



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DE ETANOL
A PARTIR DE MELAZA Y REUSO DE LA VINAZA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N :

**CAYETANO RODRIGUEZ ARREOLA
JOSE DE JESUS GARCIA OLIVARES**

DIRECTOR DE TESIS: VICENTE LOPEZ MERCADO

1986

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
INTRODUCCION	
ASPECTOS ECONOMICOS EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL	5
LA PRODUCCION DE ALCOHOL	11
ASPECTOS TECNOLOGICOS	17
PROCESOS DE FERMENTACION ALCOHOLICA	21
ASPECTOS SOCIALES	26
OBJETIVO	36
MATERIALES Y METODOS	
MEDIO DE CULTIVO.....	37
1.- CLARIFICACION DE LA MELAZA	37
2.- DETERMINACION DE AZUCARES	37
3.- DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO	38
MICROORGANISMO UTILIZADO	41
1.- CONSERVACION	41
2.- PROPAGACION	42
3.- CONTEO CELULAR	43

EXPERIMENTOS DE RESPIRACION	45
1.- FUNDAMENTOS	45
2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCAR Y ETANOL EN LA RESPIRACION	53
FERMENTACIONES REALIZADAS	57
1.- TEORIA	57
2.- DETERMINACION DE ETANOL	68
3.- EXPERIMENTOS EN MATRACES	70
4.- DETERMINACION DEL COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFE- RENCIA DE OXIGENO	72
5.- MONTAJE Y OPERACION DE LAS FERMENTACIONES	75
6.- EFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTA- CION ALCOHOLICA	79
7.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE VINAZA EN LA FER- MENTACION ALCOHOLICA	80

RESULTADOS

EXPERIMENTOS DE RESPIRACION, EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES Y ETANOL EN LA RESPIRACION	84
EXPERIMENTOS EN MATRACES, EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES EN LA FERMENTACION	87
DETERMINACION DEL K_{LA}	94
EFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION AL- COHOLICA.....	101
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE VINAZA EN LA FERMENTA- CION ALCOHOLICA	106

DISCUSION Y CONCLUSIONES

EXPERIMENTOS DE RESPIRACION	113
EXPERIMENTOS EN MATRACES	114
DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXI- NO.....	115
EFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION AL- COHOLICA	115
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE VINAZA EN LA FERMENTA--- CION ALCOHOLICA	118
CONCLUSIONES	120
BIBLIOGRAFIA	123

RESUMEN

La producción de azúcar y caña de azúcar es uno de los factores más importantes de la economía agrícola de México. La industria azucarera combina las características y problemas de las actividades agrícolas e industriales, además de que enfrenta dificultades para sostener una economía equilibrada, tomando en cuenta la elevada inversión de capital fijo que se requiere para transformar a la caña de azúcar en productos comerciales.

De la producción de azúcar se obtienen subproductos de potencial valor económico entre los cuales destaca la melaza. Esta es la principal fuente de azúcares en industrias de fermentaciones y es ampliamente utilizada por la industria alcoholera, la cual se caracteriza por una baja eficiencia en los procesos de obtención de alcohol etílico, además de que es productora de grandes cantidades de vinaza, residuo de elevado poder contaminante de los cuerpos receptores.

Con la finalidad de mejorar la economía de la industria azucarera, disminuir el daño ecológico provocado por los desechos de las destilerías de alcohol y presentar alternativas en el uso del alcohol producido por fermentación de la melaza de caña, se optimizó la producción de alcohol etílico en cultivo por lote en base a estudios de respiración, concentración de sales, concentración de sustrato y niveles de oxigenación utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Complementariamente se evaluó el efecto del uso de la vin

za como sustituyente del agua de dilución del medio de cultivo.

En las fermentaciones sin vinaza se alcanzaron valores de productividad de alcohol de 2.533 g/lh con rendimientos de 0.420 g/g que comparativamente a los valores de 2.200 g/lh reportados por Nojima (23) para cultivo por lote, son sensiblemente mayores. Los valores de rendimiento de 0.430 g/g reportados por K. Bose (5) son muy similares a los obtenidos en este trabajo.

Los resultados de los experimentos con vinaza en cuanto a productividad y rendimiento de alcohol fueron ligeramente menores, lo que abre la posibilidad de reciclar la vinaza en 100% y hasta tres veces sin necesidad de adicionar sales al medio de cultivo y sin que se presente un efecto inhibitorio significativo sobre la cantidad de alcohol obtenido, lo que permitiría reducir la contaminación producida por la vinaza.

ANTECEDENTES

La situación social y económica que atraviesa el mundo actual y particularmente los países subdesarrollados exige un aprovechamiento integral de sus recursos tanto renovables como no renovables, muchos de los cuales han sido considerados por muchos años como productos de desecho.

El crecimiento gradual y acelerado manifestado por la industria durante el presente siglo, genera grandes volúmenes de productos de desecho que son vertidos indiscriminadamente hacia el medio ambiente, con el grave desequilibrio ecológico que esto implica. Una parte importante de estos comúnmente llamados residuos agroindustriales son potenciales factores de producción, principalmente desde el punto de vista energético y es en este aspecto donde la Biotecnología ha cobrado importancia desarrollando procesos dirigidos a la utilización de estos desechos, con los beneficios ecológicos y económicos que ello reporta.

Dentro de las actividades agroindustriales de mayor importancia en México, se destaca la industria azucarera ya que el cultivo de la caña de azúcar es el segundo en importancia después del maíz y en forma de azúcar representa la principal fuente de energía en la dieta del mexicano. El cultivo es típico de regiones subdesarrolladas y aunque es cultivo de temporal, la diversificación y avance en técnicas de cultivo han dado lugar a que la producción se extienda a cerca de ocho meses

por año (2).

Un subproducto de gran valor, resultante de la obtención del azúcar, es la melaza de caña, que por su alto contenido en azúcares solubles significa la principal fuente de nutrientes en diversos procesos de fermentación, uno de los cuales es empleado para la producción de alcohol etílico.

Durante muchos años la producción de azúcar ha sido un factor esencial en la economía mexicana y ya que las melazas son un producto secundario en la obtención de aquella, existe una estrecha dependencia de la producción de melazas en relación a los volúmenes de producción del azúcar y por lo tanto de los estímulos en los precios de los mercados internacionales de este producto (25). Es por ello que la producción de alcohol está ubicada en el contexto de una estructura compleja donde las perspectivas distan de ser óptimas en muchos sentidos, dado que la industria azucarera reúne las características y problemática de las actividades agrícolas e industriales propias de un país en vías de desarrollo.

Lo anterior nos conduce a un análisis de la situación actual de esta industria y de otros factores que inciden en la producción de alcohol.

INTRODUCCION

ASPECTOS ECONOMICOS EN LA PRODUCCION DE ALCOHOL.

Los procesos de fabricación del azúcar implican la generación de cantidades variables de residuos y subproductos que en peso, son mayores que el producto fabricado. Algunos de estos son potenciales insumos o factores de producción para otros procesos productivos.

La melaza de caña constituye un subproducto de gran importancia ya que es rica en carbohidratos solubles además de otros nutrientes, lo que representa una ventaja con respecto a los residuos celulósicos que en su mayoría son insolubles y no han logrado superar impedimentos de tipo económico y tecnológico.

Esta característica proporciona a la melaza un potencial energético de gran valor en diversos procesos fermentativos.

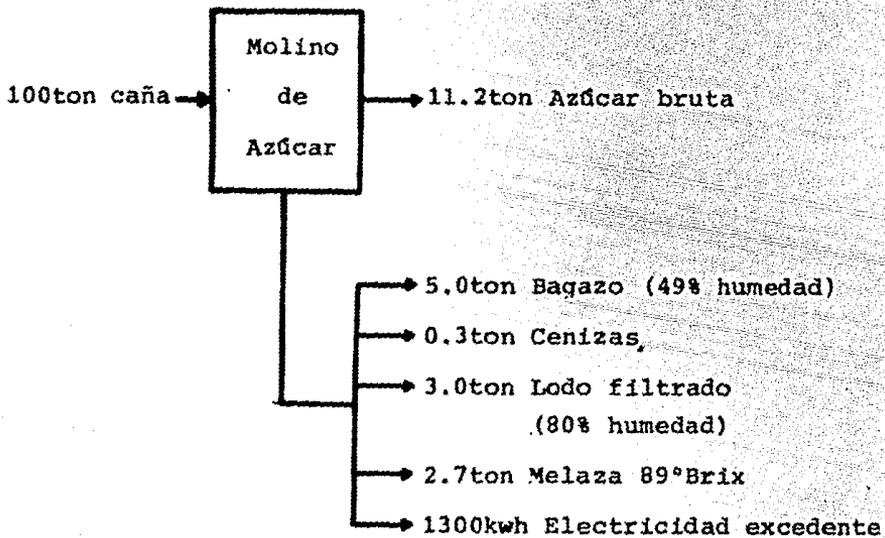
Un balance global para los procesos que sufre la caña de azúcar que nos muestra las relaciones cuantitativas que existen entre la caña de azúcar, producto y subproductos es mostrado en la figura 1.

La producción de melaza en relación a la de azúcar es de un 25 a 30% aunque se observan variaciones significativas que dependen esencialmente de la variedad de caña utilizada y de la eficiencia con que opera el ingenio (2 y 25).

Durante los ciclos agrícolas que comprenden el lapso de

FIGURA 1

BALANCE APROXIMADO PARA UNA OPERACION DE MOLINO DE AZUCAR



Considerando:

- 13% sacarosa en la caña
- 13% fibra en la caña
- 95% extracción con molino
- 85% recuperación total
- 84% pureza del jugo mezclado
- 500 kg consumo de vapor/ton caña
- 2.3 ton de vapor generado/ton bagazo húmedo

1979 a 1984, la producción de melazas de caña no ha sufrido modificaciones considerables, en tanto su consumo interno se ha incrementado notablemente como se aprecia en la figura 2.

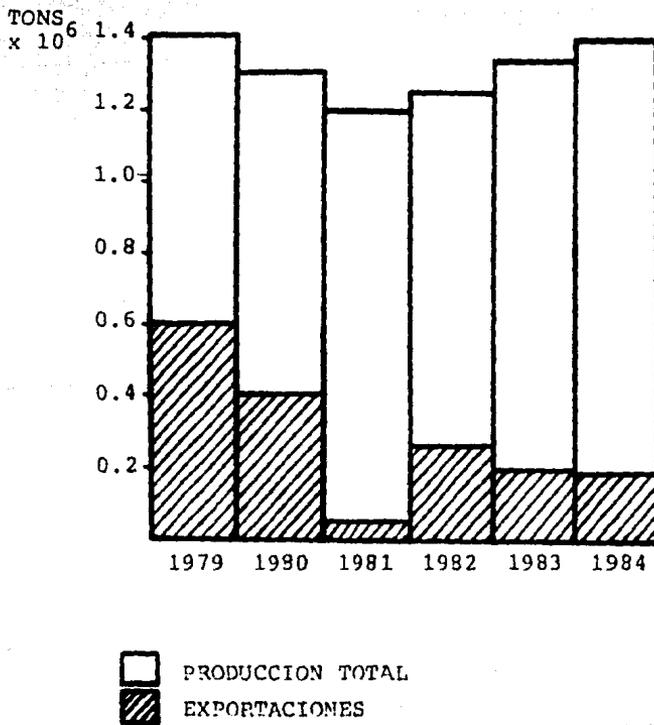
México en su calidad de productor y exportador importante de melazas ha dirigido su política económica en este renglón - al fomento del uso interno, principalmente en el sector ganadero. Este apoyo consiste en la entrega de melazas para alimentación de ganado a precios comparativamente menores a los que rigen el mercado internacional, que son aproximadamente 21 dólares (US) más 6% de impuestos contra US \$ 87.00 por tonelada, - que es el promedio para miel no cristalizable 85°Brix entregada en los puertos de Nueva Orleans/Houston (Precios Enero de - 1984). En cuanto a las melazas destinadas al sector industrial para 1984, tienen precios de \$ 11 000.00 más 15% de impuesto, que se acerca al promedio de precios internacionales.

El gobierno considera que de esta manera se aprovecharían grandes cantidades de esquilmos agrícolas (alrededor de 20 millones de toneladas) que actualmente se pudren en los campos, los cuales, adicionados adecuadamente con melazas, se convertirían en excelente fuente de energía para la alimentación animal. Esto constituiría un logro importante ante el marcado déficit en el consumo de proteína de origen animal que afecta a México.

Tal iniciativa se originó a mediados de la década de los setentas, cuando los gobiernos de diversos países exportadores determinaron limitar la exportación de mieles finales estimulando el consumo interno. Esta decisión se tomó con dos objeti

F I G U R A 2

PRODUCCION TOTAL DE MELAZAS DE CAÑA DE 1979 A 1984



Azúcar, S.A. 1985.

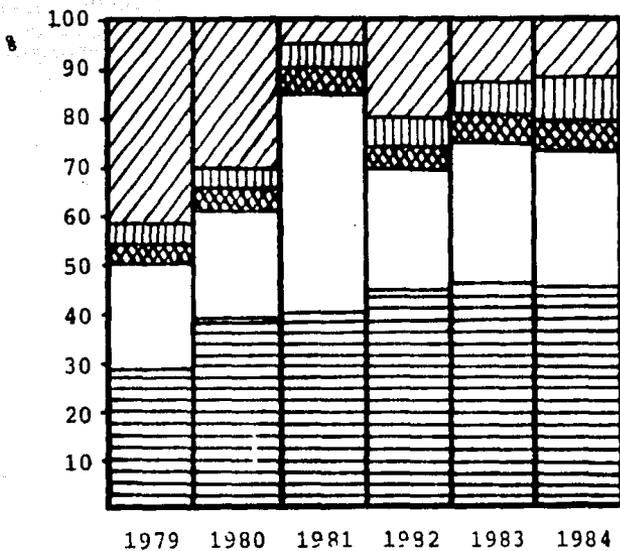
vos principales: Primero, la introducción de un programa para aumentar la actividad ganadera y segundo, impulsar la producción de alcohol por fermentación (26). Esta tendencia puede observarse en forma cuantitativa en las figuras 2 y 3.

Estas medidas sin embargo, deberán ser reguladas continuamente para alcanzar puntos de equilibrio que arrojen resultados positivos en la economía nacional. En el sector ganadero estadounidense el valor nutritivo de las melazas está fuera de discusión y solamente cuestiona sus costos por concepto de melazas en relación al uso de maíz No. 2 (Estándar de comparación) puesto que los precios alcanzan US \$ 107.00 muy desventajosos en relación al precio pagado por los ganaderos mexicanos (alrededor de US \$ 22.30). Por otro lado, la complejidad de los diversos factores que afectan el mercado de las melazas ocasionan grandes fluctuaciones que condicionan la redituabilidad del producto y aumentan los riesgos mercantiles a pesar de que en los últimos años se ha registrado una demanda y oferta relativamente balanceada.

Para el caso de México la alternativa redituable en épocas de bajos precios se presenta en el mayor uso interno, que favorece inicialmente a la producción ganadera y a la industria de fermentaciones, que incrementan en gran medida el valor agregado de la producción dado los bajos costos por concepto de nutrientes. Por otra parte, en épocas de precios altos, la mayor participación de México en la exportación de melazas implicaría un efecto favorable en la balanza comercial.

FIGURA 3

CONSUMO RELATIVO DE MELAZAS POR SECTORES DE 1979 A 1984



- | | | | |
|---|-----------------------|---|-------------------|
|  | AGROPECUARIA |  | INDUSTRIAS VARIAS |
|  | PRODUCCION DE ALCOHOL |  | EXPORTACION |
|  | BEBIDAS ALCOHOLICAS | | |

Azúcar, S.A. 1985.

LA PRODUCCION DE ALCOHOL.

La producción de alcohol fué desarrollada comercialmente a gran escala después de 1906 y por muchos años ha sido producido por fermentación principalmente. Alrededor de 1968 la síntesis industrial a partir de etileno (producto de los gases de desecho en la refinación de petróleo) ha desplazado en gran parte la producción por fermentación, aunque en muchos países subdesarrollados la disponibilidad de grandes volúmenes de sustratos, así como la diversificación de estos, ha permitido que la fermentación para obtener etanol mantenga su sitio en el mercado (6).

Además de esto, factores de orden económico y social surgidos en años recientes en el campo de los energéticos, han influido determinadamente en el progreso de la tecnología de fermentaciones para producir alcohol.

Entre los factores a nivel internacional sobresalen los siguientes:

1.- El aumento drástico en los precios internacionales del petróleo ocurrido a fines de los setentas y el comportamiento incierto de los mismos durante los últimos años.

2.- La caída de los precios internacionales del azúcar.

3.- Una creciente y lesiva dependencia comercial en materia de importación de energéticos sufrida por algunos países.

4.- La necesidad de utilizar volúmenes cada vez más grandes de desechos, principalmente agroindustriales debido a sus potenciales efectos contaminantes.

5.- Resultados alentadores sobre la rentabilidad, tecnología y comercialización de la producción de etanol a partir de fuentes renovables.

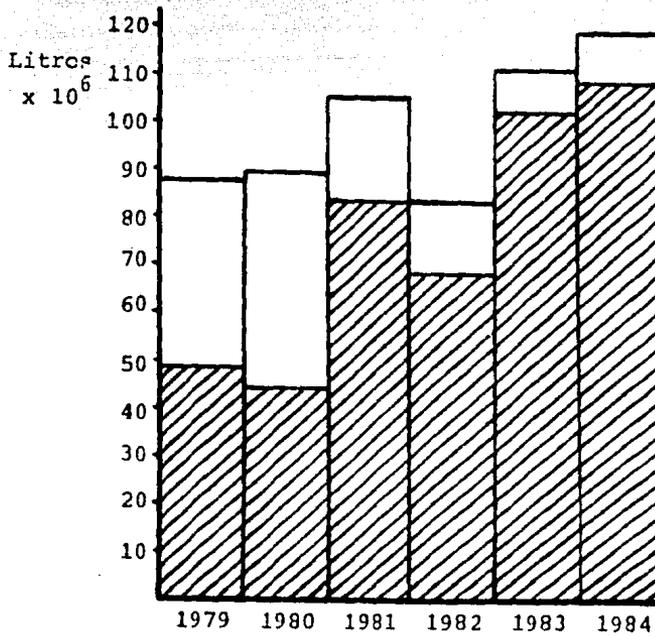
En los últimos años de la década de los setentas, el impacto provocado por el incremento drástico de los precios del petróleo sobre la economía internacional, obligó a los gobiernos de muchos países a una intensa búsqueda de fuentes alternativas de energía a bajo costo. Como resultado de esto, la producción de alcohol por fermentación ha recibido decidido impulso; distintos procesos industriales y aplicaciones comerciales han sido investigados y muchos de ellos puestos en marcha con resultados favorables en distinto grado.

Por lo que respecta a la producción de alcohol en México, el panorama es de un gran atraso y las perspectivas tecnológicas son prácticamente nulas ya que actualmente no existen actividades importantes de investigación en fermentación alcohólica con fines energéticos. Los métodos utilizados son los mismos de principio de siglo y su producción se ajusta solamente al consumo interno, donde la demanda para 1984 fué satisfecha.

En la figura 4 se aprecia un moderado incremento en la producción de alcohol en general, en cambio el tipo de alcohol etílico producido ha sufrido importantes variaciones; la producción de alcohol potable ha aumentado en tal forma que casi ha desplazado la producción de alcohol industrial (desnaturalizado). Aunque no se poseen estadísticas confiables, se conoce que gran parte del alcohol potable se utiliza para consumo humano; esto se refuerza por el hecho de que solamente por con-

F I G U R A 4

PRODUCCION TOTAL DE ALCOHOL ETILICO A PARTIR DE MELAZA
DE CANA



□ ALCOHOL DESNATURALIZADO

▨ ALCOHOL POTABLE

cepto de alcohol potable, los fabricantes de bebidas alcohólicas han duplicado el consumo de este alcohol en dos años: de 1982 a 1984, su consumo pasó de 12 millones de litros a más de 23 millones de litros.

Lo anterior nos proporciona una visión general de la situación que prevalece en la industria alcoholera en México.

Los principales consumidores del alcohol etílico en México se presentan en la tabla 1.

T A B L A 1

CONSUMO DE ALCOHOL POR RAMAS

Fabricantes de productos químicos.
Fabricantes de bebidas alcohólicas.
Industria de alimentos.
Hospitales.
Farmacias.
Fabricantes de pinturas y solventes.
Fabricantes de productos varios (éter,
cosméticos, vinagre, cigarros, etc.).

Azúcar, S.A. 1985.

Los esfuerzos en investigaciones desarrollados por otras naciones, principalmente Brasil y los Estados Unidos, arrojan indicios favorables sobre el potencial energético del etanol. El contexto involucra ampliamente a México.

A continuación se resumen los principales usos potenciales del etanol en México (9, 20 y 32).

