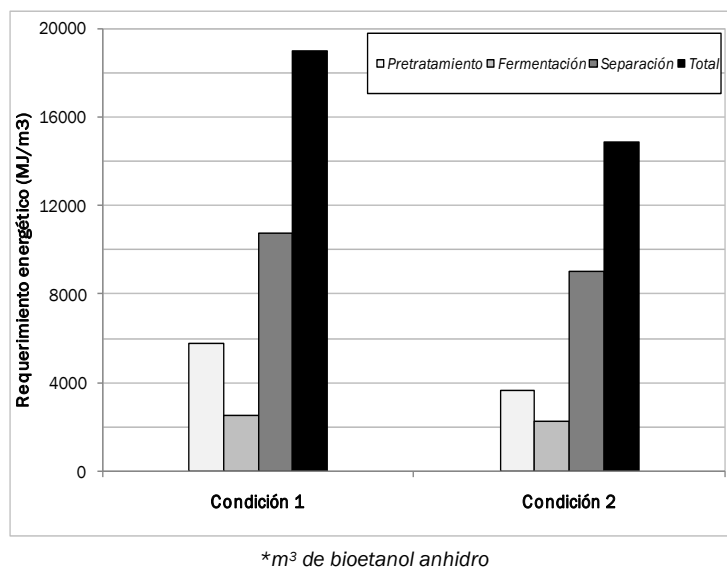


Figura 28: Requerimientos energéticos del proceso bajo la Condición 1 y la Condición 2

4.5.4. RESULTADOS EVALUACIÓN ECONÓMICA

Los resultados del análisis económico desarrollado en el paquete Aspen Icarus Process Evaluator se presentan en la Tabla 29. El costo total estimado para ambas alternativas es diferente en un 5.22% a favor del proceso bajo la condición 2. Esta diferencia se basa principalmente en el costo de las materias primas, ya que el proceso de la Condición 2 requiere menos agua de dilución debido a que la corriente de fermentación es más concentrada. Otro factor de desigualdad es el consumo de energía. En la sección anterior se mostro una diferencia de 18.7% en el gasto energético de ambos procesos, que se traduce en menores necesidades de fluidos de servicio y por lo tanto menor costo del servicio.

Tabla 29: Costos de producción de bioetanol para la Condición 1 y Condición 2

Categoría	Unidad	Condición 1	Condición 2
Materia prima	Mill. US\$/año	1.119	0.850
Costo de operación	Mill. US\$/año	0.118	0.118
Costo de mantenimiento	Mill. US\$/año	0.129	0.117
Servicios	Mill. US\$/año	3.529	3.223
Costos totales de operación	Mill. US\$/año	5.454	5.138
Depreciación del capital	Mill. US\$/año	2.082	2.013
Venta de vinaza	Mill. US\$/año	0.160	0.161
Costo total	Mill. US\$/año	7.376	6.890
Producción de bioetanol	Mill. L/año	77.125	80.060
Costo de producción de bioetanol	US\$/L	0.096	0.087

El coste del bioetanol producido por los dos procesos analizados se presenta en la Tabla 30. Este valor se compara con los costos reportados en la literatura con diferentes materias primas. El costo de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar es claramente más económico, debido principalmente a los costos de pre-tratamiento (i.e., en el caso de la melaza de caña de proceso es tecnológicamente sencillo) y el costo de las materias primas,

ya que la melaza se dispone como un subproducto del proceso de producción de azúcar en una destilería.

Tabla 30: Costos de producción de bioetanol a partir de diferentes materias primas

Materia prima	Costo de producción (US\$/L)	Referencia
Jugo de caña de azúcar	0.16 - 0.22	
Maíz	0.25 - 0.42	[2]
Trigo	0.38 - 0.48	
Zoca de café	0.28 - 0.77	[66]
Melaza de caña de azúcar	0.087 - 0.096	Este trabajo

4.6. FERMENTACIONES BAJO CONDICIONES DE AEROBIOSIS (EVALUACIÓN DEL EFECTO CRABTREE)

Una de las potenciales modificaciones a los procesos fermentativos lo constituyen procesos en los cuales se cuente con concentraciones de azúcares fermentables elevadas. Existe una clasificación para las fermentaciones de acuerdo con la concentración de azúcares, dentro de las cuales se incluyen aquellas condiciones cercanas a la concentración inhibitoria del crecimiento y producción de etanol por parte de levaduras, debido a la elevada presión osmótica del medio [69].

Fermentaciones con concentraciones de azúcares totales superiores a 180 g/L (high gravity) y aún más, superiores de 250 g/L (very high gravity) son procesos de interés para aminorar costos de operación principalmente en las etapas de separación posteriores a la fermentación [22]. Para desarrollar con éxito este tipo de fermentaciones pueden implementarse procesos bajo condiciones aeróbicas o condiciones anaeróbicas. Para la primera condición se requiere de la implementación de un sistema de oxigenación eficiente para estimular y favorecer el metabolismo fermentativo de la levadura (efecto Crabtree), el cual puede generar un aumento significativo en los costos de operación, mientras que para la condición anaeróbica es necesario contar con un microorganismo osmotolerante (o condiciones del medio que minimicen el efecto de la presión osmótica, tales como la adición de osmoprotectores, la adición de nitrógeno asimilable, entre otros), que asimile con rapidez los sustratos fermentables y genere etanol con rendimientos importantes [69].

Se realizaron dos fermentaciones a nivel piloto, empleando 80 L de melaza diluida en cada una y concentraciones de azúcares reductores de 264 g/L y de 130 g/L respectivamente. Un inóculo adaptado a las condiciones de fermentación de 7 L fue empleado en cada proceso con el fin de suministrar la biomasa necesaria para iniciar cada proceso fermentativo en condiciones adecuadas. La cepa LO₁ fue empleada en estas fermentaciones, en las cuales se ajustó el pH inicial a 4 aproximadamente y la temperatura fue mantenida entre 28 °C y 35 °C. Las condiciones iniciales de estas fermentaciones se presentan en la Tabla 31.

Los resultados de estas fermentaciones, denominadas Crabtree 1 y Crabtree 2 se presentan en la Tabla 32 y en las Figuras 29 y 30.