- Alcohol anhidro, mezclado con gasolina como combustible para motores de combustión interna.
- Alcohol hidratado, como combustible para motores de combustión interna.
- Alcohol hidratado, como materia prima para la síntesis de etileno.

Cualquiera de las alternativas anteriores implica por sí misma una alta demanda de alcohol. El alcohol etílico posee un grado de octanaje mayor que la gasolina; cuando se añade a esta se reduce el requerimiento de tetraetilo de plomo (20). Por otro lado, la reacción química para obtener etileno a partir de etanol se conoce desde hace tiempo pero debido a los bajos precios y a la amplia disponibilidad de petróleo, varias unidades productoras quedaron inactivas hacia los años cincuentas. No obstante, los precios actuales y factores mencionados anteriormente han ampliado las perspectivas de producción de etileno a partir de etanol.

El etileno es el mayor producto petroquímico después del amoníaco; se calcula una producción anual mundial de 25 millones de toneladas; grandes volúmenes de polietileno, cloruro de polivinilo, óxido de etileno y etileno glicol pueden ser fabri-

cados a partir del etanol obtenido por fermentación. El etileno también puede ser materia prima para producir acetaldehído, que a su vez podría ser usado para fabricar n-butanol, etil hexanol, butadieno y otros (3).

La obtención de etanol por fermentación alcohólica, con propósitos energéticos a nivel industrial se desarrolla en varios países (Brasil, Estados Unidos, India, Zimbawe, Nueva Zelanda y Unión Soviética entre otros). Brasil y Estados Unidos son quizá, los países con programas más ambiciosos para su explotación comercial masiva; en ambos países están a la venta mezclas de combustibles formados por etanol (10 a 20%) y gasolina. Se estima que la producción brasileña de etanol llegó a 5 200 millones de litros en 1983; en 1981 produjo alrededor de 132 000 vehículos con base en alcohol, con una producción total entre 1979 y 1981, de 390 000; además, entre 1977 y 1981 se adaptaron 54 000 vehículos para usar combustible con alcohol. En Estados Unidos existían, en 1981, unos 2 000 distribuidores de "gasohol" (mezcla de gasolina y alcohol) repartidos en 28 estados; su producción alcanzó, en 1980, alrededor de 500 millones de litros (7).

Para 1984, el número de vehículos que utilizan exclusivamente alcohol en Brasil, llegó a 1 200 000 estimando que la producción se duplique para 1985. Se calcula que actualmente más del 80% de los vehículos automotores utilizan alcohol (4).

Como resultado del Programa Nacional de Alcohol en Brasil, el alcohol de caña de azúcar dejó de ser un producto meramente secundario de la industria del azúcar pasando a ser un

factor importante, no sólo de la economía del azúcar, sino de la economía nacional (21).

Por lo que respecta a la demanda mundial, se prevee que aumentará un 67% para 1990 en cuanto a bebidas alcohólicas y alcohol industrial, lo que representará un ingreso global de 49 000 millones de dólares (24).

ASPECTOS TECNOLOGICOS.

Como se ha mencionado, factores de gran importancia en la producción de alcohol, son los costos y disponibilidad de los sustratos; casos concretos y contrastantes son los de la investigación en Brasil y los Estados Unidos; en éste último, las investigaciones se han enfocado al uso de residuos celulósicos y lignocelulósicos, los cuales representan su principal fuente potencial de sustrato para la conversión a alcohol (16), en cambio, Brasil realiza principalmente estudios de optimización de melazas de caña incluyendo la utilización integral de la caña de azúcar, dada su importante producción (21).

Diversos sustratos han probado su potencial energético - mostrando ventajas y limitantes que van desde el aspecto económico hasta impedimentos tecnológicos; la tabla 2 muestra las principales fuentes renovables de sustrato (16).

Desde el punto de vista técnico, las melazas y el jugo de caña constituyen la mejor opción para la producción de alcohol puesto que sus características permiten abaratar los procesos;

T A B L A 2

PRINCIPALES FUENTES ENERGETICAS RENOVABLES PARA
PRODUCIR ALCOHOL ETILICO EN LA ACTUALIDAD

Fuente	Pretratamiento	País
Melazas de caña	Clarificación	Brasil, México, E.U.A.
Melazas de remolacha	Clarificación	Países europeos
Jugo de caña	Clarificación	Brasil
Almidón de grano (Maíz, sorgo, trigo)	Sacarificación (Hidrólisis)	E.U.A.
Almidón de patata	Sacarificación (Hidrólisis)	China
Madera, aserrín y re- siduos forestales	Hidrólisis áci- da	Suiza, E.U.A., países socialis- tas
Mezclas de basuras municipales y resi- duos de pulpa de mo- lino	Hidrólisis en- zimática	E.U.A.
Residuos agrícolas (bagazo, bagacillo de caña)	Hidrólisis áci- da, hidrólisis enzimática	Brasil

Recopilado de: Faber M. (1981), Chen T.S. (1982), Monteiro C.
E. (1975).

sin embargo no siempre está disponible en grandes cantidades y a precios adecuados dado su elevado costo de transporte, manejo y fluctuaciones de mercado (25).

Una alternativa la representan los almidones de grano como el maíz, el sorgo y el trigo, que en el renglón costos compiten con las melazas; en E.U.A. son la principal fuente disponible y los problemas que enfrentan como sustratos para producir etanol son su dependencia de las condiciones climáticas, y por otra parte, su uso implica reducciones en los volúmenes de estos nutrientes para consumo animal y humano. Actualmente sólo los E.U.A. emplean este tipo de sustratos en la obtención de alcohol (16). Una fuente similar, la patata dulce ha sido empleada en China desde hace muchos años en la producción de grandes volúmenes de alcohol (10).

Países desarrollados como E.U.A. y algunos países socialistas, han dirigido sus estudios al uso de residuos celulósicos como materias primas. Para 1980 se calculó que alrededor del 95% de las fuentes disponibles y potenciales corresponden a los residuos celulósicos (madera, residuos agrícolas y municipales). Esto plantea un dilema partiendo de que la tecnología para convertir celulosa a etanol no es rentable, basándose en el estado actual de la misma (16). La primera etapa requiere la despolimerización de la celulosa y los problemas que presentan los métodos de hidrólisis ácida incluyen la corrosión por ácido y recuperación del mismo; un ejemplo típico es el de Sitton y col. (29), donde el 50% de los costos de inversión y 40% de los de operación correspondieron a la recuperación del

ácido sulfúrico.

Otro tipo de proceso es el de sacarificación enzimática - al cual recientemente se incorporaron "ciclos de vacío" en las técnicas de cultivo por lote simple y alimentado, utilizando - paja de arroz como sustrato. El proceso es prometedor siendo - su principal desventaja el costo de las enzimas celulolíticas.

La tercera alternativa comprende los procesos simultáneos de producción de celulasas, hidrólisis de la celulosa y la fermentación. Una bacteria anaerobia, *Clostridium thermoCELLUM* - produce etanol, ácido acético, hidrógeno y CO₂ a partir de residuos celulósicos acumulando además, azúcares reductores en - el medio de cultivo. El proceso no es aún económicamente factible ya que los rendimientos de etanol y productividad en biomasa son muy bajos (12).

Ya sea que se utilice uno u otro proceso, en las fermentaciones con fines de producir etanol, como en otras industrias de fermentaciones, el papel que juega el tipo de microorganismo a emplear es de gran importancia, puesto que su selección - influye determinantemente en la obtención de buenos resultados.

Las características metabólicas de la utilización de azúcares, velocidad de duplicación, facilidad de manipulación y - ausencia de patogenicidad, entre otras, hacen de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, los microorganismos idóneos y por ende ampliamente utilizados en el campo de las - fermentaciones alcohólicas.

Siendo un microorganismo facultativo, puede involucrar - dos sistemas enzimáticos para la degradación de glucosa. Estos

sistemas altamente sensibles a las condiciones ambientales engloban a la respiración anaerobia o fermentación (Ruta de Embden-Meyerhof) y la respiración aerobia o ciclo de los ácidos tricarboxílicos, los cuales son mostrados en las figuras 5 y 6.

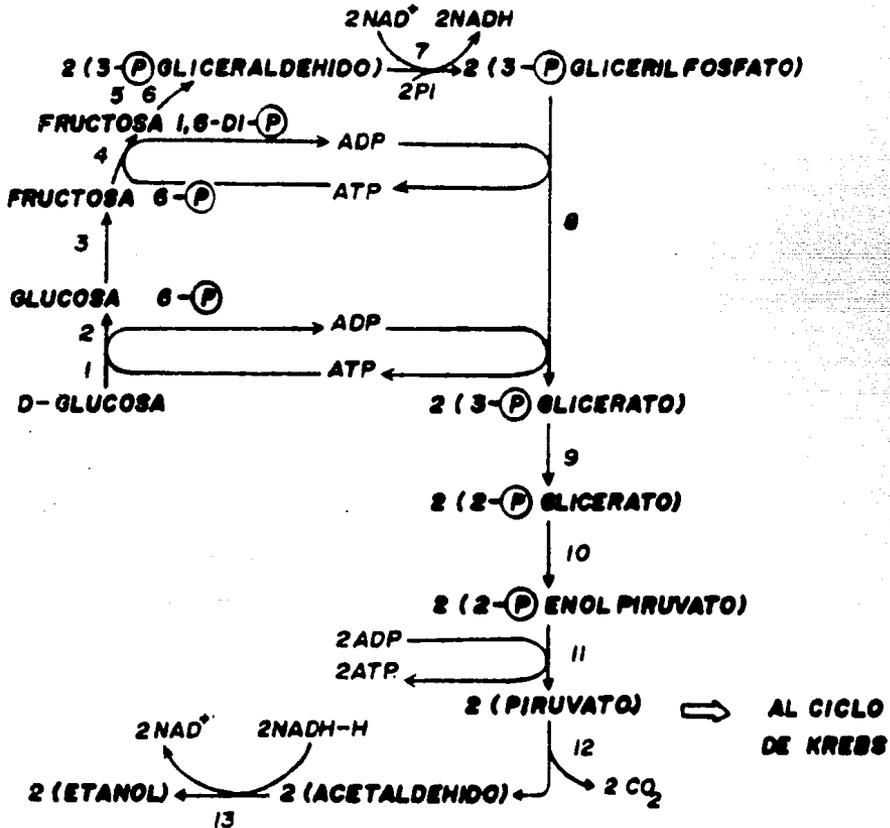
La actividad de cada uno de los sistemas está regulada principalmente por las concentraciones de glucosa y oxígeno en el medio. Inicialmente, la glucosa es degradada por las enzimas de la Ruta de Embden-Meyerhof hasta ácido pirúvico y dependiendo de las condiciones de anaerobiosis o aerobiosis, el producto final es etanol, agua y energía o bien, agua, CO_2 y energía respectivamente, estos últimos, derivados de la actividad del sistema enzimático del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena respiratoria (13).

PROCESOS DE FERMENTACION ALCOHOLICA.

En la actualidad existen diferentes procesos de producción de alcohol etílico aunque la mayoría de los de reciente desarrollo no han sido llevados a escala industrial.

El cultivo por lote es el más antiguo y utilizado; sus ventajas radican en su facilidad de operación y bajos costos de inversión a cambio de baja eficiencia en el proceso. En este tipo de fermentaciones se han introducido variantes para obtener mejores rendimientos; uno de ellos es el cultivo por lote alimentado, en el cual se agrega medio fresco a intervalos de tiempo preestablecidos para restituir los azúcares agotados

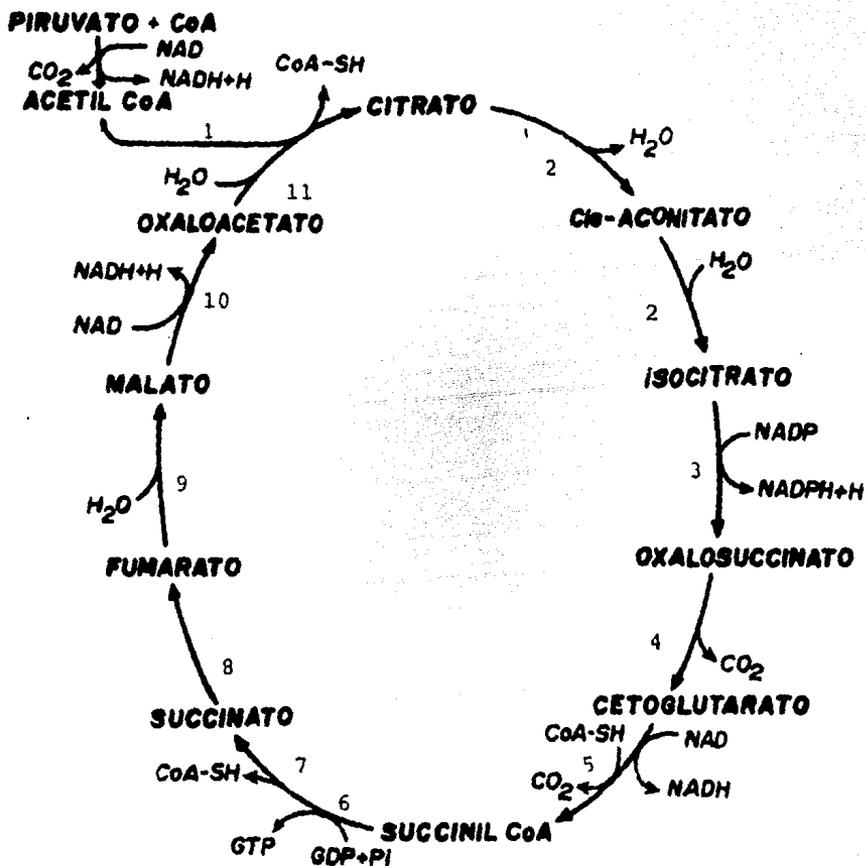
FIGURA 5



- | | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 1. Hexocinasa | 8. 3-Fosfoglicerato cinasa |
| 2. Glucocinasa | 9. Fosfogliceromutasa |
| 3. Fosfoglucoisomerasa | 10. Fosfopiruvato hidratasa |
| 4. Fosfofructocinasa | 11. Piruvato cinasa |
| 5. Fructosa difosfato aldolasa | 12. Piruvato descarboxilasa |
| 6. Triosa fosfato isomerasa | 13. Alcohol deshidrogenasa |
| 7. Gliceraldehído deshidrogenasa | |

RESPIRACION ANAEROBIA Y PRODUCCION DE ETANOL

FIGURA 6



- | | |
|---|-----------------------------|
| 1. Citrato sintetasa | 6. Succinil-CoA hidrolasa |
| 2. Aconitato hidratasa | 7. Succinil-CoA sintetasa |
| 3. Isocitrato deshidrogenasa | 9. Succinato deshidrogenasa |
| 4. Isocitrato deshidrogenasa | 9. Fumarato hidratasa |
| 5. Sistema 2-cetoglutarato deshidrogenasa | 10. Malato deshidrogenasa |
| | 11. Citrato liasa |

CICLO DE KREBS

en el medio de fermentación.

Con respecto al cultivo por lote, el cultivo continuo tiene ventajas que se reflejan ampliamente en la productividad, ya que la fase logarítmica se mantiene por adición de medio fresco con una velocidad igual a la de salida y manteniendo constantes las condiciones ambientales. Aunque la rentabilidad del proceso es sensiblemente mayor, los costos de implementación son altos requiriendo operaciones relativamente más complicadas y con posibilidad de contaminación, lo que impide el empleo más amplio de este tipo de proceso.

En años recientes se han desarrollado innovaciones en el cultivo continuo, como es el caso de las fermentaciones con reciclado de levaduras y el cultivo con vacío y reciclado; este último ha mostrado altos niveles de productividad.

Otros procesos de interés y de reciente estudio, incluyen la inmovilización de células para producir etanol. Los ejemplos más importantes son la inmovilización de células por adsorción y por atrapamiento en geles; en este último se han obtenido resultados sorprendentes a escala piloto (23). Sin embargo muchos problemas que involucra la inmovilización de células quedan aún por resolverse, incluyendo la ingeniería de diseño de fermentadores y manejo de las variables involucradas (31).

En la tabla 3 se observan algunos resultados de un estudio comparativo de sistemas para la producción de etanol.

T A B L A 3

RELACIONES DE PRODUCTIVIDAD DE DIFERENTES
PROCESOS DE PRODUCCION DE ETANOL

Sistema	Productividad ETOH (g/l·h)
Lote	2.2
Continuo	7.0
Continuo con reciclado	29.0
Vacío con reciclado	82.0
Células inmobilizadas:	
- Por atrapamiento	100.0
- Coinmovilizadas con enzimas	20.0

Nojima, (1983).

ASPECTOS SOCIALES.

La gravedad de las repercusiones sufridas por el medio ambiente a causa de prácticas inadecuadas tanto agrícolas como industriales han sido visualizadas desde hace tiempo; esto ha originado que algunos países dediquen importantes recursos para el control de los problemas ambientales derivados de estas actividades.

La contaminación ambiental ha aumentado en proporciones - que no pueden ser ignoradas ya que su crecimiento y complejidad va aparejado con el crecimiento inusitado que las diversas actividades industriales, agrícolas y urbanas han alcanzado en el presente siglo. Aunque los gobiernos de algunos países están - conscientes de la gravedad de los efectos deletéreos provocados en el medio ambiente y mantienen programas permanentes de control ambiental, esto no representa la generalidad de los casos.

A pesar de que se ha destacado lo anterior, en países en - proceso de desarrollo, como es el caso de México, aún no existen programas coherentes y de carácter permanente, además de - que no se cuenta con una legislación adecuada de la realidad - del país; los esfuerzos que se llevan a cabo actualmente, son - aislados y aún cuando existe gran interés por parte de algunas - instituciones, la falta de coordinación de los sectores involucrados, aunados a diversos intereses en juego, ha dado lugar a que el problema persista e incluso se recrudezca.

Uno de los recursos vitales más afectados por la contaminación en nuestro país lo constituye el agua; la República Mexicana

na no es muy abundante en recursos hidráulicos; posee aproximadamente 0.1% del total anual de agua dulce en el mundo, lo que hace que un gran porcentaje del territorio esté catalogado como semidesértico, dadas además, sus características de distribución.

La precipitación anual de la República se estima en $395 \times 10^9 \text{ m}^3$ cantidad que al compararse con la demanda de los cuatro sectores más importantes en el país (urbano, industrial, agrícola y de generación de energía), que en 1980, fué de $210 \times 10^9 \text{ m}^3$ indica que en un plazo relativamente corto, quizá en 1990, la demanda no podrá cubrirse con agua de primer uso. Lo anterior evidencia la imperiosa necesidad de reusar y racionalizar el agua que utilizan los sectores mencionados.

Independientemente de su origen, el agua una vez usada y transformada en agua residual es vertida a los sistemas de drenaje y colección para ser finalmente descargada en algún río u otro cuerpo receptor en donde, al entrar en contacto con factores físicos, químicos y biológicos propios del receptor, empieza a sufrir una serie de transformaciones independientes de la actividad humana, que dieron como resultado final, hasta hace relativamente poco tiempo, su purificación natural. Dicho fenómeno se conoce como autopurificación de las corrientes y es el resultado de la acción conjunta de fenómenos físicos (dilución, mezclado, sedimentación, adsorción, etc.), fenómenos químicos (difusión con reacción química, precipitación) y fenómenos biológicos (degradación aerobia y anaerobia). No obstante, la capacidad de autopurificación tiene un límite (capacidad de

asimilación) por encima del cual el cuerpo receptor ya no recupera sus condiciones originales, dando lugar a la ruptura del equilibrio ecológico (18).

Una medida del grado de contaminación de un cuerpo receptor es la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), que representa la cantidad de oxígeno consumido a un tiempo determinado por una población de microorganismos al oxidar la materia orgánica para ser usada en sus funciones vitales. Esta degradación incluye los principales grupos de sustancias orgánicas presentes en estos cuerpos (proteínas, carbohidratos, grasas de origen animal y vegetal, etc.) (27).

Dentro de las prácticas agroindustriales que participan con los más elevados niveles de contaminación hidrológica se encuentran las actividades de los ingenios azucareros, principalmente a través de las destilerías de alcohol; tal efecto contaminante, estimado en DBO se aprecia en la tabla 4.

Los procesos de producción de alcohol por fermentación en México utilizan melazas de caña como sustrato, obteniéndose, por cada litro de alcohol, alrededor de 12.5 litros aproximadamente de residuos de la destilación, comúnmente llamados "vinazas", además de agua de lavado de la misma fermentación (9).

Un diagrama general del proceso de producción de alcohol por fermentación se muestra en la figura 7.