Tabla 31: Condiciones iniciales de fermentación Crabtree

Variable	Crabtree 1	Crabtree 2
V inóculo (L)	7	7
V mosto (L)	79.5	80
Agitación (RPM)	300	340
pH inicial	4.1	4.3
AR iniciales (g/L)	264	130
T inicial (°C)	31.2	32.5

Tabla 32: Resultado de fermentaciones Crabtree

Variable	Crabtree 1	Crabtree 2
AR _o (g/L)	264.4	130.4
AR _{máx} (g/L)	312.5	169.9
AR _f (g/L)	86.4	25.2
Cel _o (cel/ml)	-	53.3
Cel _{máx} (cel/ml)	-	4.9x10 ⁷
Cel _f (cel/ml)	-	6.8x10 ⁷
Etanol _f (g/L)	56.4	53.3
Y _{ps}	0.178	0.2629
Eficiencia (%)	34.9	51.5

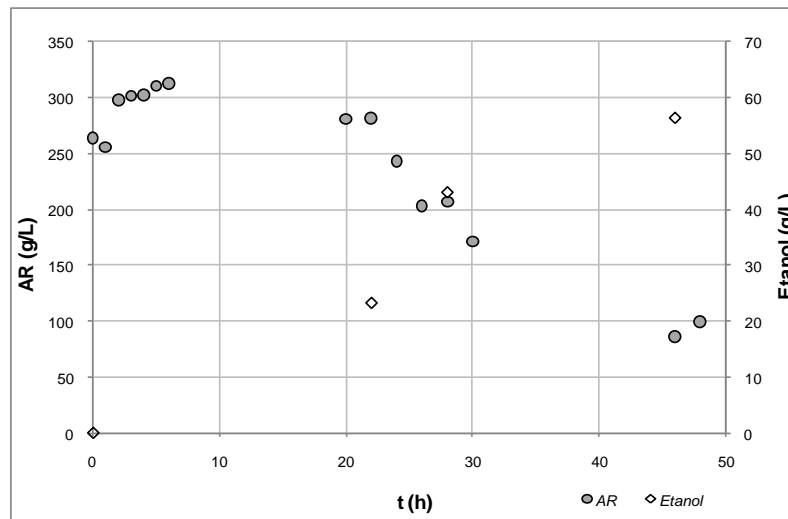


Figura 29: Evolución de la fermentación Crabtree 1

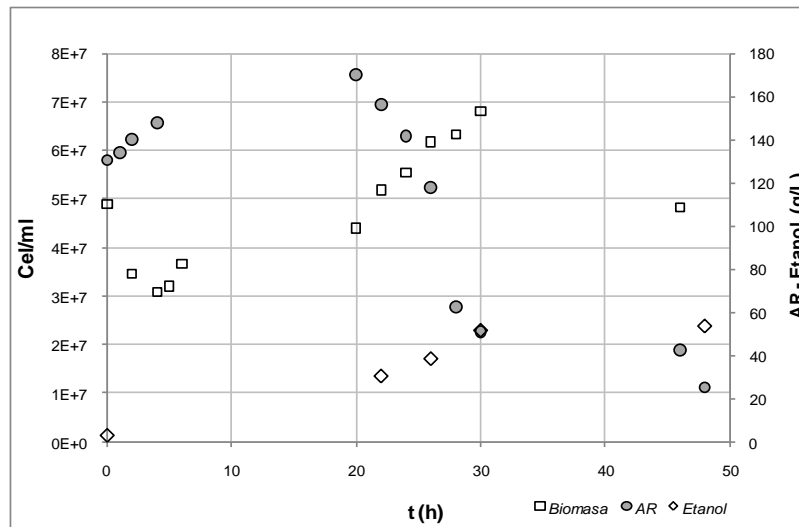


Figura 30: Evolución de la fermentación Crabtree 2

La evolución de estas fermentaciones y los rendimientos obtenidos permiten concluir lo siguiente:

- Aunque la concentración celular es muy elevada y permanece constante, no se traduce en una mayor velocidad de producción de etanol ni de consumo de sustrato. Esto se comprueba en las dos fermentaciones presentadas, en las cuales el 50% de la producción total de etanol es alcanzada pasadas 25 horas aproximadamente, tiempo al cual la mayoría de fermentaciones convencionales han alcanzado su producción máxima.
- Los rendimientos obtenidos y la elevada densidad celular (la concentración de biomasa inoculada permanece prácticamente invariable a lo largo de la fermentación) indica que el sustrato inhibe el crecimiento de la levadura hasta niveles superiores que se traducirían en mayores tasas de etanol. Además de esto, debe ser analizado el efecto de la cantidad de oxígeno adicionada, siendo este un factor predominante para la estimulación de la asimilación de sustrato y su conversión hacia etanol.
- Cada una de las fermentaciones exhibieron un aumento en la concentración de azúcares reductores durante las primeras horas del proceso. Este comportamiento es común en la utilización de melazas, debido a que la levadura se encarga de hidrolizar la sacarosa remanente que se alimenta al proceso y con esto eleva la cantidad de glucosa y fructosa en el medio de fermentación. Esta etapa de hidrólisis, coincide con la etapa de latencia del microorganismo durante la fermentación Crabtree 2, indicando esto que la inhibición por sustrato y la presión osmótica son más influyentes durante la primera etapa del proceso, en la cual se presenta un aumento considerable en la cantidad de azúcares directamente asimilables. Este aumento permite inferir que la velocidad de hidrólisis (proceso exo citoplasmático) es superior a la velocidad de ingreso de nutrientes al citoplasma, comprobando la afectación del transporte activo a través de la membrana a causa de la presión osmótica generada por el medio.
- Los perfiles de producción y consumo de sustrato son similares en ambas fermentaciones. Esto indica que las concentraciones de azúcar alcanzadas están aun distantes de los niveles de inhibición completa del crecimiento y de la actividad productiva del microorganismo.

4.7. CONCLUSIÓN

Se presentó en este capítulo el comportamiento fermentativo de dos cepas de levadura (una comercial y la segunda aislada de procesos de fermentación a escala piloto) durante la conversión de melaza a diferentes niveles y condiciones de operación. La cepa LO₁ presentó buena adaptación y productividad en procesos fermentativos realizados a una temperatura de 38 °C. Procesos realizados a altas temperaturas de fermentación son de interés debido a la reducción en costos de enfriamiento, costos de materias primas, costos del sistema de separación, etc., como se demostró mediante la simulación y análisis económico del proceso.

Los resultados obtenidos en cada nivel son coincidentes tanto desde el punto de vista de productividad de etanol alcanzada como de viabilidad celular y consumo de sustrato.

Los bajos rendimientos obtenidos en fermentaciones aeróbicas (efecto Crabtree) están por debajo de los niveles experimentales de eficiencia reportados en la literatura para procesos anaeróbicos, pero permiten realizar un análisis amplio de los factores que generan mayores efectos sobre el metabolismo fermentativo del microorganismo. Además de esto se demostró la limitación de implementar estos microorganismos (no adaptados o modificados) en procesos no convencionales como en fermentaciones con alta concentración inicial de sustrato y bajo aerobiosis, buscando con esto favorecer el efecto Crabtree.