Monteiro (21), en un análisis de los residuos contaminantes descargados por las destilerías de alcohol hacia los cuerpos receptores, señala que la contribución hecha por las vinazas, las coloca como el contaminante de mayor importancia, lo

T A B L A 4

COMPARACION DE LA DBO₅, 20°C DE DIFERENTES
TIPOS DE AGUA EN LA REPUBLICA MEXICANA

Tipo de agua (origen)	DBO ₅ , 20°C (mg/l)
Doméstica	240
Industria del Maíz	3500
-Colector general	315
Ingenio azucarero	
Cachaza	1850
Fábrica de alcohol	11250
Curtiduría	5750

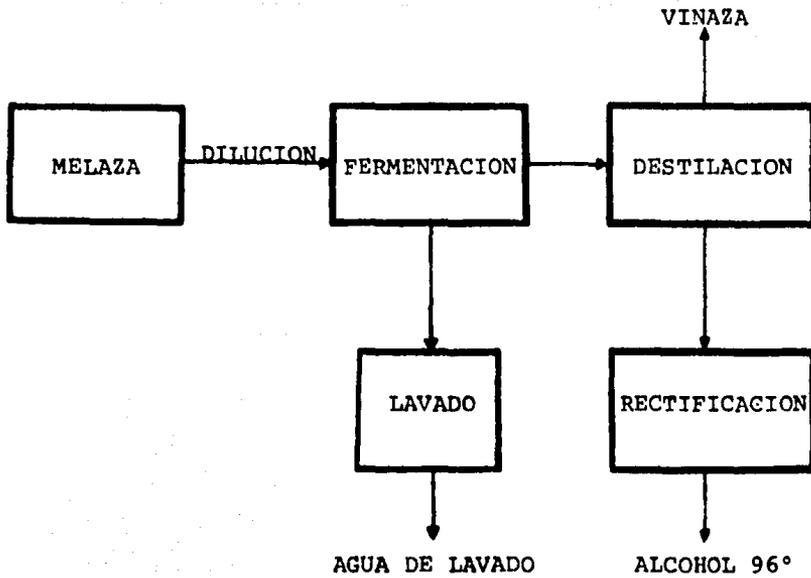
Romero Luna, (1985). (27)

cual se muestra en la tabla 5.

Considerando un valor de DBO de 15 000mg/l de la vinaza y la producción anual en la República Mexicana en 1984, que fué de 1400 millones de litros, teniendo un DBO/persona/año de 19 710g, se deduce que en ese mismo año, el DBO de la vinaza generada equivale al DBO producido por 1 065 449 personas en ese mismo año. El valor resulta impactante si se toma en cuenta que es producido solo por un tipo específico de desecho deriva

FIGURA 7

PROCESO DE PRODUCCION DE ALCOHOL ETILICO POR FERMENTACION DE MELAZAS DE CAÑA



Monteiro, 1975.

do únicamente de las destilerías de alcohol.

El efecto contaminante de las vinazas se debe principalmente a su contenido de carga orgánica con cantidades variables de azúcares reductores, y minerales tales como sulfatos, fosfatos, potasio, calcio y magnesio; la composición varía ampliamente ya que es un residuo de la destilación en la producción de alcohol.

La exigencia mundial de eliminación o tratamiento de desechos perjudiciales para el medio ambiente, es válida especialmente en el caso de las aguas residuales en la industria del alcohol. Ante esto, muchas fábricas se han encontrado ante problemas casi irresolubles, lo que ha conducido en diferentes lugares al cierre de las mismas (15).

Durante décadas se han buscado métodos eficientes y económicos con el fin de aprovechar estos desechos, sin embargo, los procedimientos conocidos en general, involucran problemas de diversa índole que deben ser analizados específicamente en base a las características propias de la región así como las características de la misma vinaza. Da Gloria (11), señala que los parámetros importantes en el uso racional de la vinaza como fertilizante, son su composición básica, el estudio de las condiciones del suelo que va a recibirlas, el cultivo que ha de ser fertilizado, las condiciones topográficas en relación a las fuentes de vinaza (destilerías) y consideraciones económicas. Las posibles ventajas de la vinaza como fertilizante son investigadas a fondo ya que la aplicación inadecuada ha contribuido a aumentar el daño a los suelos; un caso particular es el ocurrido en el -

estado de Sao Paulo donde la aplicación de vinazas a los suelos produjo la proliferación de la mosca chupadora (*Stomoxys calcitrans*) que debió ser erradicada con el uso de pesticidas (11,21).

Una evaluación detallada de los destilados residuales vistos desde el punto de vista técnico y económico indica que los siguientes procesos son factibles de ser llevados a cabo en Brasil:

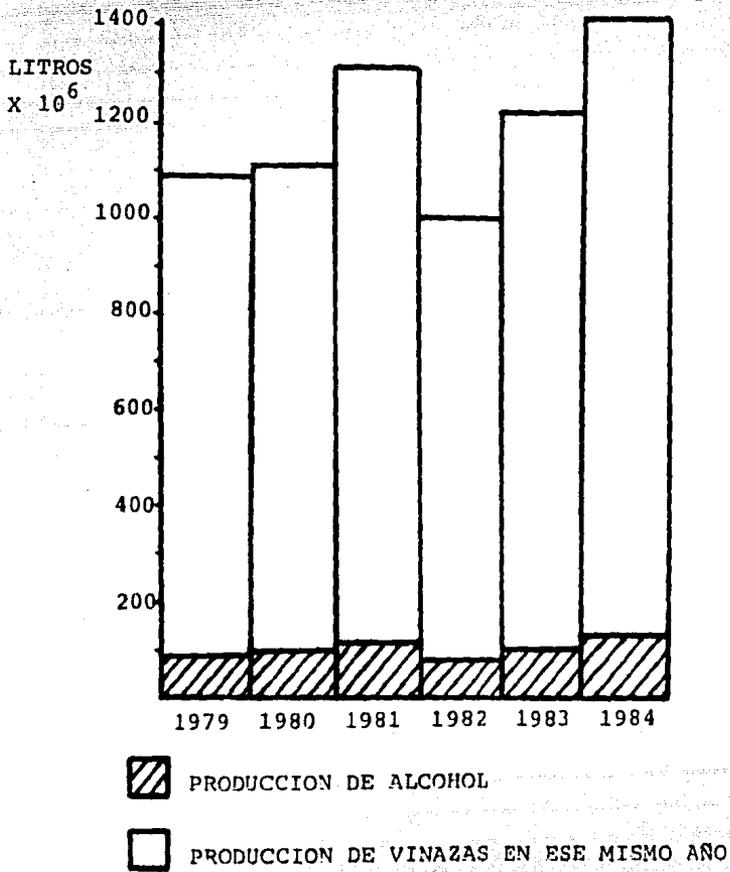
- 1.- Uso de destilado residual in-natura como fertilizante para cultivo de caña de azúcar y para uso potencial en otros cultivos.
- 2.- Producción de metano vía fermentación anaeróbica del destilado, para uso como combustible en las propias destilerías y molinos de azúcar.
- 3.- Producción comercial de proteína unicelular en el molino y concentración del residuo para alimentación animal.
- 4.- Producción comercial de cenizas potásicas para fertilizantes.

La factibilidad económica de estos procesos depende de la escala de producción, tipo de destilados, precio en el mercado de productos convencionales sustitutos, esquemas de financiamiento y costos de recuperación sobre la inversión (11).

El problema del deterioro ecológico por concepto de vinazas, afecta principalmente a los países productores de grandes volúmenes de azúcar y alcohol por fermentación y México no es la excepción, lo cual es mostrado en la figura 8; los esfuerzos realizados por países como Austria, Holanda, Inglaterra y

F I G U R A 8

GENERACION DE DESTILADOS RESIDUALES (VINAZAS) EN RELACION
A LA PRODUCCION ANUAL DE ALCOHOL EN MEXICO, DE 1979 A 1984



Azúcar, S.A. 1985.

Brasil aún no han encontrado eco en nuestro país, ya que no se conocen trabajos importantes a ese respecto.

Con el propósito de mejorar los procesos actuales de producción de alcohol por fermentación para aumentar la reutilización y, aprovechar al mismo tiempo desechos agroindustriales derivados de esta industria disminuyendo con ello el daño ecológico provocado por los mismos, nos hemos planteado el siguiente....

estado de Sao Paulo donde la aplicación de vinazas a los suelos produjo la proliferación de la mosca chupadora (*Stomoxys calcitrans*) que debió ser erradicada con el uso de pesticidas (11,21).

Una evaluación detallada de los destilados residuales vistos desde el punto de vista técnico y económico indica que los siguientes procesos son factibles de ser llevados a cabo en Brasil:

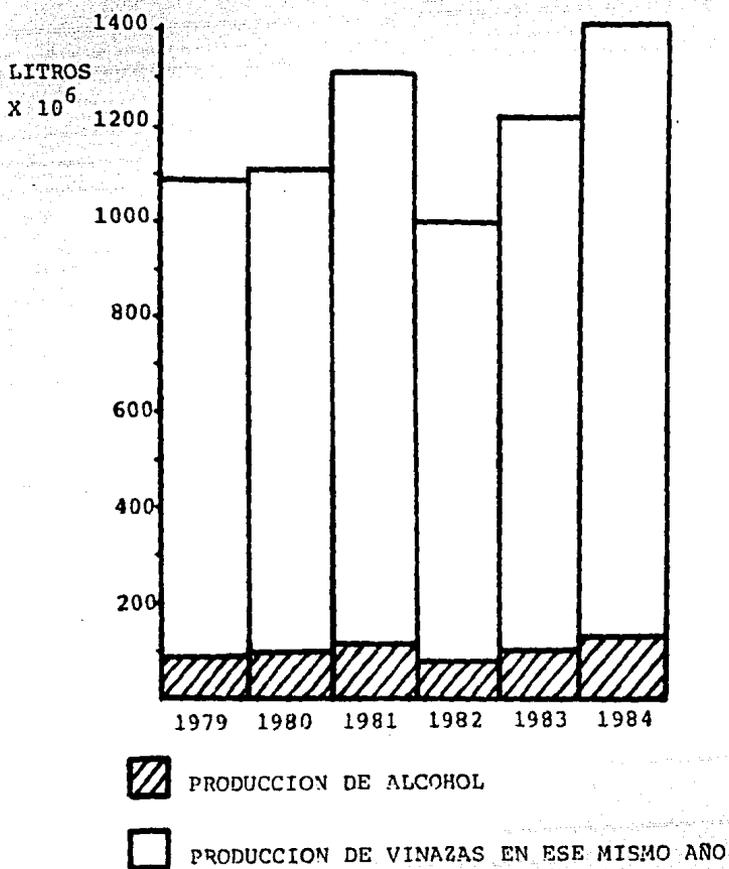
- 1.- Uso de destilado residual in-natura como fertilizante para cultivo de caña de azúcar y para uso potencial en otros cultivos.
- 2.- Producción de metano vía fermentación anaeróbica del destilado, para uso como combustible en las propias destilerías y molinos de azúcar.
- 3.- Producción comercial de proteína unicelular en el molino y concentración del residuo para alimentación animal.
- 4.- Producción comercial de cenizas potásicas para fertilizantes.

La factibilidad económica de estos procesos depende de la escala de producción, tipo de destilados, precio en el mercado de productos convencionales sustitutos, esquemas de financiamiento y costos de recuperación sobre la inversión (11).

El problema del deterioro ecológico por concepto de vinazas, afecta principalmente a los países productores de grandes volúmenes de azúcar y alcohol por fermentación y México no es la excepción, lo cual es mostrado en la figura 8; los esfuerzos realizados por países como Austria, Holanda, Inglaterra y

F I G U R A 8

GENERACION DE DESTILADOS RESIDUALES (VINAZAS) EN RELACION
A LA PRODUCCION ANUAL DE ALCOHOL EN MEXICO, DE 1979 A 1984



Azúcar, S.A. 1985.

Brasil aún no han encontrado eco en nuestro país, ya que no se conocen trabajos importantes a ese respecto.

Con el propósito de mejorar los procesos actuales de producción de alcohol por fermentación para aumentar la redituabi lidad y, aprovechar al mismo tiempo desechos agroindustriales_ derivados de esta industria disminuyendo con ello el daño eco- lógico provocado por los mismos, nos hemos planteado el si- guiente....

OBJETIVO

Optimizar la producción de etanol a partir de las melazas de la caña de azúcar y estudiar la factibilidad técnica de usar - la vinaza como fuente de nutrientes en la fermentación

MATERIALES Y METODOS

MEDIO DE CULTIVO

Con el propósito de tener un medio que proporcione los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo empleado, fué necesario, en primera instancia clarificar la melaza, lo cual tiene por objeto hacer más accesibles los azúcares mediante una hidrólisis ligera y eliminar algunos elementos -- por medio de una precipitación química. En segunda instancia, se procedió al diseño sistemático del medio de cultivo.

1.- CLARIFICACION DE LA MELAZA. Utilizando melaza de caña proporcionada por el ingenio OACALCO del Estado de Morelos, se hizo una dilución con agua de la llave en una relación de 1:1, - llevándose a un pH de 3.5 con ácido sulfúrico concentrado. La melaza diluida se sometió a ebullición por 3-5min y posteriormente se conservó en refrigeración por 48hs al cabo de lo cual se decantó, desechándose el sedimento (19). A la melaza clarificada se le determinaron azúcares y se almacenó a 4°C.

2.- DETERMINACION DE AZUCARES. El método se basa en la cuantificación del color anaranjado producido al poner en contacto - el fenol con los azúcares en presencia de ácido sulfúrico. La intensidad de dicha coloración se mide por espectrofotometría y es directamente proporcional a la concentración de azúcares (14).

Para la determinación de azúcares se elaboró una curva patrón de azúcares en cada experimento en fermentador. Partiendo de una solución base de dextrosa anhidra (Baker R.A.) al 10%, se hicieron diluciones para obtener una concentración de $100\mu\text{g/ml}$. De esta dilución se tomaron volúmenes de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1ml, completando a un volumen de 1ml en cada caso con agua destilada; enseguida se agregaron 1ml de fenol (Baker R.A.) al 5% (v/v) en agua; y por último 5ml de ácido sulfúrico concentrado. Cada tubo se agitó durante 5seg en un vortex (Lab-Line, mod. Supermixer 1290) y se dejó reposar en baño de hielo hasta temperatura ambiente. Posteriormente se leyó la absorbancia a 490nm en un espectrofotómetro (Baush & Lomb) obteniéndose la ecuación correspondiente por el método de mínimos cuadrados.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con las muestras problema a excepción de las diluciones. En este caso se hicieron dos diluciones a cada muestra cuidando que ambas concentraciones cayeran en el intervalo de concentraciones de la curva patrón. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

3.- DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO. Con objeto de asegurar un balance adecuado de nutrientes esenciales para el crecimiento de la cepa, se diseñó un medio de cultivo basándose en la composición elemental de las levaduras (17).

Los resultados experimentales indican rendimientos para carbohidratos del orden del 50% (6), de tal manera que la relación de rendimiento en base a sustrato es:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g de células formadas}}{\text{g de sustrato consumido}} = 0.5$$

Tomando como base de cálculo 1g de azúcar (sustrato), se determinó la cantidad requerida de los nutrientes complementarios en base a la composición reportada en la tabla 6.

a) NITROGENO. Requerimientos:

$$80\text{mg N/g cel} \times 0.5\text{g cel/g az} = 40\text{mg N/g az}$$

suministro (como Sulfato de amonio):

$$40\text{mg N/g az} \times \frac{132.14\text{mg } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}{14\text{mg N}} = 377.54\text{mg/g az}$$

b) FOSFORO. Requerimientos;

$$26\text{mg P/g cel} \times 0.5\text{g cel/g az} = 13\text{mg P/g az}$$

suministro (como Fosfato diácido de potasio):

$$13\text{mg P/g az} \times \frac{136.09\text{mg } \text{KH}_2\text{PO}_4}{31\text{mg P}} = 57.07\text{mg/g az}$$

c) AZUFRE. Requerimientos:

$$2.5\text{mg S/g cel} \times 0.5\text{g cel/g az} = 1.25\text{mg/g az}$$

suministro (como Sulfato de amonio):

$$1.25\text{mg S/g az} \times \frac{132.14\text{mg } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}{32\text{mg S}} = 5.16\text{mg/g az}$$

estos requerimientos se cubren con el Sulfato de amonio suministrado como fuente de nitrógeno.

d) POTASIO. Requerimientos:

$$10\text{mg K/g cel} \times 0.5\text{g cel/g az} = 5\text{mg K/g az}$$

suministro (como Fosfato diácido de potasio):

T A B L A 6

COMPOSICION ELEMENTAL DE LAS LEVADURAS

Elemento	% Base seca
C	47-50
N	7.5-8.0
P	0.8-2.6
S	0.1-0.25
O	30
K	1.0
Mg	0.1-0.5
Na	0.01-0.1
Ca	0.1-0.3
Cu	0.002-0.01
Mn	0.0005-0.007
Mo	0.0001-0.0002

Aiba, (1973).

$$5\text{mg K/g az} \times \frac{136.09\text{mg KH}_2\text{PO}_4}{39\text{mg K}} = 17.45\text{mg/g az}$$

estos requerimientos se cubren con el Fosfato diácido de potasio suministrado como fuente de fósforo.

e) MAGNESIO. Requerimientos:

$$5\text{mg Mg/g cel} \times 0.5\text{g cel/g az} = 2.5\text{mg Mg/g az}$$

suministro (como Sulfato de magnesio heptahidratado):

$$2.5\text{mg Mg/g az} \times \frac{246.48\text{mg MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{24.3\text{mg Mg}} = 25.35\text{mg g/ az}$$

f) CALCIO. Requerimientos:

$$1\text{mg Ca/g cel} \times 0.5\text{g cel/g az} = 1.5\text{mg Ca/g az}$$

suministro (como Cloruro de calcio dihidratado):

$$1.5\text{mg Ca/g az} \times \frac{147.02\text{mg CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{40\text{mg Ca}} = 5.51\text{mg/g az}$$

En función a lo anterior, la composición del medio en cuanto a sales se resume en la tabla 7.

MICROORGANISMO UTILIZADO,

1.- CONSERVACION. Partiendo de la cepa original de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fué aislada de agave tequile ro parcialmente fermentado, conservada a 4°C, se hizo una resiembra en tubos inclinados con tapón de rosca conteniendo PDA; los tubos se mantuvieron en refrigeración a 4°C después de un período de incubación de 48h. La resiembra se llevó a cabo en condiciones asépticas y se cubrieron con papel parafilm después de haber quemado la punta de los tapones de algodón.

T A B L A 7

COMPOSICION DE SALES DEL MEDIO DE CULTIVO

Compuesto	mg/g azúcar
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	377.54
KH_2PO_4	57.07
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25.35
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.51

2.- PROPAGACION. 72h antes de cada fermentación se tomaron dos tubos refrigerados y se incubaron por espacio de 24h a una temperatura de 30°C; realizado esto, y en ambiente estéril, se hicieron resuspensiones con 5ml de agua destilada estéril en cada tubo, las cuales se transfirieron a dos matraces erlenmeyer de 500ml conteniendo 100ml de medio melaza ya diseñado y en concentración de 4% de azúcares. Esta primera siembra se incubó durante 24h a 30°C con una agitación de 150rpm (Agitadora - modelo G-25 NBS, EUA). Al cabo de ese tiempo se tomaron 20ml de cada matraz transfiriéndose a dos matraces de 1000ml conteniendo 480ml de medio melaza cada uno, con la composición señalada. La resiembra se realizó en ambiente estéril empleando medios esterilizados en autoclave a 20lb, 20min e incubándose ba

jo las mismas condiciones de la siembra.

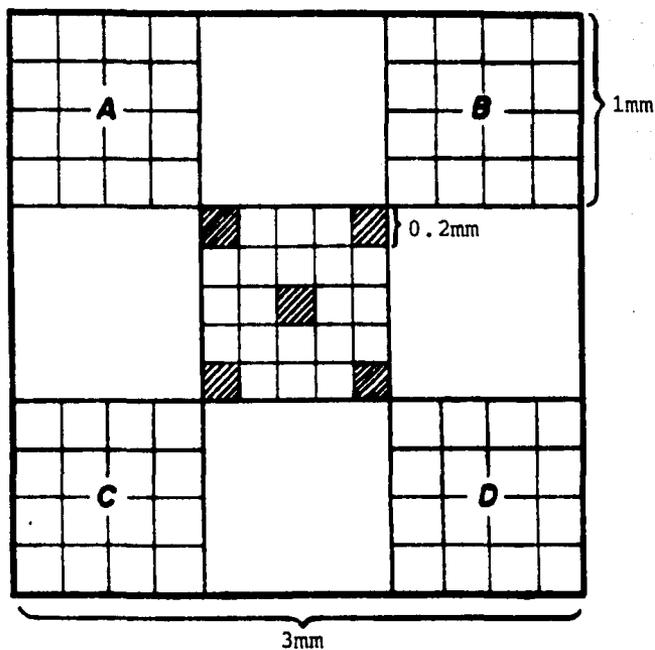
3.- CONTEO CELULAR. La concentración celular se midió utilizando el método del hematocitómetro (Bright Line, American Optical), que determina el número de células por unidad de volumen. La rapidez y representatividad son las ventajas que se tomaron en cuenta en la selección del método, dadas las características de las cinéticas desarrolladas.

El hematocitómetro consiste en un portaobjetos de cristal compacto e incoloro, sobre cuyo tercio medio está dispuesta una cámara de doble recuento (plataformas). Las plataformas centrales son exactamente 0.1mm más bajas que las plataformas soportes del cubreobjetos y tienen un rayado cuadrangular de Neubauer que consta de un cuadrado primario de 9mm^2 , subdividido en nueve cuadros secundarios de 1mm^2 cada uno y llamados A, B, C, y D, los situados en las esquinas. Estos cuadros se emplean para recuento de leucocitos y se subdividen en 16 cuadros terciarios.

El cuadro central secundario está dividido en 25 cuadros terciarios; cada uno mide $0.2 \times 0.2\text{mm}$ y se subdividen a su vez en 16 cuadros más pequeños que completan un total de 400 para el cuadro secundario central. Como regla, cinco de los cuadros más pequeños, se emplean para el recuento de glóbulos rojos y plaquetas y, en nuestro caso, es de especial atención puesto que son los utilizados para el recuento de levaduras.

El volumen del cuadro central secundario está comprendido por la altura de 0.1mm y el área de 1mm^2 , que en términos de -

FIGURA 9



REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL HEMATOCITOMETRO

volumen equivale a 1×10^{-7} litros por lo que, para obtener el resultado en base a la lectura de cinco cuadros terciarios se estableció el siguiente factor:

$$\text{No. Cel/l} = 5 \times 10^7 \times \text{dilución de la muestra} \quad (1)$$

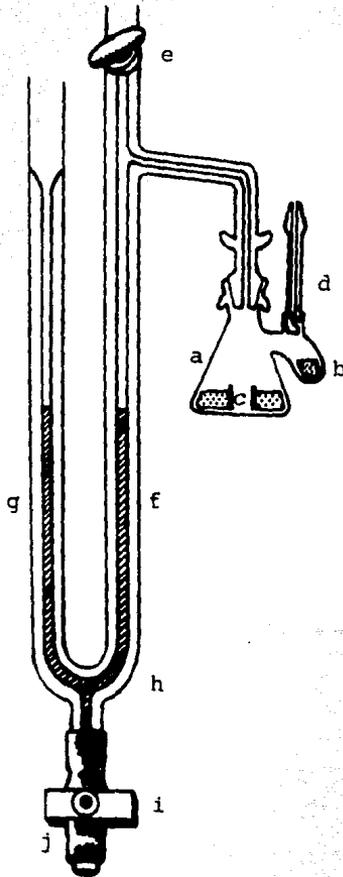
Se tomaron muestras al inicio de la fermentación y a intervalos de 1, 2, 3 y 4hs dependiendo del comportamiento de las cinéticas. Cada una se diluyó en tubos de ensaye inmediatamente después de la toma de muestra, de manera que se obtuviera un número de células adecuado para el conteo. La muestra a una dilución conocida se colocó en ambas plataformas por medio de una pipeta Pasteur, previa agitación de la dilución en un vórtex (Lab-Line mod. Supermixer 1290). La lectura se llevó a cabo en los 5 cuadros señalados utilizando el objetivo 40X de un microscopio óptico (SWIFT No. 7855877).

EXPERIMENTOS DE RESPIRACION

Con el propósito de conocer en forma rápida las máximas concentraciones de alcohol y de azúcar que tolera la cepa con la cual se trabajó, consideramos conveniente llevar a cabo los experimentos por medio de un respirómetro Warburg, para así, mediante mediciones en el consumo de oxígeno o de producción de CO_2 , llevar a cabo la selección adecuada de la concentración de las sustancias señaladas.

1.- FUNDAMENTOS. El respirómetro Warburg (B. Braun Melsungen), mostrado en la figura 10, es un aparato que permite realizar -

FIGURA 10



- a) Vaso principal
- b) Brazo lateral
- c) Vaso central
- d) Ventana
- e) Llave de tres vías
- f) Rama interna
- g) Rama externa
- h) Líquido manométrico
- i) Pinzas de tornillo
- j) Reservorio del líquido

ESQUEMA DEL RESPIROMETRO WARBURG

experimentos cuantitativos en sistemas que llevan a cabo inter cambios gaseosos. El principio del respirómetro se rige básicamente por la Ley de los Gases:

$$P V = R T \quad (2)$$

R es la constante universal de los gases; si dos de las tres variables las mantenemos constantes durante el experimento y ocurre un cambio en la cantidad de gas en el sistema, la variable que no ha sido mantenida constante, dará la medida de la cantidad de gas consumido o liberado.

El "Método Warburg" es uno de los tres procedimientos fundamentales en manometría. En este método se mantienen constantes durante el experimento tanto la temperatura como el volumen y los cambios ocurridos en la cantidad de gas pueden ser medidos por cambios ocurridos en la presión.

Durante la experimentación, la llave de tres vías y la ventana del matraz deben cerrarse y el líquido manométrico llevarse a un nivel fijo en su rama interna (normalmente a 150mm) en estas condiciones el volumen del sistema permanece constante a lo largo de todas las observaciones. La producción o consumo de gas en el transcurso del experimento se mide por cambios en la altura de la columna externa del manómetro; el volumen de éste gas se obtiene multiplicando el cambio en la altura de la rama externa del manómetro (h) por un factor conocido como "constante del matraz" (k). El valor de este factor es función del líquido manométrico, de la temperatura, del gas im

plicado en el proceso y del volumen de las fases gaseosa y líquida del sistema (30).

La constante "k" se deriva a partir de la Ley General de los Gases, mostrada en la ecuación 2:

donde:

P = Presión en mm del líquido manométrico

V = Volumen

R = Constante de los gases

T = Temperatura en °K

Si: $V = V_g$

$$P V_g = R T \quad (3)$$

$$R = \frac{P V_g}{T} \quad (4)$$

Considerando la ecuación 4 en condiciones estándar:

$T_0 = 273^\circ\text{K}$, $P_0 = 1\text{atm}$, $V_{0g} = V_g$ a temperatura y presión estándar se tiene:

$$R = \frac{P_0 V_{0g}}{T_0} \quad (5)$$

Iguando (4) y (5):

$$\frac{P V_g}{T} = \frac{P_0 V_{0g}}{T_0} \quad (6)$$

donde:

α = Constante de solubilidad de los gases

V_L = Volúmen del líquido del matraz

En base a estas consideraciones, la cantidad total (V_g) - de gas es:

$$V_g = V_{0g} + V_{0L} \quad (11)$$

$$\begin{array}{l} \text{Vol. total} \\ \text{de gas} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Vol. de gas en} \\ \text{cond. estándar} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Vol. de gas} \\ \text{disuelto en} \\ \text{el líquido} \end{array}$$

Sustituyendo (8) y (10) en (11) se tiene:

$$V_0 = V_g \left(\frac{T_0}{T} \right) \left(\frac{P - R}{P_0} \right) + V_L \alpha \left(\frac{P - R}{P_0} \right) \quad (12)$$

donde:

V_0 = Volumen total de gas en el sistema

Si se lleva a cabo un cambio de volumen de gas en el sistema, se puede representar como un cambio en la presión de gas

$$P - R \pm H$$

donde:

H = Producción o consumo de gas

En el caso de que H sea un consumo de gas, la ecuación 12

queda:

$$V'_0 = V_g \left(\frac{T_0}{T} \right) \left(\frac{P - R - H}{P_0} \right) + V_L \alpha \left(\frac{P - R - H}{P_0} \right) \quad (13)$$

donde:

V'_0 = Volumen de gas después de un cambio gaseoso

Ahora, si se tiene en cuenta el cambio de volumen de gas en el sistema como "X", se tiene:

$$X = V_0 - V'_0 \quad (14)$$

= Vol. total de gas en el sistema - Vol. total de gas en el sistema después del cambio

Sustituyendo (12) y (13) en (14):

$$X = \left\{ V_g \left(\frac{T_0}{T} \right) \left(\frac{P-R}{P_0} \right) + V_L \alpha \left(\frac{P-R}{T_0} \right) \right\} - \left\{ V_g \left(\frac{T_0}{T} \right) \left(\frac{P-R-H}{P_0} \right) + V_L \alpha \left(\frac{P-R-H}{P_0} \right) \right\} \quad \dots (15)$$

Quitando paréntesis queda:

$$X = V_g \frac{T_0}{T} \frac{P-R}{P_0} + V_L \alpha \frac{P-R}{P_0} - V_g \frac{T_0}{T} \frac{P-R-H}{P_0} - V_L \alpha \frac{P-R-H}{P_0} \quad \dots (15a)$$

Dejando un miembro de la ecuación los valores que involu

cran a V_L :

$$x + \left\{ \left(v_g \frac{T_0}{T} \right) \left(\frac{P-R-H}{P_0} \right) - \left(v_g \frac{T_0}{T} \right) \left(\frac{P-R}{P_0} \right) \right\} = v_L \alpha \frac{P-R}{P_0} - v_L \alpha \frac{P-R-H}{P_0} \quad (16)$$

Obteniendo factor común:

$$x + \left\{ v_g \frac{T_0}{T} \left(\frac{P-R-H}{P_0} - \frac{P-R}{P_0} \right) \right\} = v_L \alpha \left(\frac{P-R}{P_0} - \frac{P-R-H}{P_0} \right)$$

$$x + \left(v_g \frac{T_0}{T} \frac{P-R-H-P+R}{P_0} \right) = v_L \alpha \left(\frac{P-R-P+R+H}{P_0} \right)$$

$$x + \left(v_g \frac{T_0}{T} \frac{-H}{P_0} \right) = v_L \alpha \frac{H}{P_0}$$

Despejando X:

$$x = v_L \alpha \frac{H}{P_0} - v_g \frac{T_0}{T} \frac{-H}{P_0} \quad (17)$$

Obteniendo factor común:

$$x = H \left(\frac{v_g \frac{T_0}{T} + v_L \alpha}{P_0} \right) \quad (17a)$$

Si consideramos:

$$k = \left(\frac{V_g \frac{T_0}{T} + V_L \alpha}{P_0} \right)$$

queda lo siguiente:

$$X = H k \quad (18)$$

donde:

X = Cambio de volumen del gas (μ l)

H = Cambio en la rama externa del manómetro (mm)

k = Constante del matraz (μ l/mm)

2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCAR Y ETANOL EN LA RESPIRACION. El principio descrito se utilizó para la medición experimental de la velocidad de fermentación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio melaza a diferentes concentraciones de azúcares y etanol, para lo cual se siguió el proceso que a continuación se describe:

En una campana de flujo laminar, empleando en cada serie de experimentos 12 matraces Warburg y un termobarómetro con sus respectivas ramas laterales (ventanas), se llevó a cabo el llenado de la siguiente manera:

En el fondo de cada matraz se colocaron 2.5ml de medio y en cada brazo lateral 0.5ml de suspensión de células provenientes del inóculo. En el caso del termobarómetro, se coloca

ron 3.0ml de agua destilada estéril en el fondo del matraz. - Tanto los matraces como sus ramas laterales se esterilizaron - previamente.

Las concentraciones de azúcares utilizadas fueron de 4, 8, 12, 16 y 20%. Para cada una de estas concentraciones se emplearon asimismo, concentraciones de etanol de 0, 4, 8 y 12%, mostrándose en la Tabla 8 las combinaciones respectivas.

Posterior al llenado se colocaron a los matraces sus respectivas ramas laterales sellándose con suficiente grasa de -- silicón. Para esto el líquido de Brodie (Cloruro de sodio 23g, Coleato de sodio 5g/500ml de agua y Azul de Evans 200mg/l) se -- llevó previamente hasta el límite superior de la escala de ma -- nómetro, cuidando que las llaves de tres vías permanecieran -- abiertas desde el momento del ensamble.

En el baño de agua estabilizado por 15min a una tempera -- tura de 30°C, se sumergieron los matraces con una agitación -- constante por espacio de 20min a fin de estabilizar el sistema; se vertió a continuación el contenido del brazo lateral (células) en el seno de su respectivo matraz, pasando el medio de -- un compartimiento a otro varias veces hasta que las células -- fueron totalmente removidas del brazo lateral.

Realizada dicha operación, se sometieron nuevamente los -- matraces a baño de agua por espacio de 15min a efecto de alcan -- zar una nueva estabilización del sistema. Transcurrido este -- lapso, se procedió a cerrar las llaves de tres vías, bajando -- inmediatamente el líquido de Brodie de la columna interna de -- cada manómetro hasta la marca de 15cm, tomando como lectura --

T A B L A 8

COMPOSICION DE AZUCARES Y ETANOL DE LAS SERIES DE MICROFERMENTACIONES

Serie	1	2	3	4	5	6
Conc. azúcar (%)	0	4	8	12	16	20
Conc. etanol (%)	0,4,8,12	0,4,8,12	0,4,8,12	0,4,8,12	0,4,8,12	0,4,8,12

inicial el nivel del líquido en la columna externa del manómetro.

Se tomaron lecturas cada 10min, llevando nuevamente a 15cm el nivel del líquido de la rama interna antes de leer en la rama externa. Dichas lecturas se llevaron a cabo ininterrumpidamente, suspendiéndose la fermentación antes de que el nivel del líquido en la rama externa rebase el límite de la escala, o hasta que no se observaron cambios.

Al final de las fermentaciones se hizo conteo celular por el método del hematocitómetro, para conocer la cantidad de células con las que se trabajó.

La velocidad específica de producción de CO_2 (Q_{CO_2}) fue calculada como sigue:

$$\mu\text{l CO}_2 \text{ producido} = k_{\text{CO}_2} \times (h_2 - h_1)$$

donde:

k_{CO_2} = Constante del matraz en función de CO_2

h_2 = Altura final del líquido de Brodie en la rama externa del manómetro (mm)

h_1 = Altura inicial del líquido de Brodie en la rama externa del manómetro (mm)

y:

$$Q_{\text{CO}_2} = \frac{\mu\text{l CO}_2}{t_f \times \text{No. cel}}$$

donde:

Q_{CO_2} = Velocidad de producción de CO_2

t_f = Tiempo de fermentación

No. cel/l = $N \times 5 \times 10^7 \times D \times 3/10^3$

N = No. de células en cinco cuadros

D = Dilución de la muestra

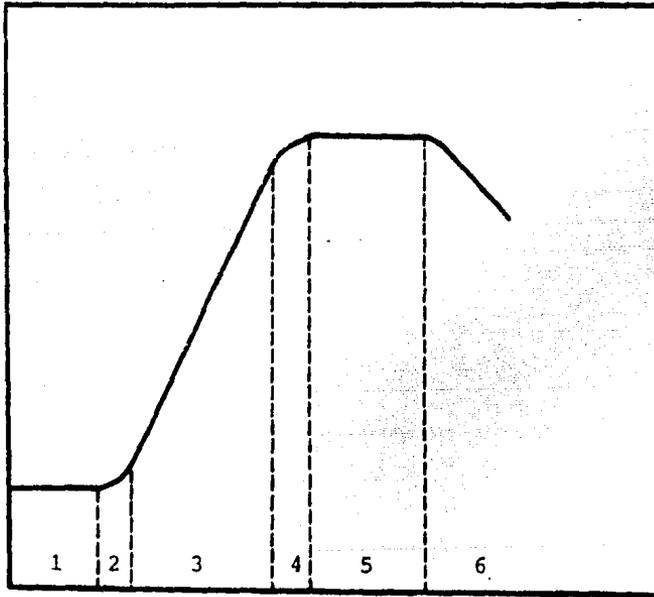
FERMENTACIONES REALIZADAS.

1.- TEORIA. La forma más antigua de propagación de los microorganismos ha sido el tradicional cultivo por lote, tando o cultivo Batch. El proceso en general consiste en colocar el microorganismo en un medio que permita el crecimiento hasta que este cese por sí mismo o sea interrumpido deliberadamente.

La principal característica del cultivo por lote es que el crecimiento sufre cambios en su comportamiento con respecto al tiempo, es decir, es un cultivo en estado no estacionario y presenta fases de crecimiento definidas y que pueden ser representadas gráficamente en una forma general en la figura 11.

Monod ha considerado el crecimiento de un cultivo microbiano como una sucesión de fases caracterizada por variaciones en la velocidad de crecimiento (2). La fase LAG, es la etapa de adaptación del microorganismo al sistema y no hay variación en su crecimiento; es en esta fase donde se llevan a cabo el mayor número de cambios en la fisiología y los mecanismos biológicos de las células, puesto que el microorganismo dirige el aprovechamiento de la energía en la inducción y síntesis enzi-

FIGURA 11



TIEMPO

FASE	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO
1. Lag	0
2. Aceleración	incremento
3. Logarítmica	constante y máxima
4. Retardamiento	disminuye
5. Estacionaria	0
6. Muerte	negativa

CURVA TIPICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

mática necesaria para la replicación.

El aumento gradual en el número de células indica el inicio de la fase de ACELERACION que culmina cuando se alcanza la máxima velocidad de crecimiento permitida por las condiciones ambientales. Al intervalo que permanece constante dicha velocidad, se denomina fase de crecimiento LOGARITMICO O EXPONENCIAL. Una declinación gradual del crecimiento es indicio de que las condiciones se tornan desfavorables; en esta fase llamada de RETARDAMIENTO, los nutrientes se empiezan a agotar o hay acumulación de productos tóxicos del metabolismo del propio organismo o bien ambos efectos se conjugan. Esto conduce a una fase ESTACIONARIA de nulo crecimiento, culminando en la fase de MUERTE CELULAR si las condiciones inhibitorias persisten.

Es evidente que en términos de productividad de biomasa - el interés se centra en el período de máximo crecimiento el cual se presenta en la fase LOG, sin embargo no siempre es así especialmente cuando el objetivo es obtener algún metabolito en particular.

En uno u otro caso, el factor más importante es la productividad y el propósito inicial es alcanzar un número suficiente de células, lo que se logra durante la fase exponencial en la cual el crecimiento constante permite deducir que, la razón de cambio de la concentración celular es directamente proporcional a la concentración celular y que puede representarse como:

$$\frac{dx}{dt} = \alpha x \quad (19)$$

Introduciendo una constante de proporcionalidad:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (20)$$

en donde:

x = Concentración celular (g/l)

t = Tiempo (h)

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

Rearreglando la ecuación 20 se tiene:

$$\mu dt = \frac{dx}{x} \quad (21)$$

Integrando la ecuación, poniendo como límites desde un tiempo cero hasta "t" y la concentración celular desde " x_1 " hasta " x_2 ":

$$\int_0^t \mu dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} \quad (22)$$

lo que nos da:

$$\mu t = \ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right) \quad (23)$$

Despejando x_2 , que es la concentración celular a un tiempo "t" y tomando antilogarítmicos:

$$x_2 = x_1 e^{\mu t} \quad (24)$$

En el caso particular donde un microorganismo emplea un determinado tiempo en duplicar su masa celular, o sea:

$$x_2 = 2x_1 \quad (25)$$

Es posible calcular su tiempo de duplicación t_d sustituyendo en (23), si $t_d = t$ y $x_2 = 2x_1$:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (26)$$

Esto implica que, conociendo la velocidad de crecimiento y la concentración inicial de células, se puede predecir el comportamiento del microorganismo a un tiempo "t", siempre y cuando el crecimiento se encuentre en la fase exponencial.

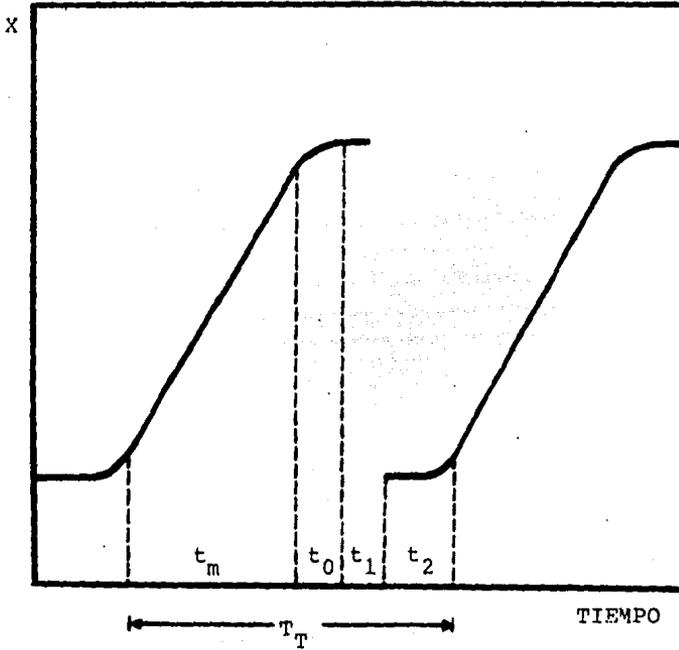
Considerando que en un cultivo por lote se llevan a cabo las etapas mostradas en la figura 12, tenemos:

$$T_T = t_0 + t_1 + t_2 + t_m \quad (27)$$

donde:

T_T = Tiempo total

F I G U R A 12



t_2 = Tiempo de duración de la fase lag

t_m = Tiempo empleado en el crecimiento logarítmico

t_0 = Tiempo de la fase de declinación y/o muerte

t_1 = Tiempo de preparación de un lote nuevo

T_T = Tiempo total

TIEMPO TOTAL DE UN CICLO DE CULTIVO POR LOTE

t_0 = Tiempo de declinación y/o muerte

t_1 = Tiempo de preparación

t_2 = Tiempo de duración de la fase Lag

t_m = Tiempo empleado en el crecimiento logarítmico

De la ecuación 23 tenemos que:

$$t_m = \frac{1}{\mu} \ln \left(\frac{x_m}{x_1} \right) \quad (28)$$

Por lo que:

$$T_T = \frac{1}{\mu} \ln \left(\frac{x_m}{x_1} \right) + T \quad (29)$$

donde:

x_m = Concentración máxima celular (g/l)

x_1 = Concentración celular inicial (g/l)

$T = t_0 + t_1 + t_2$

T_T involucra todas las fases de la cinética.