CAPÍTULO 5

PROTOCOLO PARA LA SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTATIVA

Los enfoques empleados en la actualidad para mejorar la eficiencia y rendimiento de sustratos azucarados, amiláceos y lignocelulósicos son de tipo tecnológico y microbiológico, siendo el primero altamente dependiente del segundo. Está claro que el éxito del proceso de producción de bioetanol depende del desempeño de un microorganismo particular y este a su vez está restringido por las características metabólicas. Un ejemplo del anterior postulado es que la utilización de microorganismos con ciertas características (e.g., el consumo directo de material lignocelulósico y producción de etanol) haría innecesarios el uso de algunas operaciones de pretratamiento de materias primas [46].

Como se presentó en el Capítulo 2, un procedimiento de selección debe incluir una gran cantidad de factores y variables (lo que aumenta su grado de complejidad y disminuye el porcentaje de éxito), que pueden analizarse de acuerdo con distintas perspectivas. Una de ellas es el enfoque experimental, en el cual se evalúa el comportamiento de los microorganismos ante condiciones de operación a nivel de laboratorio o nivel piloto, seleccionando aquel que cumpla con los requerimientos de productividad, viabilidad y estabilidad planteados. Aunque a simple vista es el método más preciso y exitoso, los altos costos incurridos, la duración de los experimentos y análisis, las innumerables características que afectan o favorecen el comportamiento metabólico de determinado microorganismo y la necesidad de personal especializado, hacen de la experimentación exhaustiva una ruta poco factible para su aplicación a nivel industrial. Por esta razón, un protocolo sencillo, que haga uso de información teórica, criterios bioquímicos y microbiológicos, y en menor proporción de experimentación, es de gran utilidad en los procesos de producción de bioetanol a partir de una materia prima específica y bajo determinadas condiciones de operación [46].

Los dos criterios de mayor importancia para seleccionar un microorganismo son la obtención de niveles elevados de etanol en tiempos cortos. Pero no son los únicos criterios a considerar, ya que de acuerdo con la materia prima a emplear, el tipo de aplicación del producto a obtener y restricciones ambientales y económicas, deben cumplirse otros requisitos. Una posible secuencia de pasos para la selección de los microorganismos más apropiados para la producción de bioetanol es presentado a lo largo de este capítulo, para los tres tipos principales de materias primas (e.g., materiales azucarados, amiláceos y lignocelulósicos). Se consideran los microorganismos de actual o potencial utilización, pero de real y libre comercialización.

Debido a que un protocolo de selección debe estar fundamentado en consideraciones teóricas y pruebas experimentales, un aspecto de gran importancia en la parte experimental es la cantidad y calidad de recursos disponibles para realizar la valoración de cada uno de los microorganismos. Es por esto que el protocolo es dirigido a dos escenarios posibles:

- Se cuenta con recursos suficientes para realizar experimentación a nivel de laboratorio y nivel piloto. Dentro de los microorganismos a evaluar para la conversión de materias primas azucaradas se tiene levaduras y bacterias.
- Se cuenta con recursos limitados. La parte experimental se realizará a nivel de laboratorio y pretende seleccionar entre levaduras y bacterias para la conversión de materias primas azucaradas.

5.1. CONSIDERACIONES INICIALES

Un esquema de selección de microorganismos debe estar fundamentado en una relación clara entre las condiciones de operación, las características bioquímicas y fisiológicas del microorganismo candidato o microorganismo por evaluar. Estas características bioquímicas generales son establecidas a partir de experimentaciones reportadas en la literatura científica. El planteamiento de un protocolo de selección genérico que abarque diferentes tipos de microorganismo (i.e., levaduras, bacterias, hongos, etc.) y diferentes tipos de materias primas (i.e., azucarados, amiláceos y lignocelulósicos) requiere de una experimentación muy amplia, que lo haría prácticamente imposible de plantear. Es por esta razón que las siguientes consideraciones son realizadas:

1. El tipo de microorganismos a considerar se limita a un grupo de levaduras y bacterias, las cuales gracias a su potencialidad comprobada teórica o experimentalmente (a nivel laboratorio, piloto o industrial) son o pueden ser implementados a nivel industrial para la producción de bioetanol.
2. El amplio número de modificaciones genéticas realizadas a microorganismos y reportadas bibliográficamente, aumenta el ramillete de posibilidades a considerar. A pesar del gran potencial de la modificación genética, su aplicación a nivel industrial se ve restringida por la difícil adquisición y por la inestabilidad metabólica de los microorganismos [46]. Por lo tanto, los criterios de selección a plantear están fundamentados en las propiedades de microorganismos silvestres o comerciales, disponibles masivamente en bancos de cultivo o en otras fuentes.
3. El protocolo de selección presenta 2 enfoques generales, cada uno enriquecido por distintas fuentes de información. El primer enfoque, se fundamenta en criterios teóricos y es aplicado para la selección de levaduras o bacterias al emplear sustratos azucarados, amiláceos o lignocelulósicos. Por su parte el segundo enfoque, se fundamenta tanto en información teórica como en los resultados obtenidos en el Capítulo 4, y es de utilidad para la selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cuando el sustrato a utilizar es melaza de caña.

En términos generales, los criterios (experimentales y teóricos) se fundamentan en el tipo de respuesta que presenta un microorganismo ante determinada condición de estrés, o a requerimientos de importancia que están relacionados con la economía general del proceso fermentativo considerado. En el enfoque experimental cada condición o factor esta

jerarquizado y se convierte en un criterio de evaluación y selección claro. La Tabla 33 presenta los criterios generales dentro del protocolo a considerar.

Tabla 33: Criterios principales para la selección de microorganismos de acuerdo con la materia prima

Tipo de microorganismo	Tipo de sustrato	Criterios de selección
Bacterias y levaduras	Amiláceos	Sustratos asimilables
		Temperatura de operación pH de operación Tolerancia al etanol Modo de operación (por lotes, por lotes alimentados o continuo)
	Lignocelulósicos	Sustratos asimilables Tolerancia a compuestos tóxicos Temperatura de operación Tolerancia al etanol Temperatura de operación pH de operación
	Azucarados	Concentración de sustrato Tolerancia al etanol Temperatura de operación

5.2. CRITERIOS PRINCIPALES PARA LA SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

La información teórica sobre las características de levaduras y bacterias así como la información referente a las condiciones de operación y materias primas, permiten realizar el siguiente análisis, de acuerdo con cada grupo de sustratos planteados en la Tabla 33.