La productividad expresada como la producción en un tiempo determinado puede aplicarse al cultivo por lote:

$$p = \frac{x}{T_T} = \frac{x_m - x_1}{T_T} \quad (30)$$

Como:

$$Y_{x/s} = \frac{x_m - x_1}{S_0 - S} \quad (31)$$

en donde:

- $Y_{x/s}$ = Rendimiento en base a sustrato (g/g)
- S_0 = Concentración inicial de sustrato (g/l)
- S = Concentración final de sustrato (g/l)

Sustituyendo (31) en (29) y (30):

$$p = \frac{Y_{x/s} (S_0 - S)}{\frac{1}{\mu} \ln \left(\frac{x_m}{x_1} \right) + T} \quad (32)$$

que es la ecuación que nos permite calcular la productividad para biomasa en un cultivo por lote.

Análogamente:

$$Y_{p/s} = \frac{p_m - p_1}{S_0 - S} \quad (33)$$

donde:

- $Y_{p/s}$ = Rendimiento de producto en base a sustrato (g/g)
- p_m = Concentración máxima de producto (g/l)
- p_1 = Concentración inicial de producto (g/l)

y:

$$p' = \frac{Y_{p/s} (S_0 - S)}{\frac{1}{\beta} \ln \left(\frac{P_m}{P_1} \right) + \tau} \quad (34)$$

donde:

p' = Productividad del producto (g/l·h)

β = Velocidad específica de producción de etanol (h^{-1})

que es la ecuación que nos permite calcular la productividad de etanol en un cultivo por lote.

En un cultivo por lote donde la utilización de sustrato se traduce en la producción celular y en la formación de producto, tenemos que, el balance de materia para sustrato conduce a la expresión siguiente:

$$\frac{ds}{dt} = - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} - \frac{Q_p x}{Y_{p/s}} \quad (35)$$

donde:

Q_p = Velocidad de formación de producto (g/g·h)

En el presente caso, la ecuación de balance de materia sobre el producto es la que más interesa, puesto que es más importante la generación de producto y no la biomasa.

Integrando (35) y despejando "t" se tiene que:

$$t = \frac{s}{-\frac{\mu x}{Y_{x/s}} - \frac{Q_p x}{Y_{p/s}}} \quad (36)$$

De la ecuación 23 se tiene:

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right) \quad (37)$$

Sustituyendo en (37):

$$\mu = \frac{1}{s} \ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right) \quad (38)$$
$$-\frac{\mu x}{Y_{x/s}} - \frac{Q_p x}{Y_{p/s}}$$

Rearreglando queda que:

$$\frac{-\frac{\mu x_2}{Y_{x/s}} - \frac{Q_p x_2}{Y_{p/s}}}{s} = \frac{\mu}{\ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)} \quad (39)$$

y:

$$-\frac{\mu x_2}{Y_{x/s}} - \frac{Q_p x_2}{Y_{p/s}} = \frac{\mu s}{\ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)} \quad (40)$$

$$\frac{Q_p x_2}{Y_{p/s}} = - \frac{\mu s}{\ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)} - \frac{\mu x_2}{Y_{x/s}} \quad (41)$$

Despejando Q_p :

$$Q_p = \frac{Y_{p/s} \left(- \frac{\mu s}{\ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)} - \frac{\mu x_2}{Y_{x/s}} \right)}{x_2} \quad (42)$$

y factorizando:

$$Q_p = \frac{Y_{p/s} \mu \left(- \frac{s}{\ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)} - \frac{x_2}{Y_{x/s}} \right)}{x_2}$$

lo que finalmente queda:

$$Q_p = Y_{p/s} \mu \left(- \frac{s}{x_2 \ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)} - \frac{1}{Y_{x/s}} \right) \quad (44)$$

que es una ecuación que nos permite calcular la formación de - producto para una fermentación de tipo batch.

2.- DETERMINACION DE ETANOL POR EL METODO DEL DICROMATO DE POTASIO. La determinación de etanol se llevó a cabo mediante la titulación del Dicromato de potasio no reducido por el etanol presente en la muestra, de acuerdo a como se muestra a continuación:



El dicromato remanente se cuantificó con una solución de Sulfato ferroso amoniacal 0.1N en medio ácido:



Tal procedimiento consistió en colocar 5ml de Dicromato de potasio 0.4N para muestras conteniendo no menos de 3% de etanol, en un matraz erlenmeyer de 250ml; posteriormente se diluyó con 30ml de agua destilada. Esta dilución se enfrió en un baño de hielo hasta que su temperatura alcanzó los 4°C aproximadamente. Se agregaron cuidadosamente 30ml de Acido sulfúrico concentrado, de manera que la mezcla no se proyectara. Cuando la temperatura descendió a 25°C aproximadamente, se procedió a agregar 1ml de la muestra titulando el Dicromato de potasio remanente con una solución de Sulfato ferroso amoniacal 0.1N usando 2 gotas de indicador de ferroín. El vire fué de azul verde a café rojizo.

Cada muestra se tituló por triplicado usando un blanco -- sustituyendo la muestra con agua destilada.

Preparación de la muestra. Se tomaron 30ml del medio de fermentación y se centrifugó a 5000rpm durante 5min. Del sobrenadante libre de células se tomaron exactamente 25ml y se colocaron en un matraz balón de 50ml. Utilizando un equipo Quick fit se llevó a cabo una destilación simple hasta que se obtuvieron aproximadamente 10ml del destilado. Enseguida se procedió a aforar el volumen del destilado hasta 25ml con agua destilada cuidando de arrastrar los residuos del destilado que aún quedaban en el colector.

Cálculos.

El cálculo del etanol se efectuó en % (p/v).

$$\% \text{ etanol} = \{ (ND \times \text{mlDM}) - (NSF \times \text{mlSFM}) \} \times \text{PEQE} \times 10$$

Donde:

$$NSF = (\text{mlDE} \times ND) / \text{mlSFB}$$

ND = Normalidad del Dicromato de potasio

mlDM = ml de Dicromato de potasio utilizados
en la muestra

NSF = Normalidad del Sulfato ferroso amoniacal

mlSFM = ml de Sulfato ferroso amoniacal gastados
en la muestra

PEQE = Peso equivalente del etanol

mlDB = ml de Dicromato de potasio utilizados
en el blanco

mlSFB = ml de Sulfato ferroso amoniacal gastados
en el blanco

3.- EXPERIMENTOS EN MATRACES. Considerando que se pretende tener la máxima concentración inicial posible en cuanto a sustrato, sin que exista una inhibición significativa de la fermentación y que además ocurrirá una disminución de dicha concentración al agregar el inóculo, se optó por utilizar una concentración máxima de azúcares en el medio de cultivo.

Por otro lado, el uso de altas concentraciones de azúcar, implica de acuerdo con la tabla de diseño del medio, el empleo de una concentración alta de sales, lo que da como resultado, una elevación de la presión osmótica del medio, que puede afectar el metabolismo celular y reflejarse en la actividad fermentativa.

Con el objeto de medir el efecto de las concentraciones de azúcares y sales sobre la producción de etanol, se desarrolló una serie de fermentaciones en matraces erlenmeyer. Para esto se prepararon 14 combinaciones diferentes de azúcares y sales de acuerdo a como se muestra en la tabla 9, cada una por triplicado, en matraces erlenmeyer de 500ml de capacidad, conteniendo 100ml de medio melaza. Partiendo de la cepa conservada en refrigeración e incubada a 30°C por 24hs, se procedió a resuspender el crecimiento de un tubo inclinado transfiriéndolo a un matraz erlenmeyer de 500ml de capacidad el cual contenía 100ml de medio al 4% de azúcares y la concentración de sales equivalente de acuerdo al diseño del medio. Esta siembra se mantuvo en agitación por 24hs a 150rpm y 30°C.

Los matraces de la serie se inocularon con 4ml de la siembra sometándose a incubación (Environ Shaker mod. 3597-2to8)

3.- EXPERIMENTOS EN MATRACES. Considerando que se pretende tener la máxima concentración inicial posible en cuanto a sustrato, sin que exista una inhibición significativa de la fermentación y que además ocurrirá una disminución de dicha concentración al agregar el inóculo, se optó por utilizar una concentración máxima de azúcares en el medio de cultivo.

Por otro lado, el uso de altas concentraciones de azúcar, implica de acuerdo con la tabla de diseño del medio, el empleo de una concentración alta de sales, lo que da como resultado, una elevación de la presión osmótica del medio, que puede afectar el metabolismo celular y reflejarse en la actividad fermentativa.

Con el objeto de medir el efecto de las concentraciones de azúcares y sales sobre la producción de etanol, se desarrolló una serie de fermentaciones en matraces erlenmeyer. Para esto se prepararon 14 combinaciones diferentes de azúcares y sales de acuerdo a como se muestra en la tabla 9, cada una por triplicado, en matraces erlenmeyer de 500ml de capacidad, conteniendo 100ml de medio melaza. Partiendo de la cepa conservada en refrigeración e incubada a 30°C por 24hs, se procedió a resuspender el crecimiento de un tubo inclinado transfiriéndolo a un matraz erlenmeyer de 500ml de capacidad el cual contenía 100ml de medio al 4% de azúcares y la concentración de sales equivalente de acuerdo al diseño del medio. Esta siembra se mantuvo en agitación por 24hs a 150rpm y 30°C.

Los matraces de la serie se inocularon con 4ml de la siembra sometiéndose a incubación (Environ Shaker mod. 3597-2to8)

T A B L A 9

EFECTO DE LAS SALES EN LA FERMENTACION

Combinación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
% Azúcar	4	4	4	4	8	12	16	8	12	16	4	8	12	16
Conc. sales (expresada como se equiv. en conc. azú- car (%))	4	8	12	16	8	12	16	4	4	4	2	2	2	2

durante 24hs a 30°C y 150rpm. Los parámetros de control establecidos fueron concentración de azúcares, concentración de etanol y número de células.

4.- DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO (K_{la}) DEL FERMENTADOR EN FUNCION DE LA AGITACION Y FLUJO DE AI RE. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de termina la capacidad máxima de un fermentador para suministrar oxígeno al sistema. Esto nos permite establecer la carga microbiana máxima en un cultivo donde la concentración de oxígeno - pudiera ser limitante.

Por ello, la importancia de la transferencia de oxígeno - reside en el hecho de que ésta debe ser por lo menos igual a - la demanda de oxígeno por parte de los microorganismos, princi palmente cuando estos crecen a una velocidad elevada (1).

Para la determinación del K_{la} se emplean varios métodos, entre los cuales se puede mencionar el método por oxidación de Sulfito de sodio.

El método consiste en simular una fermentación midiendo - la razón de consumo de oxígeno en una solución de Sulfito de - sodio conteniendo un ión catalizador adecuado (Co²⁺ o Cu²⁺).

Para ello se colocaron 5 litros de agua en el fermentador manteniendo la temperatura a 30°C y se adicionó Cloruro de cobalto como catalizador. Posteriormente, se aereó el fermentador hasta alcanzar la concentración de saturación ajustando el graficador a 100%, inmediatamente después se agregaron 12g de Sulfito de sodio dejando de aerear para permitir el consumo de

oxígeno disuelto en el agua, de acuerdo a la siguiente reacción:



Obteniendo la mínima concentración de oxígeno, se procedió a aerear el fermentador empleando diferentes valores de agitación y aereación mostrados en la tabla 10.

Tomando como $t = 0$ al momento de iniciar la agitación y aereación, se midió la concentración de oxígeno con un electrodo de oxígeno disuelto acoplado a un analizador de oxígeno (modelo No. 81 de NBS) cada 10 segundos.

Partiendo de la ecuación:

$$\frac{d\text{O}_2}{dt} = K_1 a (C^* - C) \quad (45)$$

y si en la determinación de $\frac{d\text{O}_2}{dt}$, $C = 0$ entonces:

$$K_1 a = \frac{\frac{d\text{O}_2}{dt}}{C^*} \quad (46)$$

T A B L A 10

VALORES DE AEREACION Y AGITACION EMPLEADOS
EN LA DETERMINACION DE K_{La}

Agitación (rpm)	Aereación (l/min)
200	0.0
400	0.0
600	0.0
800	0.0
1000	0.0
200	0.4
400	0.4
600	0.4
800	0.4
1000	0.4
200	0.8
400	0.8
600	0.8
800	0.8
1000	0.8
200	1.2
400	1.2
600	1.2
800	1.2
1000	1.2
200	1.6
400	1.6
600	1.6
800	1.6
1000	1.6

Donde:

C^* = Concentración de oxígeno en el agua en la ciudad de México a 30°C (dato obtenido en Tablas)

5.852mg/l

$\frac{dO_2}{dt}$ = Pendiente inicial de la gráfica de oxígeno no disuelto contra tiempo (m)

Por lo tanto:

$$Kla = \frac{m}{5.852} \text{ hr}^{-1} \quad (47)$$

5.- MONTAJE Y OPERACION DE LAS FERMENTACIONES. Con objeto de mantener un control estricto sobre las condiciones de crecimiento, se realizaron las fermentaciones en un equipo de fermentaciones de tipo automático con controles integrados y una capacidad del vaso de 141 (New Brunswick Scientific Co. USA).

El equipo está compuesto por un reactor de vidrio Pyrex con tapas superior e inferior de acero inoxidable. Los parámetros ambientales de importancia que son registrados por el fermentador son pH, temperatura, velocidad de agitación, velocidad de aereación y nivel de espuma.

A excepción del sistema de agitación, todas las entradas

y salidas del reactor están dispuestas en la tapa superior del mismo como se muestra en la figura 13. El equipo adicional es de las siguientes características:

Control de pH.- El registro del pH en el fermentador se efectúa por medio de un electrodo de pH esterilizable por calor húmedo el cual se conecta a un controlador de pH que tiene empujadas 2 bombas peristálticas para suministro de base o ácido. La velocidad de adición puede ser regulada automática o manualmente por medio de controles. El pHmetro cuenta con graficador integrado.

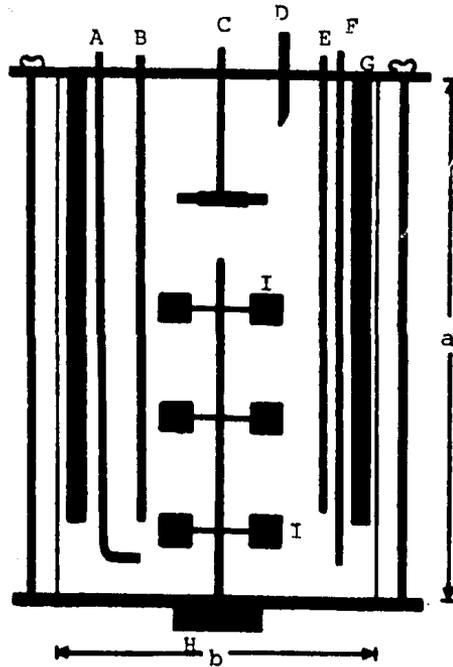
Temperatura.- Un sensor de temperatura (termistor) introducido en un tubo sellado y sumergido en el medio de fermentación, registra la temperatura, la cual es regulada automáticamente mediante circulación de agua fría o caliente y determinada por el selector de temperatura. Un graficador integrado al panel permite detectar las posibles fluctuaciones en el sistema.

Velocidad de agitación.- El sistema de agitación en el reactor consta de tres turbinas de paletas planas soportadas en una columna giratoria la cual se acopla a una base externa situada en el panel. La velocidad de agitación puede ser variada desde 0 hasta 1000rpm por medio de un control situado en el panel.

Velocidad de aereación.- El suministro de aire se realiza por medio de una bomba de 1/4 de caballo de potencia. El flujo es controlado por un rotámetro incluido en el equipo. El dispositivo cuenta con filtros de aire esterilizables por calor húmedo.

Nivel de espuma.- La espuma puede ser controlada por dos meca-

FIGURA 13



ACCESORIOS

- A. Suministro de aire
- B. Control de temperatura
- C. Sistema antiespumante
- D. Venteo
- E. Electrodo de pH
- F. Toma de muestra
- G. Circulación de agua
- H. Sistema de agitación
- I. Impulsores

DIMENSIONES

- a. Altura del tanque
- b. Ancho del tanque

ESQUEMA DEL FERMENTADOR UTILIZADO

nismos ya sea por medio de un rompedor mecánico o inyectando - antiespumante con una bomba dosificadora, la cual actúa en respusta a un detector de espuma. En este caso, cuando la espuma alcanza un nivel preestablecido se cierra un circuito entre -- dos electrodos lo que produce la señal.

Oxígeno disuelto.- El equipo cuenta con un electrodo de oxígeno el cual mide la concentración de oxígeno que es registrada y graficada en un módulo conectado al fermentador. El control del nivel de oxígeno disuelto en el fermentador puede ser regulado modificando las velocidades de agitación y de aereación.

Todos los experimentos en lote se realizaron siguiendo la misma metodología a excepción de las variables sujetas a estudio (Velocidad de agitación, velocidad de aereación y composición de medio) las cuales se reportan en el cuadro de resultados respectivo.

Con el vaso del fermentador lavado con agua destilada y - secado con calor, se procedió a cerrar las entradas y salidas con sus respectivas conexiones que fueron esterilizadas previamente por calor húmedo. Colocado el vaso en ambiente estéril - se vaciaron 5 litros de medio estéril al 16% de azúcares ajustados a un pH de 5; a continuación se agregó 1 litro de inóculo previa incubación por 24hs. Posteriormente se montó el reactor sobre la base del panel, efectuando las conexiones necesarias a sus respectivos controles. Después de una agitación a - 200rpm por 3-5min a efecto de obtener un mezclado homogéneo se procedió a tomar la primera muestra (muestra inicial) e inmediatamente se fijaron las condiciones de fermentación.

Puesto que el metabolismo de la levadura tiende a acidificar el medio con la consiguiente baja del pH, solo hubo necesidad de preparar y conectar el suministro de álcali estéril -- (NaOH 1N) para mantener el valor de pH constante.

No se consideró necesario efectuar una esterilización total de los componentes del fermentador debido a las características de crecimiento del microorganismo, sobre todo al tiempo de duplicación relativamente corto.

A partir del inicio de la fermentación se hicieron tomas de muestra en lapsos de 1 a 4hs dependiendo del comportamiento de la cinética y en base a experiencias anteriores. Las tomas de 40-50ml se hicieron aprovechando la presión producida por el cierre de la salida de aire. Las muestras sujetas a análisis fueron tratadas de la siguiente manera:

Una parte de cada muestra (1ml) se destinó a conteo celular, otra fracción de 40ml fué sometida a centrifugación durante 5min a 4000rpm para analizar azúcares en el sobrenadante. La fracción restante fué destilada en un equipo Quick fit para destilación simple, determinando posteriormente la concentración de etanol en el destilado.

6.- EFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION. Con el objeto de evaluar las variaciones en cuanto a la producción de etanol, aprovechamiento de sustrato y crecimiento celular, en función de la agitación y aereación en cultivos por lote, se planearon los experimentos en fermentador de la siguiente manera:

Se fijaron y mantuvieron constantes en todas las fermentaciones los siguientes parámetros:

pH = 5

T = 30°C

vol. de medio = 5 litros

vol. de inóculo = 1 litro

1a. Fermentación.- Esta se desarrolló en condiciones aerobias durante toda la cinética, empleando una velocidad de agitación de 200rpm y una aereación de 0.4 l/mfn.

2a. Fermentación.- Se realizó utilizando las mismas condiciones, efectuando un cese total de la aereación y una disminución de la agitación a 50rpm al término de la fase LOG.

3a. Fermentación.- Manteniéndose las mismas condiciones del inicio de la la. fermentación, en ésta cinética se interrumpió el suministro de aire aproximadamente a la mitad de la fase LOG, manteniéndose la velocidad de agitación a 50rpm.

4a. Fermentación.- En esta fermentación se mantuvieron constantes las condiciones de la cinética inicial hasta el inicio de la fase LOG, donde se interrumpió el flujo de aire y se mantuvo la agitación a 50rpm, por el resto de la cinética.

5a. Fermentación.- Finalmente se llevó a cabo una cinética sin suministro de aire y una agitación de 50rpm a lo largo de la fermentación.

7.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE VINAZA EN LA FERMENTACION AL

COHOLICA. Para evaluar la posibilidad del reuso de vinaza como componente del medio de cultivo en la producción de alcohol se partió de la composición elemental de vinaza (tabla 11) y los requerimientos nutricionales de la levadura detallados en la tabla 6. Dicha comparación nos permitió establecer que, el suministro de nutrientes provenientes de la vinaza cubriría el 12% de los requerimientos nutricionales teóricos (ver Tabla de composición de sales del medio), siendo el Nitrógeno y el Fósforo los elementos limitantes.

Para determinar el efecto al cambiar la composición original del medio utilizando vinaza se procedió a realizar una serie de fermentaciones empleando proporciones diferentes de vinaza, completando en su caso, con agua destilada para ajustar la concentración establecida de azúcares.

Durante el desarrollo de las fermentaciones se mantuvieron constantes los siguientes parámetros:

pH = 5

T = 30°C

aereación = 0.0 l/min

agitación = 50rpm

vol. de medio = 5 litros

vol. de inóculo = 1 litro

1a. Fermentación con vinaza.- En esta fermentación se sustituyó completamente el agua de dilución del medio por vinaza (100% de vinaza y 0% de agua).

T A B L A 11

COMPOSICION DE VINAZA SIN CONCENTRAR

Humedad	92%
Cenizas	5.6%
Mat. Orgánica	5.04%
Lignina	0.006%
Nitrógeno total (Kjeldahl)	0.08%
Azúcares reductores	0.18%
pH	4.3
Sulfatos	0.86%
Fosfatos	0.02%
Magnesio	0.4055%
Potasio	0.3535%
Calcio	0.2482%

2a. Fermentación con vinaza.- Se desarrollo sustituyendo por -
vinaza un 66.6% del agua de dilución del medio.

3a. Fermentación con vinaza.- En esta fermentación se empleó -
un 33.3% de vinaza y 66.6% de agua para diluir el medio de cul-
tivo.

R E S U L T A D O S

EXPERIMENTOS DE RESPIRACION, El efecto de la concentración de azúcar y etanol se presenta en la tabla 12, tabla 13 y en la figura 14.

T A B L A 12

VELOCIDAD ABSOLUTA DE FERMENTACION (Q_{CO_2}). PRODUCCION DE CO_2 -
EN $\mu l_{gas}/cel \cdot h \times 10^{-7}$ PARA LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE E-
TANOL Y AZUCAR PROBADAS

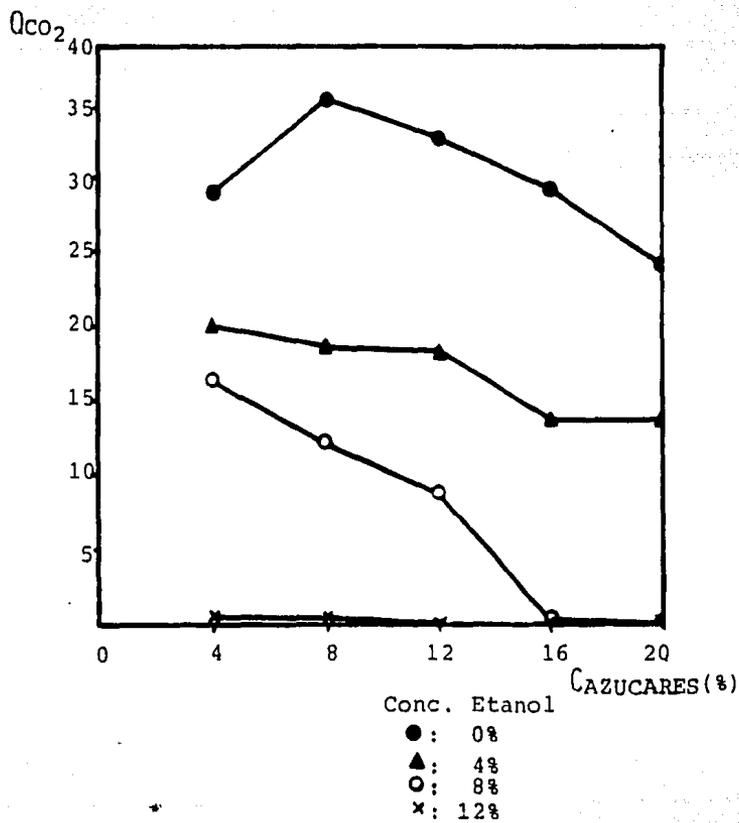
Concentración de etanol (%)	Concentración de azúcar (%)				
	4	8	12	16	20
0	29.12	35.43	32.81	29.40	24.32
4	19.00	18.70	18.59	13.74	13.83
8	16.38	12.44	8.94	0.36	0.00
12	0.53	0.53	0.00	0.00	0.00

T A B L A 13

VELOCIDAD RELATIVA DE FERMENTACION. (EXPRESADA COMO UN PORCENTAJE DE LA VELOCIDAD MAXIMA OBTENIDA A UNA CONCENTRACION DE AZUCAR DE 8% Y UNA CONCENTRACION DE ESTANOL DE 0%)

Concentración de etanol (%)	Concentración de azúcar (%)				
	4	8	12	16	20
0	82	100	93	83	69
4	56	53	52	39	39
8	46	35	25	1	0
12	1	1	0	0	0

FIGURA 14



EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE ETANOL
Y AZUCARES SOBRE LA VELOCIDAD ABSOLUTA DE
FERMENTACION, Q_{CO_2} (ul gas/cel.h $\times 10^{-7}$)

EXPERIMENTOS EN MATRACES. Los resultados del efecto de la concentración de sales en la producción de etanol y el crecimiento celular se resumen en las tablas 14 y 15 y se representan en las figuras 15, 16, 17, 18 y 19.

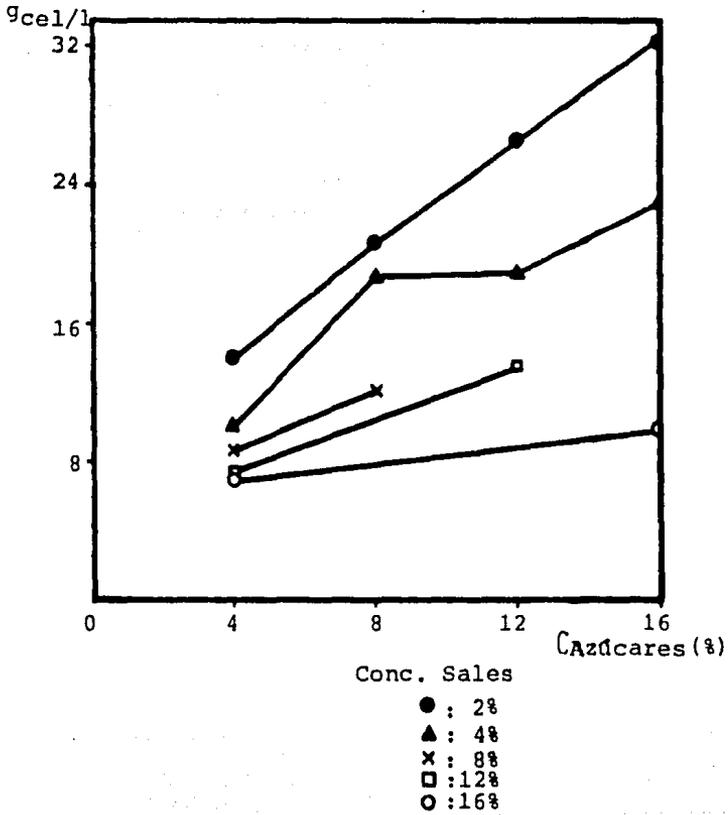
T A B L A 14

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES A VARIAS CONCENTRACIONES -
DE AZUCARES SOBRE LA PRODUCCION DE ETANOL Y CELULAS

Combinación No.	Conc. Az. (%)	Conc. Sales (%) [*]	Conc. Cels. g _{cel} /l	Etanol (%)
1	4	4	9.90	0.96
2	4	8	8.68	1.07
3	4	12	7.41	1.00
4	4	16	6.82	1.00
5	8	8	11.95	1.77
6	12	12	13.36	2.66
7	16	16	9.68	3.64
8	8	4	18.64	1.62
9	12	4	19.04	2.17
10	16	4	22.95	3.01
11	4	2	14.04	0.83
12	8	2	20.54	2.17
13	12	2	26.45	3.23
14	16	2	32.18	3.17

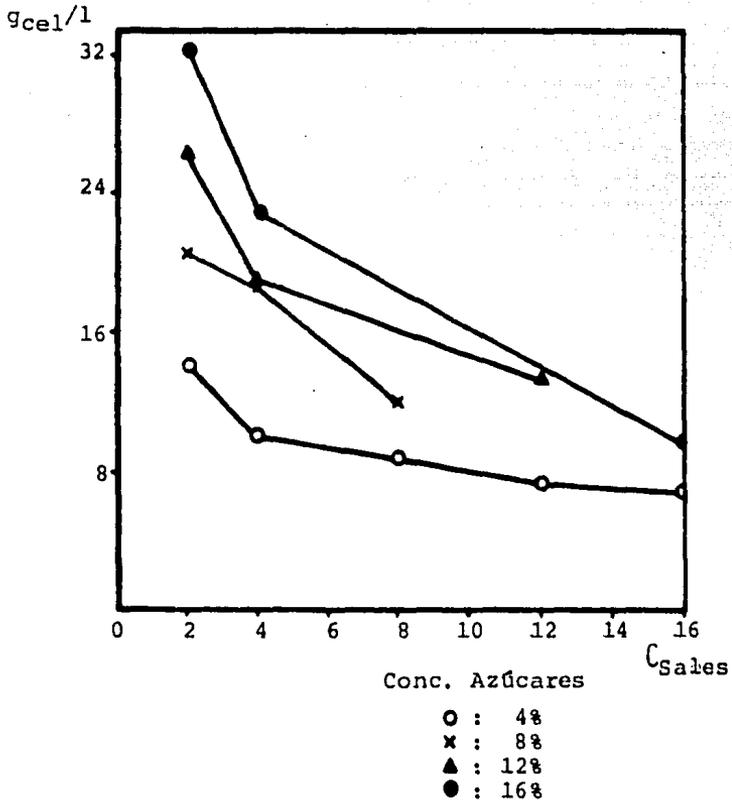
* Concentración de sales expresada como su equivalente en concentración de azúcar (%), de acuerdo al diseño del medio ya descrito.

FIGURA 15



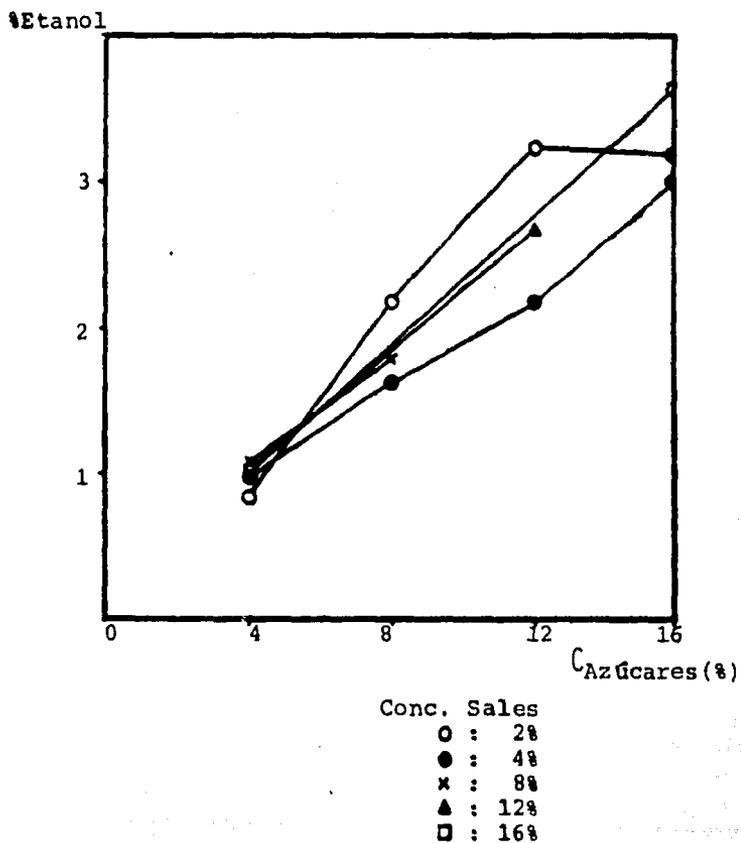
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES SOBRE
LA PRODUCCION CELULAR, A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE SALES

F I G U R A 16



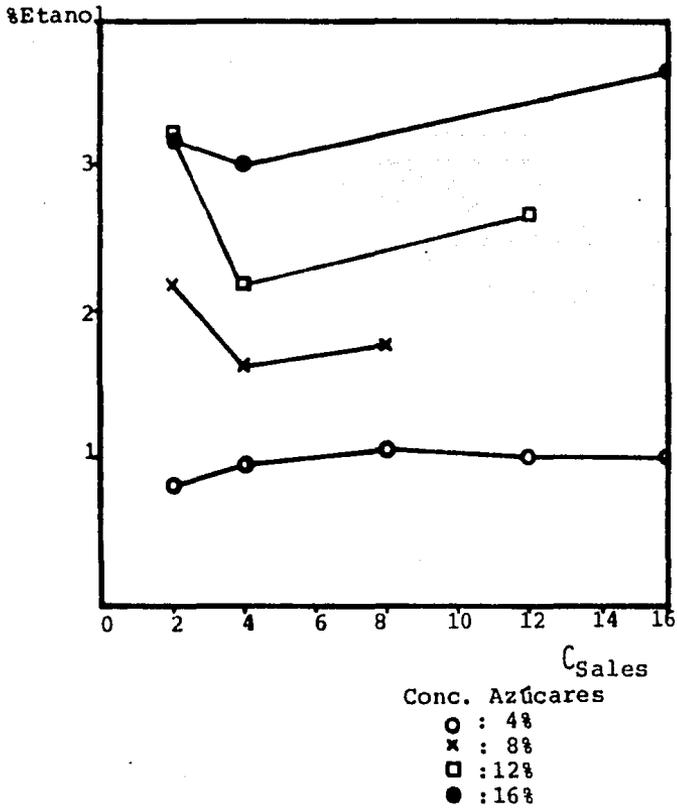
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES SOBRE
LA PRODUCCION CELULAR A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE AZUCARES

FIGURA 17



EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES SOBRE
LA PRODUCCION DE ETANOL UTILIZANDO
VARIAS CONCENTRACIONES DE SALES

FIGURA 18



EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES SOBRE
LA PRODUCCION DE ETANOL UTILIZANDO
VARIAS CONCENTRACIONES DE AZUCARES

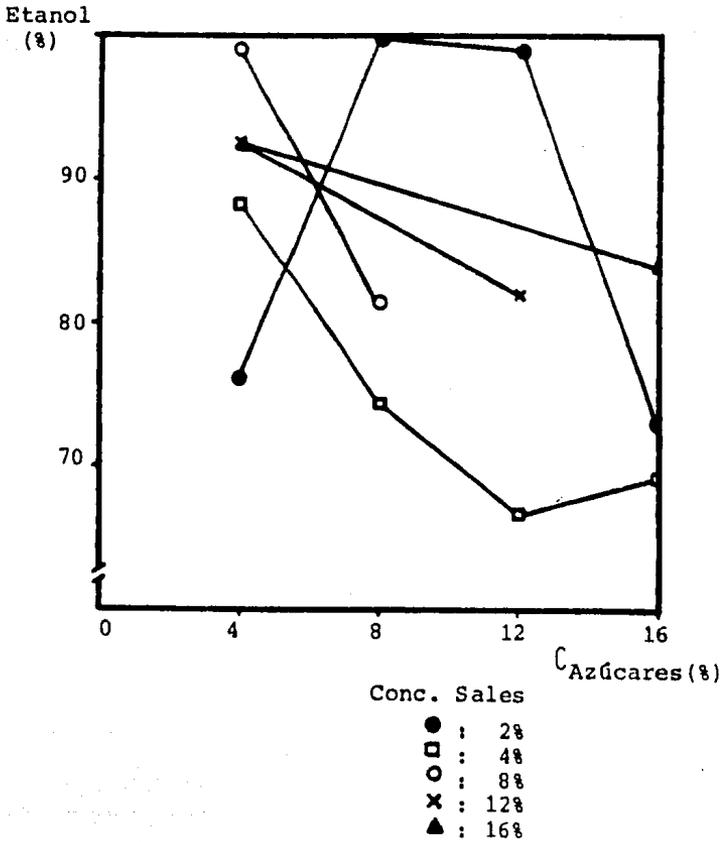
T A B L A 15

PRODUCCION RELATIVA DE ETANOL EXPRESADA COMO UN PORCENTAJE DEL RENDIMIENTO MAXIMO OBTENIDO A UNA CONCENTRACION DE AZUCARES DE 8% Y UNA CONCENTRACION DE SALES DE 2% *

Combinación No.	Conc. Azúcares (%)	Conc. Sales (%) *	Prod. Etanol (%)
1	4	4	88.20
2	4	8	98.91
3	4	12	92.47
4	4	16	92.47
5	8	8	81.41
6	12	12	81.67
7	16	16	83.84
8	8	4	74.38
9	12	4	66.66
10	16	4	69.24
11	4	2	76.24
12	8	2	100.00
13	12	2	99.13
14	16	2	72.90

* Concentración de sales expresada como su equivalente en concentración de azúcar (%), de acuerdo al diseño del medio ya descrito.

F I G U R A 19



PRODUCCION RELATIVA DE ETANOL, EXPRESADA COMO EL PORCENTAJE DEL RENDIMIENTO MAXIMO OBTENIDO (A UNA CONCENTRACION DE AZUCAR DE 8% Y UNA CONCENTRACION DE SALES DE 2%) CONTRA CONCENTRACION DE AZUCARES

DETERMINACION DE K_{LA}.

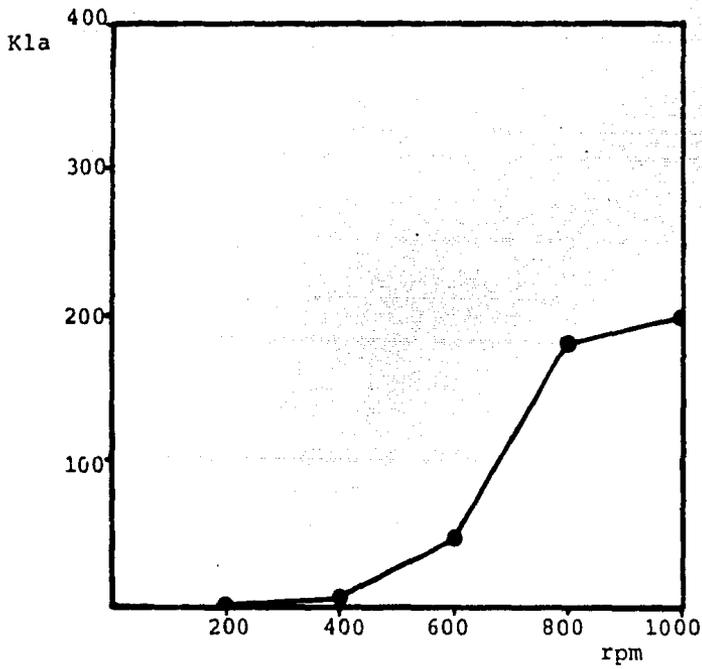
Los valores de K_{La} obtenidos se muestran en la tabla 16 y las figuras 20, 21, 22, 23, 24 y 25.