5.2.1. MATERIAS PRIMAS RICAS EN ALMIDÓN

La producción de etanol a partir de materiales amiláceos requiere de unas etapas previas a la fermentación, con el fin de proporcionar una concentración elevada de glucosa en el jarabe de fermentación. Estas etapas comprenden hidrólisis (principalmente vía enzimática) que a diferentes condiciones de temperatura rompen las moléculas de almidón en dextrinas y principalmente glucosa [11]. Actualmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo utilizado en este proceso, pero dado que el sustrato principal de fermentación es la glucosa, otros posibles microorganismos pueden ser evaluados, como es el caso de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

Los principales requerimientos que deben ser satisfechos por microorganismos diferentes a *S. cerevisiae* que le permitan ser empleado a nivel industrial son los siguientes:

- La posibilidad de asimilar dextrinas como maltosa y maltotriosa. En este caso, la *Z. mobilis*, al no metabolizar estos sustratos, no sería competitiva para su implementación, a comparación de la *S. cerevisiae* la cual asimila directamente estos compuestos y los hidroliza en el citoplasma. Pero la presencia de sacarosa y glucosa reprime el consumo de otros azúcares [70] lo que no permite aprovechar esta

potencial asimilación de dextrinas, debido a que este efecto de represión puede retardar drásticamente los tiempos de fermentación. Esta posibilidad permitiría disminuir requerimientos en la hidrólisis del almidón.

- Procesos híbridos son muy atractivos para generar grandes ahorros a nivel energético. La diferencia entre las temperaturas de sacarificación (65°C, óptima de la glucoamilasa) y de fermentación (30 – 32°C, adecuada para la levadura) implica requerimientos de enfriamiento. Por lo tanto, procesos de sacarificación y fermentación simultáneas del almidón pueden requerir del uso de microorganismos que toleren temperaturas cercanas a los 50°C sin perder su actividad fermentativa [12,29,71].
- Los procesos continuos de producción de etanol, están fuertemente sujetos a riesgo de contaminación especialmente en la etapa de sacarificación [11]. Por esta razón es necesario emplear microorganismos adaptados a pH cercanos a 3.5, condiciones bajo las cuales la levadura *S. cerevisiae* presenta una mejor adaptación que la *Z. mobilis*.

5.2.2. MATERIAS PRIMAS LIGNOCELULÓSICAS

Debido a que la producción actual de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos a nivel industrial no es una práctica totalmente viable [46], los criterios de selección se fundamentan en reportes científicos en los cuales se hace uso de microorganismos genéticamente modificados. Por esta razón una estructura de selección no está claramente discriminada como en el caso de la fermentación de materiales azucarados y amiláceos.

En la producción de bioetanol empleando sustratos lignocelulósicos, es fundamental caracterizar la materia prima con el fin de establecer parámetros de pretratamiento y determinar los compuestos y su composición durante la etapa de fermentación. Es relevante considerar que a diferencia del pretratamiento realizado a materiales azucarados o amiláceos, en los cuales no se generan compuestos tóxicos o su concentración no alcanza niveles inhibitorios, en las etapas de pretratamiento de materiales lignocelulósicos son abundantes los compuestos tóxicos generados [11].

Como primer criterio, debe considerarse la cantidad de sustratos potencialmente asimilables que se liberan a partir de los compuestos celulosa, hemicelulosa y lignina. Algunos de estos compuestos son glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, xilosa y arabinosa, pero microorganismos silvestres que fermenten hexosas y pentosas con igual eficiencia no han sido encontrados en la naturaleza [72]. Por esta razón, sin alguna modificación genética, la selección de microorganismo debe fundamentarse en el sustrato más representativo encontrado en el medio de fermentación. En este sentido, debe considerarse sistemas duales, en los cuales en una primera etapa un microorganismo (resistente a inhibidores tóxicos) fermenta la glucosa dejando las pentosas y otras hexosas para una etapa posterior en la cual otro microorganismo asimile las pentosas. Para la primera etapa la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *Z. mobilis* surgen como alternativas, especialmente debido a la escasa concentración de otras hexosas, cuyo consumo sea reprimido por la asimilación de glucosa por parte de esta levadura. En la etapa de conversión de xilosas muy pocos microorganismos silvestres pueden ser empleados, ya que la mayoría de levaduras que metabolizan xilosa no producen etanol, aunque algunas clases de levadura producen cantidades económicamente viables de etanol. Los organismos mejor estudiados son *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis*, siendo la *C. shehatae* la de mayores perspectivas gracias a su rápido crecimiento en xilosa bajo condiciones aeróbicas, fermenta xilosa bajo condiciones anaeróbicas, a su baja producción de xilitol y a su relativamente alta tolerancia al etanol [72].

La selección de levaduras sobre bacterias se fundamenta en los menores requerimientos de mantenimiento, la mayor estabilidad genética y los gastos de adquisición, así como las posibilidades de disposición de la biomasa generada en la fermentación. Mientras que la biomasa de levadura es de fácil implementación como alimento animal, la biomasa de bacterias presenta una menor aceptación [27].

Es por esto que los microorganismos más apropiados para la utilización de hidrolizados de materiales lignocelulósicos son la *C. shehatae* y la *P. stipitis* debido a su asimilación de pentosas, a los rendimientos de etanol reportados y a que los costos de mantenimiento y adquisición son inferiores a los de bacterias.

5.2.3. MATERIAS PRIMAS AZUCARADAS

La escogencia entre levadura y bacteria parte de la evaluación de las propiedades de los microorganismos mas implementados en este tipo de materias primas, y ya discutidas parcialmente en el Capítulo 1: *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.

La producción de etanol a nivel industrial partiendo de este tipo de materias primas, es llevada a cabo casi en su totalidad con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la implementación de *Zymomonas mobilis* está solo fundamentada en la potencialidad bioquímica y en reportes experimentales a nivel de laboratorio. Pero existen particularidades que deben ser consideradas en el caso de la bacteria:

- La presencia de sacarosa afecta el rendimiento a etanol, dado que este disacárido es utilizado por la enzima lévano sacarasa como iniciador en la formación del polisacárido lévano, compuesto por unidades de fructosa. El sorbitol es otro de los principales subproductos el cual, además de disminuir los rendimientos a etanol, genera problemas de aumento de la viscosidad medio, ensuciamiento de tuberías y equipos [14].
- El nivel de producción de ácidos orgánicos como subproducto de la fermentación es bajo, en comparación con el metabolismo de la levadura. Esto genera que los niveles de pH alcancen valores cercanos a 4.5 unidades, haciendo susceptible el medio de fermentación a contaminación microbiana. Por lo tanto, es necesario esterilizar el medio y los equipos utilizados en la fermentación con el fin de garantizar el comportamiento de la bacteria, lo que a nivel industrial se traduce en elevados costos.
- El manejo del microorganismo, dada su baja tasa de producción de biomasa, hace necesario extensas rutinas de crecimiento con el fin de proveer niveles celulares adecuados para el inicio de la fermentación a gran escala.

Por su parte la levadura *S. cerevisiae*, no presenta las desventajas mencionadas anteriormente, las cuales son las causantes de las restricciones para el uso industrial de *Z. mobilis*. Estas razones, además de la diferencia en la disponibilidad comercial de ambos microorganismos, dirige el proceso de selección hacia la levadura *S. cerevisiae*, para la utilización de sustratos azucarados bajo condiciones de operación tradicionales (30 – 33°C de temperatura de fermentación, 12 – 18° Bx de concentración de sustrato y sin presencia de oxígeno).

Con respecto a los criterios de selección de diferentes cepas de levaduras al utilizar melazas de caña como fuentes de carbono para la fermentación, los resultados obtenidos en el diseño experimental del Capítulo 4 permitieron establecer que el factor principal que afecta la productividad de bioetanol es la concentración de azúcares, dado que el incremento en esta

variable genera aumentos considerables en la concentración de producto obtenida. A su vez, y en segundo lugar, la temperatura genera un detrimento en la producción por lo que temperaturas cercanas a 30°C son más favorables para la generación de biomasa de ambas cepas evaluadas. Esta elevada tasa de crecimiento debe ser considerada, debido a que la excesiva generación de lodos se traduce en problemas operacionales a escala industrial.

5.3. ESQUEMA GENERAL DE PROTOCOLO DE SELECCIÓN

Para el caso de producción vía fermentativa de etanol se propone el siguiente protocolo teórico para la evaluación y selección, de acuerdo con la disponibilidad de recursos. El esquema se presenta en la Figura 31. Este protocolo está fundamentado en las siguientes consideraciones:

Primera sección en la cual se determinan las condiciones de operación del proceso, la materia prima disponible y los microorganismos a evaluar. Deben definirse claramente los límites de las variables de operación del proceso, la caracterización de la materia prima y la identificación de los microorganismos disponibles, esto con el fin de establecer los criterios de análisis en la etapa posterior. El consumo de recursos y tiempo en esta etapa son nulos, dado que esta es información básica para el establecimiento del proceso fermentativo.

La **segunda sección** pretende hacer uso de información teórica para generar un conocimiento sobre las características de cada microorganismo según reportes del proveedor, bibliografía de tipo científico a escala de laboratorio, piloto o industrial así como información acerca de las generalidades metabólicas y fisiológicas de cada tipo. La revisión debe suministrar la siguiente información (total o parcialmente) acerca de cada microorganismo:

- Tipo de sustratos fermentables.
- Condiciones ambientales más adecuadas de crecimiento y fermentación.
- Requerimientos nutricionales para el crecimiento y fermentación.
- Inhibidores metabólicos, niveles de inhibición de crecimiento y de la actividad celular.
- Ruta bioquímica de degradación de sustratos.
- Costo de adquisición y grado de disponibilidad.
- Requerimientos para su conservación y almacenamiento.
- Productividad y eficiencia alcanzada al producto deseado a partir de diferentes materias primas.
- Grado de toxicidad para el ser humano.
- Posibilidades de disposición de biomasa residual.
- Efecto de las variables de operación sobre la viabilidad y productividad.
- Si presenta modificaciones genéticas y bajo que métodos fueron realizadas.

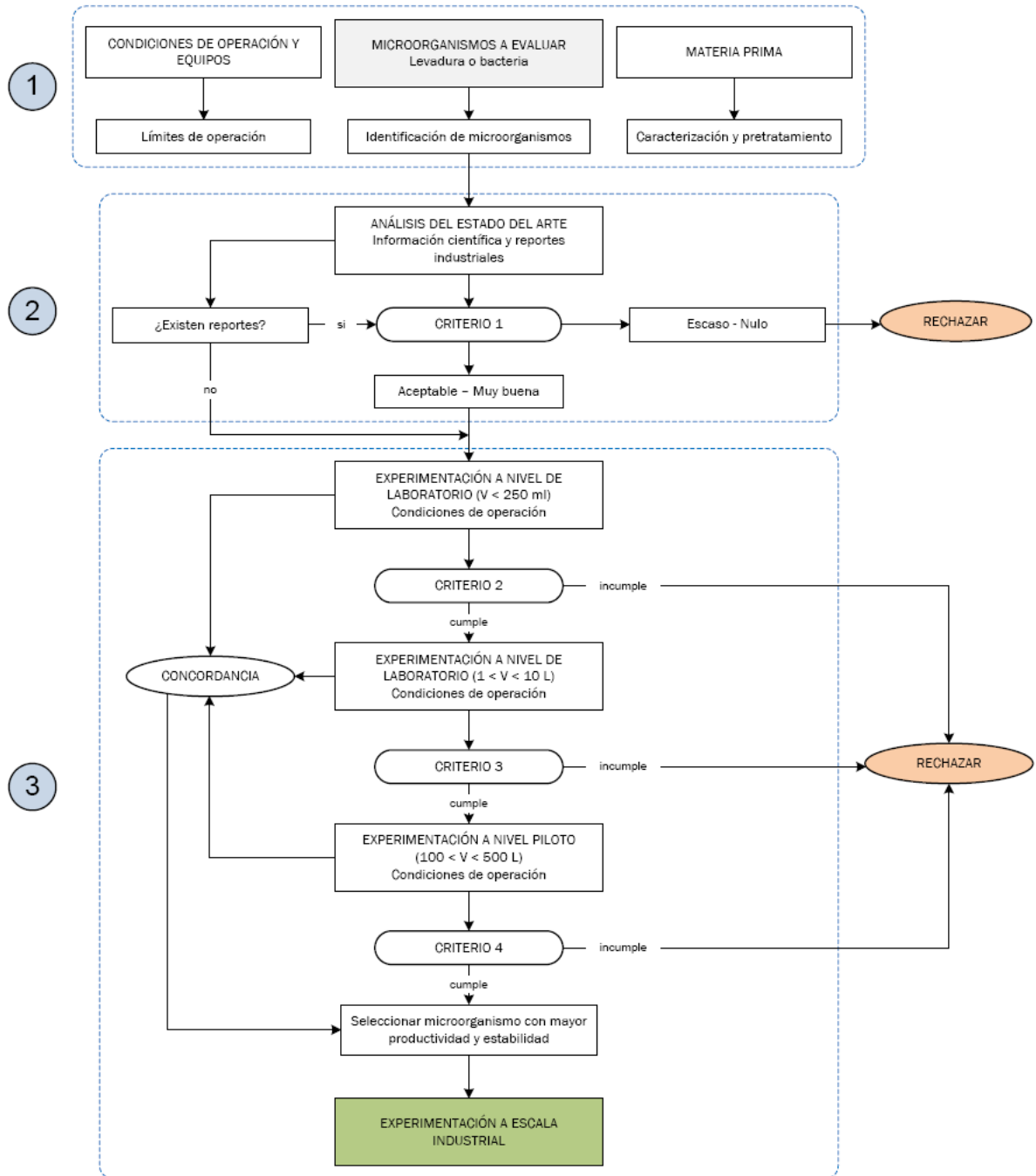


Figura 31: Esquema de protocolo de selección de microorganismos para la producción de etanol

Este conocimiento debe ser relacionado con las condiciones de operación y con las características de la materia prima con el fin de construir el criterio de selección 1, fundamentado principalmente en los aspectos mencionados a lo largo de este capítulo. Una relación nula o escasa entre la hoja de vida de cada microorganismo y las características del proceso, arroja un rechazo del mismo. A su vez la carencia de información bibliográfica y el acoplamiento entre las condiciones del proceso y la actividad del microorganismo obligan a establecer nuevos criterios fundamentados en información experimental.