T A B L A 16

COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO (K_{La})
EN FUNCION DE LA AGITACION Y LA AEREACION

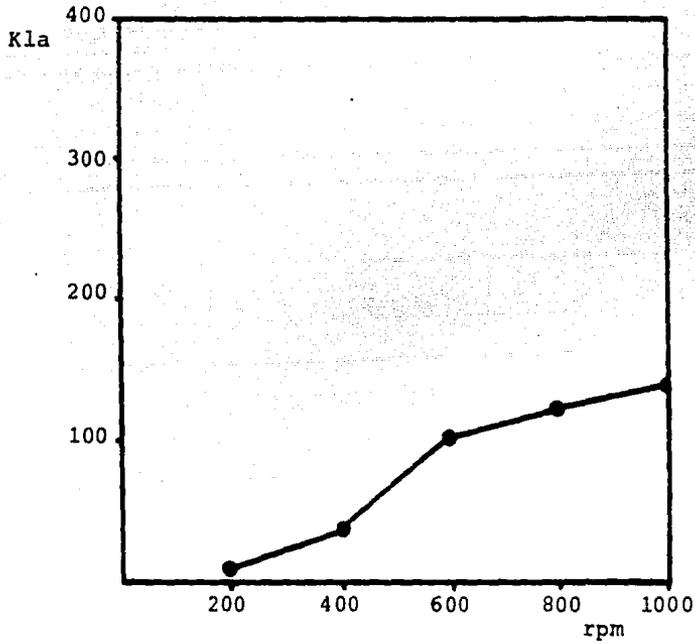
Agitación (rpm)	Aereación (l/min)	$\frac{dO_2}{dt}$ (mg/l·h)	K _{La} (h ⁻¹)
200	0.0	8.42	1.44
400	0.0	35.60	6.08
600	0.0	273.87	46.80
800	0.0	1053.36	180.00
1000	0.0	1155.96	197.53
200	0.4	49.08	8.39
400	0.4	212.15	36.25
600	0.4	598.52	102.28
800	0.4	714.39	122.08
1000	0.4	815.30	139.32
200	0.8	69.10	11.81
400	0.8	253.08	43.23
600	0.8	566.92	96.88
800	0.8	832.57	142.27
1000	0.8	2106.72	360.00
200	1.2	69.10	11.81
400	1.2	263.34	45.00
600	1.2	638.75	109.15
800	1.2	1053.36	180.00
1000	1.2	2106.72	360.00
200	1.6	70.15	11.99
400	1.6	265.02	45.29
600	1.6	610.95	104.40
800	1.6	1122.88	191.88
1000	1.6	1264.03	216.00

FIGURA 20



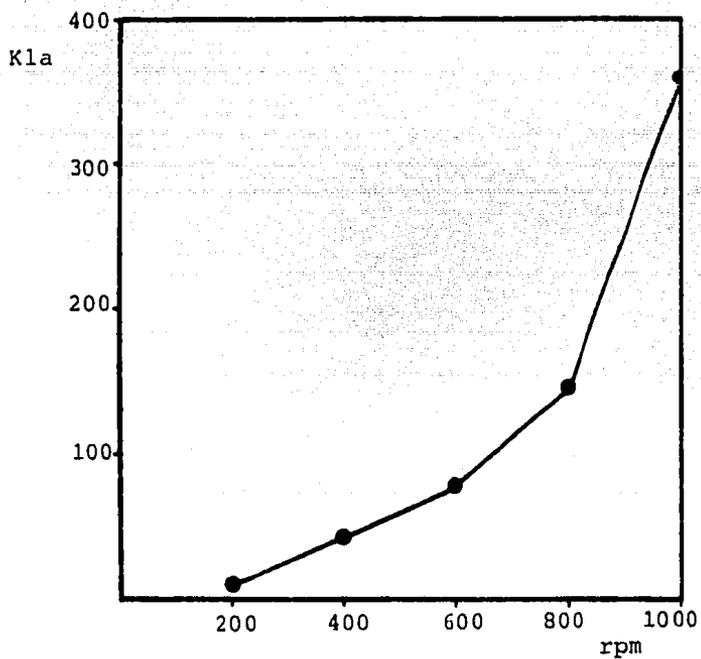
COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
CONTRA AGITACION, SIN AEREACION

FIGURA 21



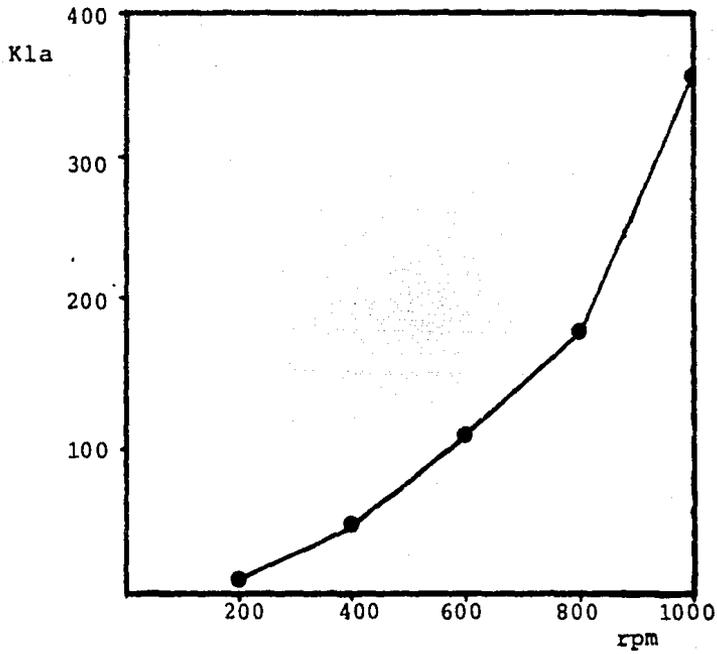
COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
CONTRA AGITACION, CON AERACION
DE 0.4 l/min

FIGURA 22



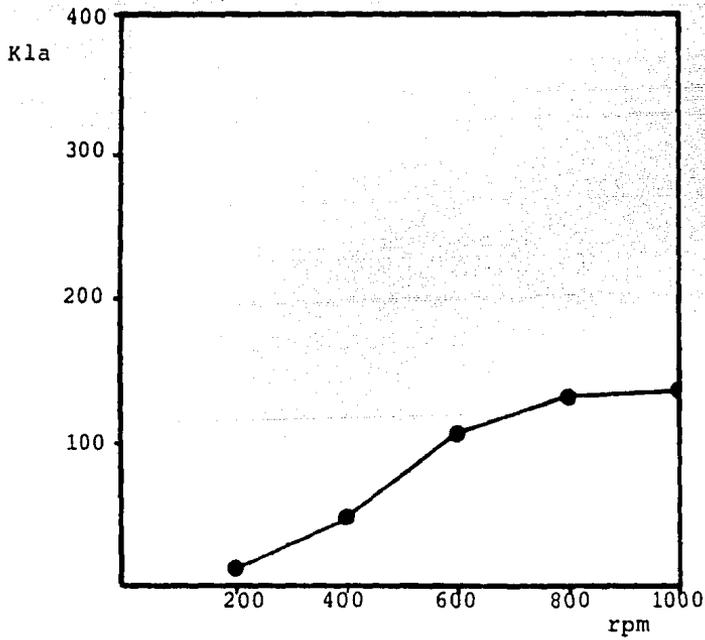
COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
CONTRA AGITACION, CON AEREACION
DE 0.8 l/min

FIGURA 23



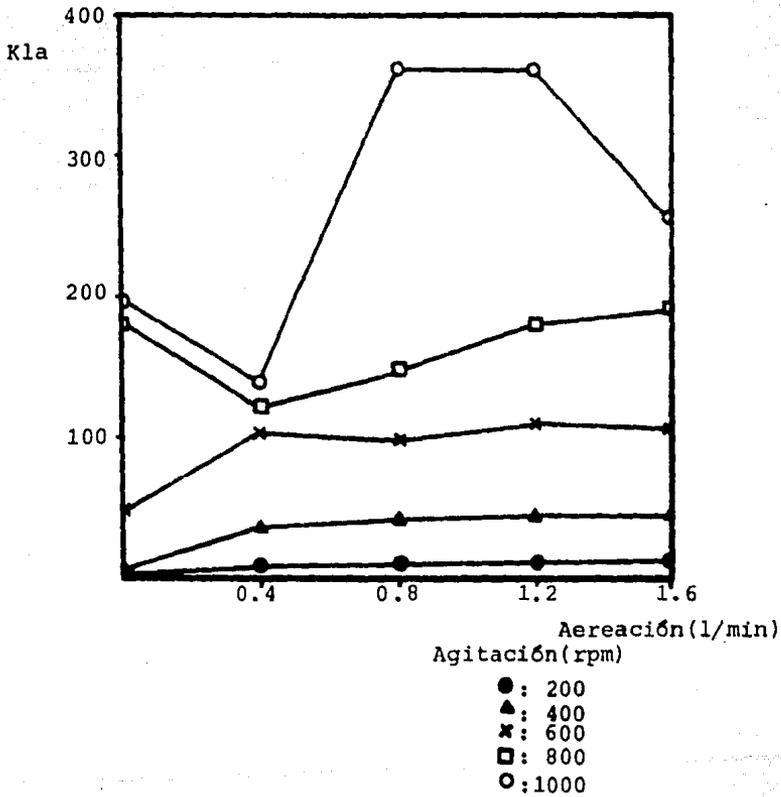
COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
CONTRA AGITACION, CON AEREACION
DE 1.2 l/min

FIGURA 24



COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
CONTRA AGITACION, CON AEREACION
DE 1.6 l/min

FIGURA 25



COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
EN FUNCION DE LA AEREACION, A DIFERENTES
NIVELES DE AGITACION

EFFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

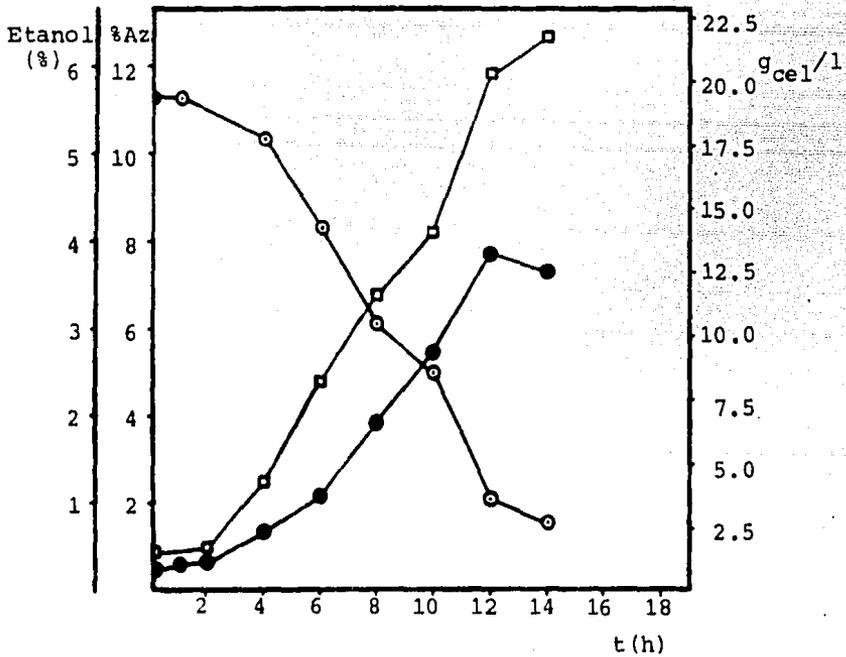
Los resultados de los experimentos de variación del nivel de oxigenación en la fermentación se resumen en la tabla 17 y se representan gráficamente en las figuras 26, 27, 28, 29 y 30

T A B L A 17

RESULTADOS DE CINETICAS EN CULTIVOS POR LOTE MODIFICANDO EL NIVEL DE OXIGENACION EN DIFERENTES FASES DE LA FERMENTACION

Fig. No.	$Y_{x/s}$ g/g	$Y_{p/s}$ g/g	t_d h	μ h^{-1}	β h^{-1}	P g/l·h	P' g/l·h	Q_p g/g·h
26	0.208	0.396	3.573	0.194	0.218	1.355	2.429	0.517
27	0.219	0.384	2.246	0.308	1.015	1.387	2.435	0.578
28	0.086	0.407	2.577	0.269	0.651	0.529	2.506	1.669
29	0.090	0.420	6.729	0.103	1.105	0.545	2.533	0.763
30	0.100	0.355	5.291	0.131	0.458	0.645	2.292	0.519

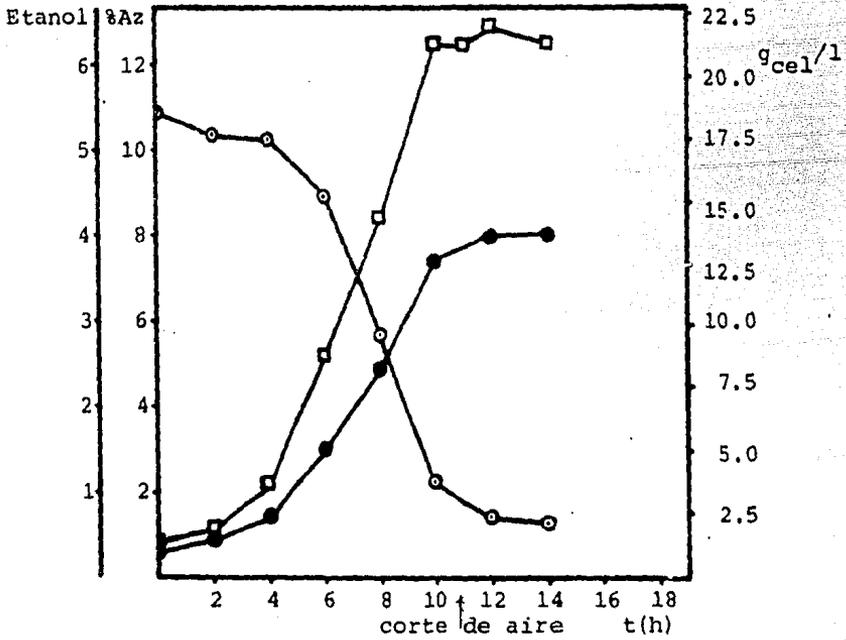
FIGURA 26



Vel. de agitación: 200rpm ◯ Azúcares
Aereación: 0.4 l/min ◻ Células
 ● Etanol

EFFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION
SIN VARIAR LAS CONDICIONES DE AEREACION
Y AGITACION (AEROBIA)

FIGURA 27



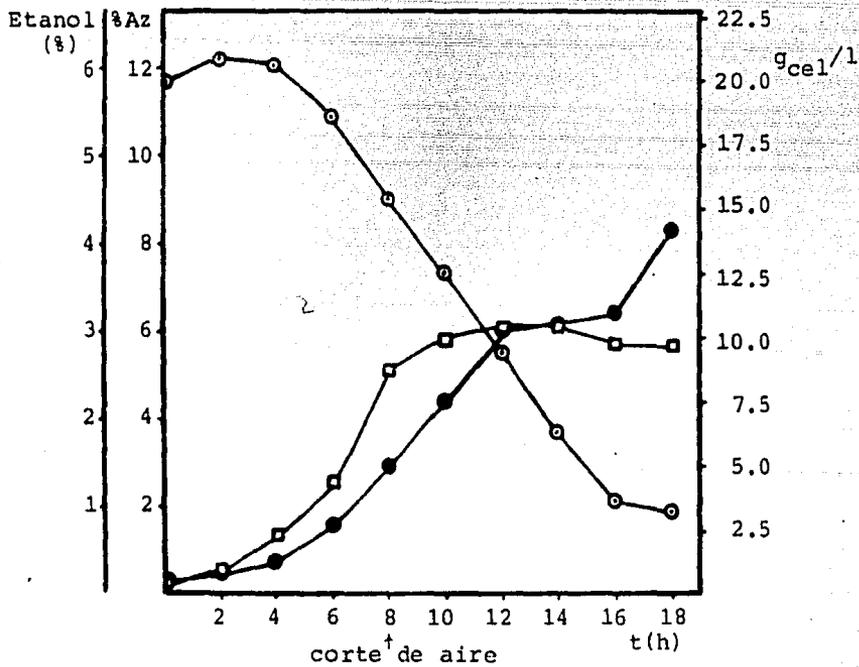
Vel. de agitación:
inicial: 200rpm
final : 50rpm

Aereación:
inicial: 0.4 l/min
final : 0.0 l/min

- Azúcares
- Células
- Etanol

EFFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION
MODIFICANDO LAS CONDICIONES DE AEREACION Y
AGITACION AL FINAL DE LA FASE LOGARITMICA

FIGURA 28

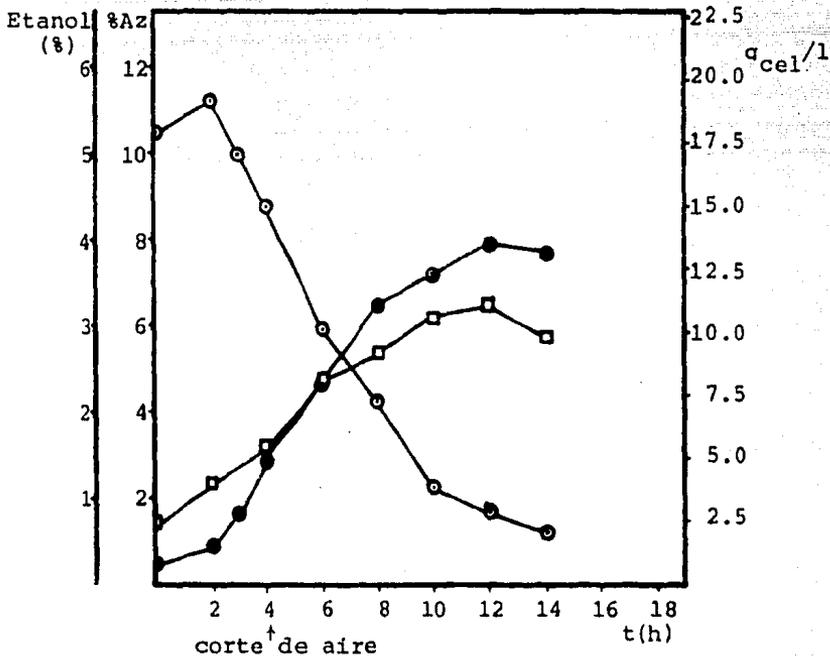


Vel. de agitación:
inicial: 200rpm ○ Azúcares
final : 50rpm □ Células
 ● Etanol

Aereación:
inicial: 0.4 l/min
final : 0.0 l/min

EFFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION
MODIFICANDO LAS CONDICIONES DE AEREACION Y
AGITACION DURANTE LA FASE LOGARITMICA

FIGURA 29



Vel. de agitación:
inicial: 200rpm
final : 50rpm

○ Azúcares
◻ Células
● Etanol

Aereación:
inicial: 0.4 l/min
final : 0.0 l/min

EFFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION
MODIFICANDO LAS CONDICIONES DE AEREACION Y
AGITACION AL INICIO DE LA FASE LOGARITMICA

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE VINAZA EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

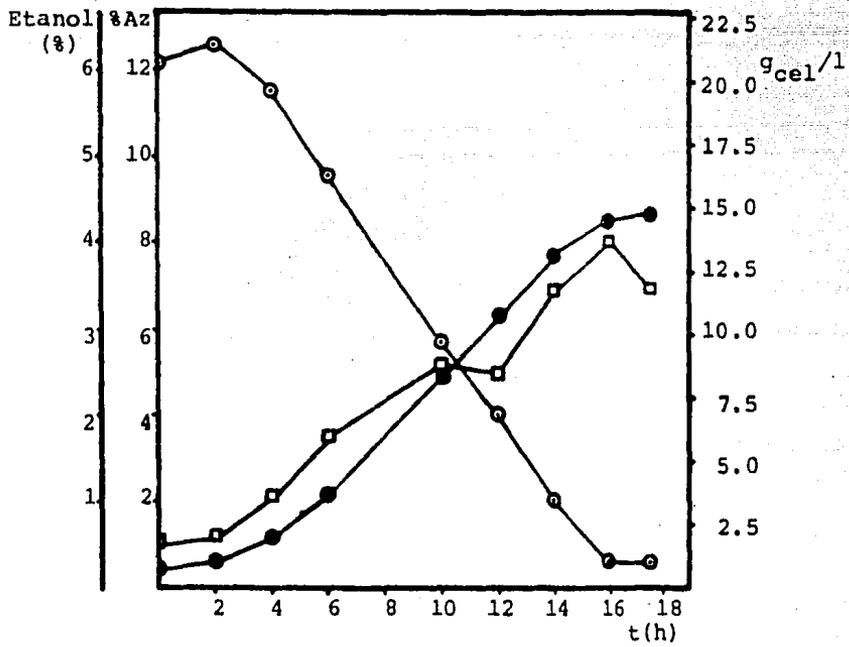
Los resultados de los experimentos donde se utilizaron diferentes concentraciones de vinaza se muestran en la tabla 18 y las correspondientes figuras 30, 31, 32, 33, 34 y 35.