La experimentación en niveles de laboratorio y piloto hace parte de la **sección 3** de este esquema. Cada nivel de esta sección está dirigido a generar resultados que satisfagan nuevos criterios de selección específicos y su aplicación está influenciada por la disponibilidad de recursos del evaluador. Por ejemplo, experimentación en 3 niveles es posible al contar con todos los recursos (e.g., biorreactores) pero su carencia no hace posible la experimentación a niveles mayores al de laboratorio en el caso extremo. Cuanto menor sea la disponibilidad de criterios y resultados experimentales, mayor debe ser la documentación teórica y mayor la incertidumbre alcanzada en el resultado final de la evaluación y selección.

El criterio 2 presenta restricciones de acuerdo con la productividad alcanzada, además de otras condiciones a cumplir:

- Eficiencia de la producción de etanol con respecto al valor teórico superior al 90% (niveles aceptables de eficiencia para fermentaciones a nivel de laboratorio [63]).
- Rápido crecimiento del microorganismo y corta fase de latencia (i.e., fase de adaptación), menor a 2 horas.
- Rápida propagación del preinóculo: entre 10 y 15 horas para alcanzar niveles que garanticen una concentración inicial de microorganismos 1×10^6 cel/ml en el medio de fermentación.
- Tiempos cortos de fermentación; que entre 10 y 15 horas de fermentación se genere más del 95% de la concentración final de etanol.

Los criterios 3 y 4 además de cumplir con las condiciones mostradas en el criterio 2, debe cumplir con:

- La eficiencia de la producción de etanol a esta escala puede establecerse en 85%.
- Los niveles de etanol alcanzados, los tiempos de fermentación y la composición final del mosto deben ser aspectos reproducibles al menos en 3 lotes continuos de fermentación. Esto refleja la estabilidad del microorganismo, la conservación de viabilidad y la posibilidad de reutilizar biomasa residual en procesos secuenciales.

En esta sección debe existir concordancia entre los resultados obtenidos en cada nivel. Este es un parámetro de importancia ya que permite garantizar en un mayor porcentaje la reproducibilidad de la información obtenida a niveles de fermentación a gran escala. Por esta razón, la determinación de la concordancia entre resultados es el último criterio establecido antes de seleccionar el microorganismo con la mayor productividad y estabilidad, para pasar posteriormente a pruebas a gran escala.

Los microorganismo rechazados en esta etapa pueden ser sometidos a procedimientos de evaluación posteriores, modificando las variables más influyentes sobre su actividad productiva (e.g., para la producción de etanol a partir de melazas se mostró en el Capítulo 4 el efecto de la concentración de sustrato y de la temperatura de fermentación sobre la productividad y viabilidad de la levadura *S. cerevisiae*), pero tales modificaciones deben estar dentro de los límites de operación del proceso.

5.4. CONCLUSIÓN

El protocolo de selección de microorganismos presentado en este Capítulo, hace uso de criterios teóricos y experimentales que puedan servir de guía para la ejecución de campañas de selección o aislamiento de microorganismos (especialmente levaduras) para el desarrollo de procesos fermentativos más eficientes. Es necesario adelantar más diseños de experimentos en los cuales se incluyan otro tipo de microorganismo y otro tipo de materias primas, con el fin de aumentar la aplicabilidad y confiabilidad de este esquema de selección.

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo del programa experimental y de las generalidades teóricas presentadas en este trabajo, permiten concluir que:

La importancia de los procesos fermentativos a nivel económico y ambiental justifican los esfuerzos investigativos para mejorarlos constantemente. Además, la escasez de materias primas y los nuevos requerimientos ambientales hacen necesario para las industrias adelantar constantemente este tipo de procedimientos, implementar nuevas tecnologías, buscar nuevos microorganismos y nuevos criterios de selección para aumentar la productividad de bioetanol.

El análisis experimental del proceso fermentativo para la producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar permite conocer con mayor claridad las características de la cepa LO₁ y de la cepa ATCC 9763. Del correcto planteamiento de un diseño experimental depende la obtención de información de calidad, concluyente y que permita conocer el comportamiento del microorganismo ante determinadas condiciones de operación. Por eso se demostró en este trabajo que el diseño factorial y sus variantes permiten obtener información amplia a costa de limitados experimentos.

Un ejemplo de aislamiento de microorganismos se presentó en este trabajo. La escala bajo la cual se desarrolló (i.e., aislamiento de un microorganismo de un proceso fermentativo a nivel piloto) muestra la posibilidad de desarrollar estrategias a otros niveles como en industrias de mayor tamaño, ambientes naturales etc. Se resalta la importancia de conocer técnicas microbiológicas para el aislamiento, purificación, adaptación y siembra de microorganismos.

Se aisló una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (LO₁) que tiene un buen comportamiento en la fermentación a nivel experimental y piloto de melazas de caña de azúcar para la producción de bioetanol, tanto en condiciones de operación convencionales como no convencionales. Se destacan sus características de nativa, no modificada genéticamente y termotolerante.

Se obtuvo una cepa que alcanzó porcentajes de eficiencia superiores al 90% en fermentaciones a nivel experimental y superiores a 80% en niveles mayores (i.e., 1 L y 300 L). Su productividad es mayor que la demostrada por la cepa comercial etanólica ATCC 9763. Estos valores de eficiencia la pueden catalogar como un buen candidato para su uso en escalas mayores o en posteriores procesos de adaptación y optimización, que puedan mejorar su capacidad fermentativa.

El diseño experimental planteado es una buena herramienta para la evaluación y predicción del comportamiento de un microorganismo, para comparar microorganismos y para seleccionar condiciones de operación que maximicen la productividad del proceso, incluyendo nuevas alternativas de operación.

La variable que genera una mayor influencia sobre la productividad de etanol es la concentración de melaza. Pasar de 12 a 20°Bx genera un aumento en la productividad promedio de 20 a 36 g/L. Seguido se encuentra la temperatura, cuyo efecto sobre la viabilidad celular es marcado. La adaptación de la levadura es mejor a temperatura de 28°C, lo que se traduce en mayores niveles de etanol producidos a esta temperatura en comparación con fermentaciones a 35°C.

Los resultados arrojados por el diseño experimental a nivel laboratorio de 50 ml y 1 L demostraron la limitación de microorganismos comerciales con respecto a microorganismos adaptados y aislados de procesos fermentativos. La mayor productividad alcanzada por la cepa aislada, la mayor viabilidad y crecimiento celular, son un indicativo claro de la necesidad de encontrar microorganismos adaptados, especialmente silvestres, que puedan ser implementados en procesos industriales sin perder viabilidad ni estabilidad.

La cepa LO₁ presentó buena adaptación y productividad en procesos fermentativos realizados a una temperatura de 38°C. Procesos realizados a altas temperaturas de fermentación son de interés debido a la reducción en costos de enfriamiento, costos de materias primas, costos del sistema de separación, etc., como se demostró mediante la simulación y análisis económico del proceso.

El protocolo de selección planteado demuestra la importancia de caracterizar no solo las materias primas y los procesos, sino también las características de los microorganismos por utilizar en un proceso fermentativo. Esta información constituye una base sólida para establecer criterios de análisis que permitan disminuir los costos de los procedimientos de selección.

El protocolo propuesto está fundamentado en criterios de decisión demostrados experimentalmente. Este puede ser utilizado a nivel industrial junto con el modelo de predicción para reducir el tiempo y costo de experimentación con el fin de aumentar la productividad de los procesos fermentativos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El desarrollo de este trabajo permite plantear algunas perspectivas futuras:

El diseño factorial puede incluir mayor número de variables. Esto permite aumentar la exactitud del proceso de selección, seleccionar condiciones de operación óptimas y establecer criterios de selección más exactos.

Otros microorganismos (otras levaduras y bacterias) pueden ser incluidas dentro del diseño experimental, así como otros sustratos de interés como materiales amiláceos y residuos lignocelulósicos.

Explorar nuevas fuentes para el aislamiento de microorganismos tales como procesos industriales, cultivos de caña de azúcar, entre otros.

Implementar diferentes técnicas de adaptación con el fin de obtener microorganismos con capacidad fermentativa a temperaturas mayores de 40°C y concentraciones de sustrato elevadas, debido a su gran aplicabilidad a nivel industrial.

Desarrollar procesos a nivel piloto con la cepa LO₁ bajo condiciones de operación controladas con el fin de cuantificar el real potencial de esta cepa a escalas de fermentación mayores. Incluir condiciones de operación como temperaturas elevadas y alta concentración de sustrato.

La cepa LO₁ demostró ser una cepa de *S. cerevisiae* que presenta potencial para su implementación en procesos fermentativos. La aplicación de programas de mejoramiento a este microorganismo para conocer sus límites de operación y para conferirle diferentes características deseadas es un objetivo de interés por realizar al interior del grupo de investigación.

El protocolo de selección planteado puede ser refinado incluyendo nuevos criterios de selección fundamentados en recientes avances y reportes científicos. Estos nuevos criterios pueden permitir ampliar el tipo de microorganismos por evaluar, materias primas alternativas y otros productos obtenidos vía fermentativa. También debe establecerse nuevos parámetros de cuantificación de compuestos y biomasa, con el fin de hacer más exactos los parámetros de evaluación y garantizar con esto una mayor reproducibilidad de los resultados.

REFERENCIAS

- [1] **Balat M, Balat H, Oz C.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 2008; 34(5): 551-573.
- [2] **Quintero J, Montoya M, Sánchez O, Giraldo O, Cardona C.** Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a colombian case. *Energy* 2008; 33(3): 385-399.
- [3] **Gnecco J.** El precio de la melaza continua creciendo. *Revista Técnicaña* 2005; 9(17): 31-32.
- [4] **Balat M, Balat H.** Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy* 2009; 86(11): 2273-2282.
- [5] **Stanbury P, Hall S, Whitaker A.** Principles of fermentation technology. Elsevier Science, 1995.
- [6] **Madigan M, Martinko J, Parker J.** *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación, 2003.
- [7] **Nielsen J.** Fermentation monitoring, design and optimization. In: *Encyclopedia of bioprocess technology*. Wiley & Sons, 1999.
- [8] **Rao D.** *Introduction to biochemical engineering*. Tata Mc Graw Hill, 2005.
- [9] **Steele D, Stowers M.** Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 1991; 45: 89-106.
- [10] **Berg C.** World fuel ethanol analysis and outlook 2004.
- [11] **Cardona C, Sánchez O.** Producción de alcohol carburante: una alternativa para el desarrollo agroindustrial. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Gobernación de Caldas, Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo, 2007.
- [12] **Sánchez O, Cardona C.** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 2008; 99(13): 5270-5295.
- [13] **Fischer C, Klein-Marcuschamer D, Stephanopoulos G.** Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic Engineering* 2008; 10(6): 295-304.
- [14] **Drapcho C, Nghiem J, Walker T.** *Biofuels engineering process technology*. The McGraw-Hill Companies, 2008.
- [15] **ASOCAÑA.** Informe anual de Asocaña 2009-2010. Análisis coyuntural. 2010.
- [16] **Mancheno J.** Situación de la producción de etanol en Colombia. Conferencia Sucromiles, 2006.
- [17] **Siqueira P, Karp S, Carvalho J, Sturm W, Rodríguez-León J, Tholozan J, Singhanian R, Pandey A, Soccol CR.** Production of bioethanol from soybean molasses by

- Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology* 2008; 99(17): 8156-8163.
- [18] **Ogbonna J, Mashima H, Tanaka H.** Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology* 2001; 76(1): 1-8.
- [19] **Bonilla-Salinas M, Lappe P, Ulloa M, Garcia-Garibay M, Gómez-Ruiz L.** Isolation and identification of killer yeasts from sugarcane molasses. *Letters in Applied Microbiology* 1995; 21(2): 115-116.
- [20] **Wheals A, Basso L, Alves D, Amorim H.** Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* 1999; 17(12): 482-487.
- [21] **Kopsahelis N, Nisiotou A, Kourkoutas Y, Panas P, Nychas G, Kanellaki M.** Molecular characterization and molasses fermentation performance of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature range. *Bioresource Technology* 2009; 100(20): 4854-4862.
- [22] **Bai F, Anderson W, Moo-Young M.** Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* 2008; 26(1): 89-105.
- [23] **Zuzuarregui A, del Olmo M.** Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; 85(4): 271-280.
- [24] **Saithong P, Nakamura T, Shima J.** Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009; 108(3): 216-219.
- [25] **Panesar P, Marwaha S, Kennedy J.** Comparison of ethanol and temperature tolerance of *Zymomonas mobilis* strain in glucose and molasses medium. *Indian Journal of Biotechnology* 2007; 6: 74-77.
- [26] **Sprenger G.** Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters* 1996; 145(3): 301-330.
- [27] **Lin Y, Tanaka S.** Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 69(6): 627-642.
- [28] **Barredo J.** Microbial processes and products. Humana Press, 2005.
- [29] **Banat I, Nigam P, Singh D, Marchant R, Mchale A.** Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part I - yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1998; 14(1971): 809-821.
- [30] **Martin C, Galbe M, Fredrik C, Hahn-Hägerdal B, Jönsson L.** Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; 31(3): 274-282.
- [31] **Helle S, Cameron D, Lam J, White B, Duff S.** Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 33(6): 786-792.
- [32] **Chandraraj K, Gunasekaran P.** Bacterial alcoholic fermentation. In: Pandey A, editor. Concise encyclopedia of bioresource technology. Lóndres: The Haworth Reference Press, 2004. p. 327-334.

- [33] **Rao L, Sridhar M.** Thermotolerant and osmotolerant yeasts for alcoholic fermentation. In: Concise encyclopedia of bioresource technology. New York: Food Products Press, 2004. p. 394-402.
- [34] **Fernández T, Marcet M, Olivera W, Martín C, Scarsdale J, Reynolds K.** Isolation and evaluation of thermotolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for aguardiente and rum production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(7): 2065-2071.
- [35] **Araque E, Parra C, Rodríguez M, Freer J, Baeza J.** Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 2008; 43(2): 120-123.
- [36] **Cazetta M, Celligoi M, Buzato J, Scarmino I.** Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology* 2007; 98(15): 2824-2828.
- [37] **Morimura S, Ling Y, Kida K.** Ethanol production temperature in concentration flocculating by repeated-batch fermentation at high a molasses medium containing a high of total sugar by a thermotolerant yeast with improved salt-tolerance. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1997; 83(3): 271-274.
- [38] **Kaseno T.** The effect of molasses pretreatment by ceramic microfiltration membrane on ethanol fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1997; 83(6): 577-582.
- [39] **Roukas T.** Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Journal of Food Engineering* 1996; 27(1): 87-96.
- [40] **Takeshige K, Ouchi K.** Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1995; 79(5): 449-452.
- [41] **Severin F, Meer M, Smirnova E, Knorre D, Skulachev V.** Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2008; 1783(7): 1350-1353.
- [42] **Muraji M, Taniguchi H, Tatebe W, Berg H.** Examination of the relationship between parameters to determine electropermeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1999; 48(2): 485-488.
- [43] **Quintas C, Leyva J, Sotoca R, Loureiro-Dias M, Peinado J.** A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 100(1-3): 125-130.
- [44] **de Oliva Neto P, Amorim Ferreira M, Yokoya F.** Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology* 2004; 92(1): 1-6.
- [45] **Jianlong W, Zeyu M, Xuan Z.** Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stress. *Process Biochemistry* 2004; 39(10): 1231-1235.
- [46] **Higuita J, Cardona C, Mariscal J, Naranjo J, Triana C.** Estandarización y selección de microorganismos de interés para la producción de bioetanol. In: Cardona C, Orrego C, editors. Avances investigativos en la producción de biocombustibles. Manizales: Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Gobernación de Caldas, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 2009. p. 147-169.
- [47] **Satyanarayana T, Kunze G.** Yeast biotechnology: diversity and applications. Springer, 2009.

- [48] **Zhao X, Bai F.** Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 2009; 144(1): 23-30.
- [49] **Regodón J, Perez F, Valdes M, de Miguel C, Ramirez M.** A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology* 1997; (14): 247-254.
- [50] **Romano P, Fleet G, Boekhout T.** Alcoholic fermentation: beverages to biofuel. *FEMS Yeast Research* 2008; 8(7): 965-966.
- [51] **Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J.** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 2000; 64(1): 34-50.
- [52] **Ergun M.** Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 2000; 73(3): 251-255.
- [53] **Ferré J.** El diseño factorial completo 2^k. *Revista Técnicas de Laboratorio* 2004; (292): 430-434.
- [54] **Hamsaveni D, Prapulla S, Divakar S.** Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry* 2001; 36: 1103- 1109.
- [55] **Myers R, Montgomery D.** Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley and Sons, 2002.
- [56] **Grado S, Chandra M.** A factorial design analysis of a biomass to ethanol production system. *Biomass and Bioenergy* 1998; 15(2): 115-124.
- [57] **Costa A, Atala D, Maugeri F, Maciel R.** Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. *Process Biochemistry* 2001; 37(2): 125-137.
- [58] **Kim J, Oh B, Shin H, Eom C, Kim S.** Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochemistry* 2008; 43(11): 1308-1312.
- [59] **Balusu R, Paduru R, Kuravi S, Seenayya G, Reddy G.** Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* ss19. *Process Biochemistry* 2005; 40(9): 3025-3030.
- [60] **Basso L, de Amorim H, de Oliveira A, Lopes M.** Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research* 2008; 8(7): 1155-63.
- [61] **Betancourt R.** Guías para laboratorio de operaciones unitarias III. Difusividad - fabricación de alcohol. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, 2001.
- [62] **Miller G.** Use of dinitrosalicic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; (31): 426-428.
- [63] **Vásquez H, Dacosta O.** Fermentación alcohólica : una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería. Investigación y Tecnología* 2007; VIII(4): 249-259.
- [64] **de Andrade R, Rivera E, Costa A, Atala D, Maugeri Filho F, Maciel Filho R.** Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2007; 137-140(1-12): 753-763.
- [65] **Cardona C, Sánchez O.** Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 2007; 98(12): 2415-2457.

- [66] **Triana C, Quintero J, Agudelo R, Cardona C, Higuera J.** Analysis of coffee cut-stems (CCS) as raw material for fuel ethanol production. *Energy* 2011; 36(7): 4182-4190.
- [67] **Wooley R, Putsche V.** Development of an aspen plus physical property database for biofuels components. 1996.
- [68] **Wilkie A, Riedesel K, Owens J.** Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy* 2000; 19(2): 63-102.
- [69] **Devantier R, Scheithauer B, Villas-Bôas S, Pedersen S, Olsson L.** Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 90(6): 703-714.
- [70] **Verstrepen K, Iserentant D, Malcorps P, Derdelinckx G, Van Dijck P, Winderickx J, Pretorius I, Thevelein J, Delvaux F.** Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in Biotechnology* 2004; 22(10): 531-537.
- [71] **Singh D, Banat I, Nigam P, Marchant R.** Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus imb3* in an indian distillery. *Biotechnology* 1998; 20(8): 753-755.
- [72] **Ghosh P, Ghose T.** Bioethanol in india: recent past and emerging future. In: Ghosh P, Ghose T, editors. *Biotechnology in India*. Springer, 2003. p. 1-27.