T A B L A 18

RESULTADOS DE CINETICAS EN CULTIVOS POR LOTE UTILIZANDO VARIAS CONCENTRACIONES DE VINAZA EN EL MEDIO DE FERMENTACION

Fig. No.	$Y_{x/s}$ g/g	$Y_{p/s}$ g/g	t_d h	μ h^{-1}	β h^{-1}	P g/l·h	P' g/l·h	Q_p g/g·h
31	0.076	0.403	15.400	0.045	0.149	0.385	2.067	0.376
32	0.088	0.390	6.540	0.106	0.204	0.446	2.182	0.785
33	0.084	0.381	4.680	0.148	0.153	0.413	1.998	1.098

FIGURA 30

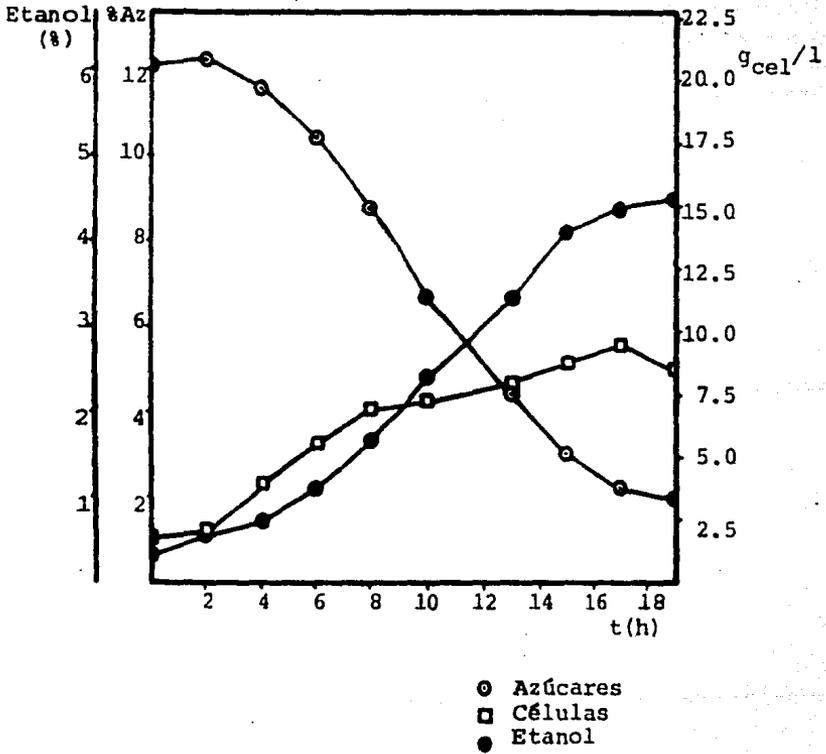


Vel. de agitación: 50rpm
Aereación: 0.0 l/min

○ Azúcares
□ Células
● Etanol

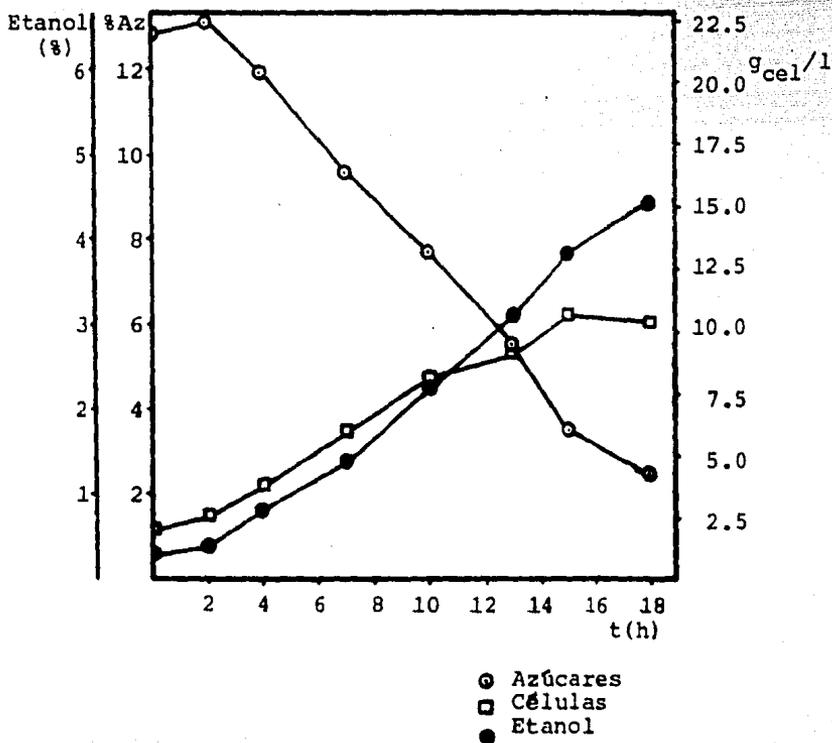
EFFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION
SIN MODIFICAR LAS CONDICIONES DE AERACION
Y AGITACION (ANAEROBIA)

FIGURA 31



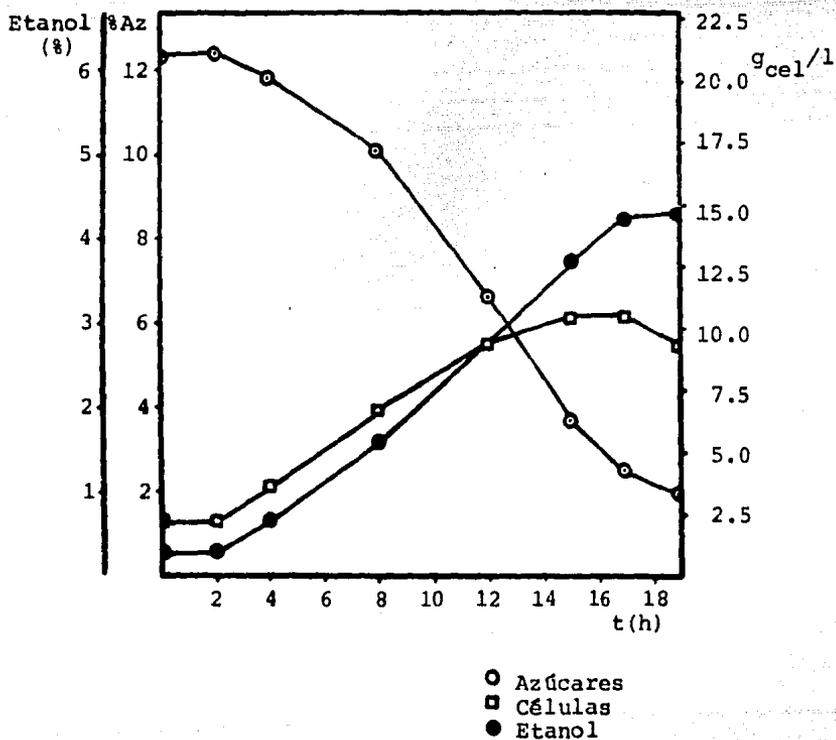
EFFECTO DE LA UTILIZACION DE VINAZA EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA. SUSTITUCION POR
VINAZA DEL 100% DEL AGUA DE DILUCION
DEL MEDIO

FIGURA 32



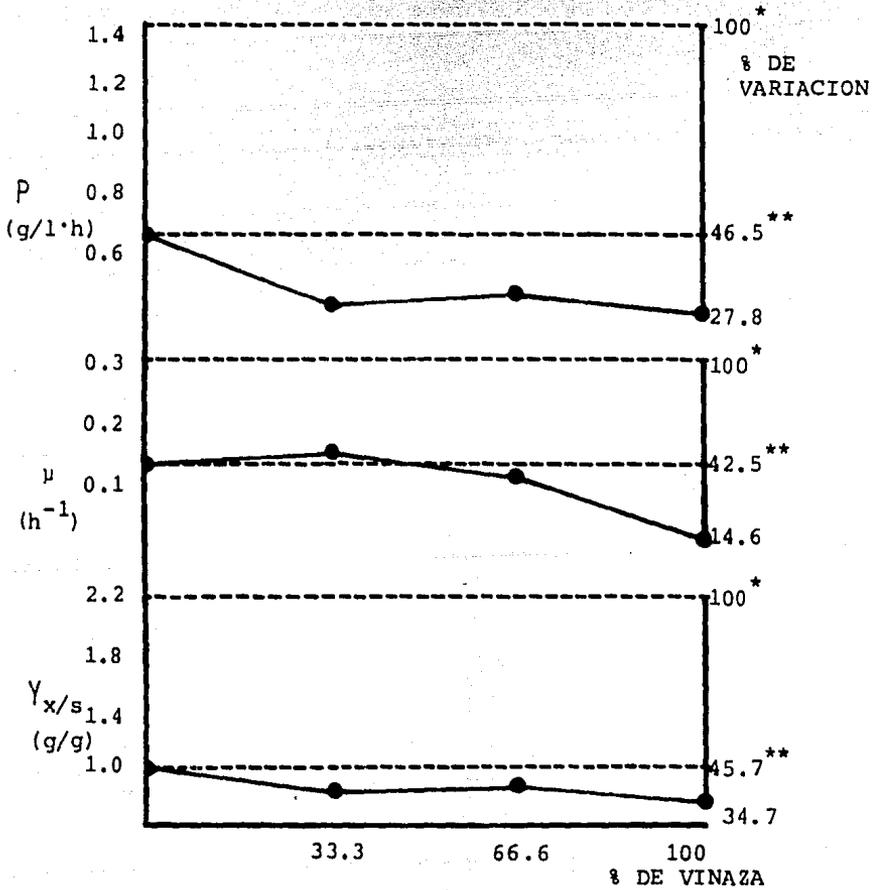
EFFECTO DE LA UTILIZACION DE VINAZA EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA. SUSTITUCION POR
VINAZA DEL 66.6% DEL AGUA DE DILUCION
DEL MEDIO

FIGURA 33



EFFECTO DE LA UTILIZACION DE VINAZA EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA. SUSTITUCION POR
VINAZA DEL 33.3% DEL AGUA DE DILUCION
DEL MEDIO

FIGURA 34

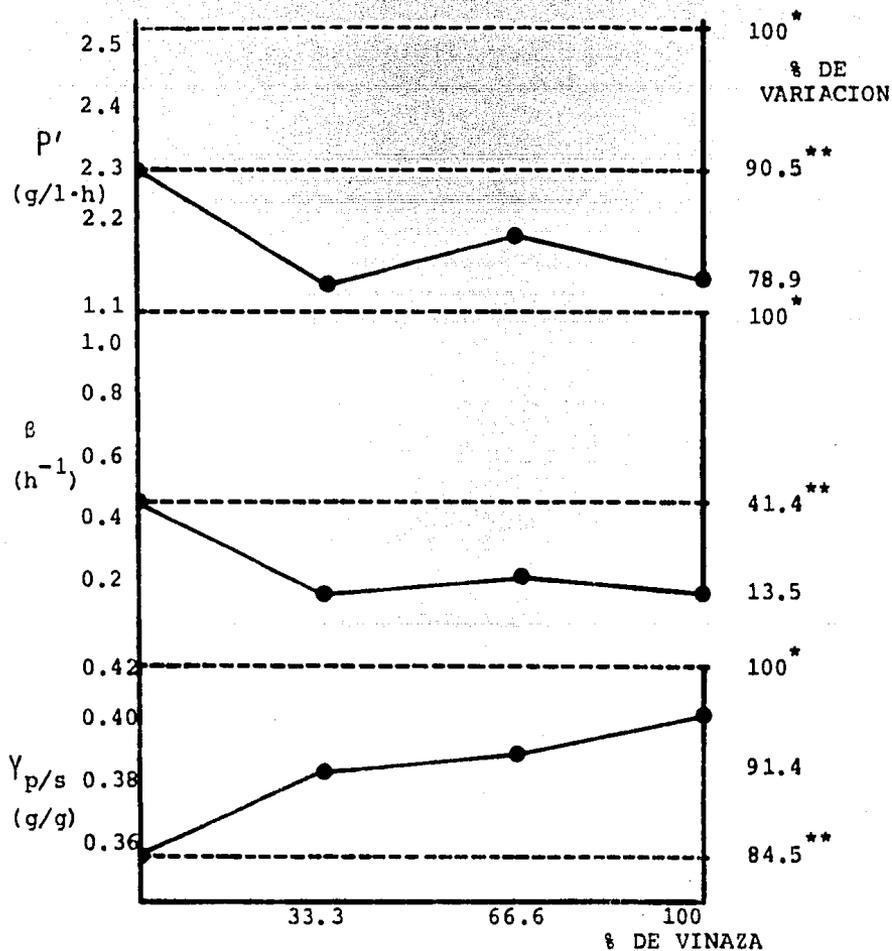


* Valor máximo obtenido (sin vinaza)

** Valor de referencia (anaerobia)

EFFECTO DEL USO DE VINAZA SOBRE LOS PRINCIPALES
PARAMETROS DE PRODUCCION CELULAR

F I G U R A 35



* Valor máximo obtenido (sin vinaza)

** Valor de referencia (anaerobia)

EFEECTO DEL USO DE VINAZA SOBRE LOS PRINCIPALES
PARAMETROS DE PRODUCCION DE ALCOHOL

DISCUSION Y CONCLUSIONES

EXPERIMENTOS DE RESPIRACION, El trabajo de G. Moulin y -- col. (22) que demuestra el efecto inhibitorio sinérgico de las concentraciones de etanol y azúcares sobre la velocidad de fermentación, además del efecto individual de cada uno de estos factores, se confirma en nuestros experimentos, cuyos resultados se muestran en las tablas 12 y 13 y en la figura 14.

Bajo las condiciones establecidas para el propósito del trabajo, se encontraron valores máximos de velocidades de fermentación a concentraciones de azúcares y etanol de 8 y 0% respectivamente; concentraciones mayores produjeron disminuciones significativas en la velocidad absoluta de fermentación (Q_{CO_2}) llegando a producirse inhibición total a partir de concentraciones de etanol de 12% y concentraciones de azúcares y etanol de 20 y .8% respectivamente.

En el intervalo de concentración de azúcar de 12 a 16% a 0% de etanol se aprecia inhibición de 7 a 17% respecto a la máxima velocidad de fermentación, inhibición producida solo por sustrato; considerando que el medio se diluye al agregar el -- inóculo y no hay etanol en cantidades importantes, se determinó utilizar una concentración máxima de azúcares (sin contar la dilución por inóculo) de 16% para los experimentos en fermentador.

Las mismas tablas de resultados muestran que la inhibición por etanol es más significativa que la ocurrida por sus-

trato, ya que en intervalos de 0 a 12% de alcohol se aprecia - reducción de la actividad fermentativa desde un 100% hasta una actividad prácticamente nula. Resultados similares se obtuvieron en los trabajos de Correia y Van Uden (8), en los cuales, la máxima inhibición de la actividad fermentativa, se alcanzó a un 11% (v/v) de alcohol y concentraciones de glucosa de solo 2%.

EXPERIMENTOS EN MATRACES. Partiendo de la composición elemental de levaduras (tabla 6) y condiciones experimentales de T, pH y aereación probadas para levaduras (17), se diseñaron fermentaciones de prueba, con el fin además, de verificar los métodos de determinación de alcohol, azúcares y células durante el transcurso de las cinéticas.

Las fermentaciones realizadas presentaron alto efecto inhibitorio a concentraciones de azúcares de 16%, efecto que no coincidía con los experimentos de respiración. Esto dió lugar al diseño de una serie de fermentaciones en matraces de acuerdo a la tabla 9. Los resultados obtenidos confirmaron la suposición de que tal efecto inhibitorio se debía a la elevada concentración de sales, lo que contribuyó a elevar drásticamente la presión osmótica del medio de fermentación, produciéndose la disminución de la actividad fermentativa.

Las concentraciones de sales y azúcares de 2%* y 16% respectivamente, permitieron una máxima producción celular (Tabla 14) y concentraciones de 2%* de sales y 8% de azúcares dieron como resultado una máxima producción de alcohol (tabla 14).

En suma, el experimento permitió determinar la concentración adecuada de sales, la cuál fué de 2%, que por un lado no limitan la fermentación por concentración de estos nutrientes y por otro no inhiben la actividad fermentativa.

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
Uno de los factores de gran influencia en el curso de la fermentación es el nivel de oxigenación, cuyos efectos fueron estudiados; el parámetro que nos permitió determinar los valores de aereación y agitación necesarios para suministrar el oxígeno empleado por las levaduras a temperaturas de 30°C, es el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{la}).

Las condiciones de trabajo se establecieron basándose en los resultados de los experimentos con respirómetro Warburg. Los valores de K_{la} muestran que, a valores bajos de agitación y aereación, es posible cubrir la demanda de oxígeno por las levaduras, ya que la capacidad de oxigenación del sistema es muy alta comparada con los requerimientos de las células.

EFECTO DEL NIVEL DE OXIGENACION EN LA FERMENTACION. Se conoce desde hace tiempo que al cambiar las condiciones aerobias a anaerobias en el transcurso de una fermentación con microorganismos facultativos, se presenta una reducción del rendimiento celular y la velocidad de utilización de glucosa y esto se refleja en el tiempo de fermentación y producto final formado. Este fenómeno se conoce como "Efecto Pasteur" (13). Uno de los objetivos del presente trabajo se basó en este argumento, buscando establecer las condiciones óptimas que dirigieran la fer

mentación hacia el aprovechamiento de sustrato con la máxima - producción de alcohol..

Los cambios controlados en los niveles de oxigenación en las diferentes fases de crecimiento confirman que la cinética puede ser dirigida alterando el predominio de una ruta metabólica específica (figuras 26, 27, 28, 29 y 30).

La primera fermentación (figura 26), realizada en condiciones aerobias, muestra un comportamiento clásico de una fermentación de este tipo, con rendimientos celular y velocidad específica de crecimiento elevados, lo que implica que el sustrato fué utilizado principalmente en el crecimiento celular. Un comportamiento similar se observa en la segunda fermentación (figura 27), donde el corte del suministro de oxígeno al inicio de la fase estacionaria no modificó significativamente los parámetros importantes, resultando valores altos de productividad como se esperaba (tabla 17). Sin embargo, ocurren cambios drásticos cuando el corte de oxígeno se efectúa aproximadamente a la mitad de la fase log. Esto repercute favorablemente hacia la ruta fermentativa (figura 28).

Al cortar el suministro de oxígeno al inicio de la fase lag en la 4a. fermentación (figura 29), una elevada velocidad de producción se mantiene aún cuando la velocidad de producción celular declina poco después del corte de aire. Esto se traduce en una cantidad mayor de sustrato disponible en la fermentación. Este comportamiento se refleja en bajos valores finales de concentración celular.

La 5a. cinética (figura 30), una fermentación desarrolla-

da en condiciones anaerobias, muestra una disminuci3n del valor de μ muy marcada en relaci3n a la 1a. y 2a. fermentaciones pr3cticamente aerobias (figura 26 y 27), sin embargo se observ3 un gran aprovechamiento de sustrato, alcanzando adem3s, una concentraci3n alta de alcohol a baja velocidad de producci3n, lo que obviamente alarg3 el tiempo total de fermentaci3n.

Uno de los objetivos que se persiguen es la optimizaci3n de la producci3n de alcohol y los resultados muestran que la regulaci3n del ox3geno suministrado altera sensiblemente las variables involucradas. Puesto que es necesario un n3mero adecuado de c3lulas en el menor tiempo posible, la fermentaci3n debe alcanzar una μ elevada, sin embargo, apenas haya alcanzado la fase de crecimiento log, 3sta puede reducirse a trav3s del corte de ox3geno con el objeto de que la velocidad de producci3n de alcohol se mantenga dentro de los valores al inicio de la fase log.

Los resultados muestran que el tiempo 3ptimo para el corte del suministro de ox3geno se halla alrededor del inicio de la fase log.

El m3ximo valor de $Y_{P/S}$ alcanzado, se muestra en la tabla de resultados y corresponde a la figura 29, K. Bose (5), en sus experimentos en lote, alcanz3 valores de 0.43 que es muy similar comparado con el valor de 0.420 obtenido en nuestros experimentos, adem3s de que en aquellos experimentos, fueron menores los tiempos de fermentaci3n. Por lo que respecta a la productividad, se alcanz3 un valor de 2.533 g/l.h que compar3ndolo con el valor de 2,2 g/l.h reportado por Nojima en su

estudio (23) para cultivo por lote, es sensiblemente mayor ; en cambio de acuerdo a la P' calculada en base a los estudios de K. Bose (5) que fué de 3.0g/l.h nuestros valores son menores, tomando en cuenta las condiciones empleadas en ese trabajo y que la carga de células en el inóculo fue 10 veces mayor y creciendo exponencialmente, deducimos que nuestros resultados son satisfactorios dada nuestra carga celular pequeña al inicio de la cinética.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE VINAZA EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA, En comparación con la cinética desarrollada en -- condiciones anaerobias sin vinaza, (figura 30), los experimentos con vinaza mostraron un comportamiento análogo respecto a la producción de alcohol, lo que indica que no se presentan efectos inhibitorios apreciables debido a la vinaza, lo cual no sucede con la producción celular, que muestra reducciones importantes en su crecimiento y rendimiento, sobre todo usando una máxima cantidad de vinaza (figuras 34, 35).

Como reflejo de las bajas velocidades desarrolladas, μ y β , los tiempos de fermentación fueron largos en todos los experimentos con vinaza, disminuyendo con ello, las productividades alcanzadas para etanol, además de que los azúcares residuales tuvieron valores elevados en relación a las fermentaciones sin vinaza (figuras 31, 32 y 33). Este fenómeno puede deberse al efecto combinado de varios factores tales como la existencia de metabolitos inhibitorios en la vinaza, azúcares no aprovechables o incluso algún elemento limitante.

W. Borzani (4), en sus experimentos usando urea y sulfato de amonio muestra que hay un límite de concentración de estos nutrientes, en donde se presenta una velocidad específica de crecimiento celular máxima y a valores menores retarda la fermentación, manteniendo constantes las concentraciones finales de etanol.

Un aspecto sobresaliente es el hecho de que los valores de rendimiento y productividad obtenidos en las tres cinéticas con vinaza son muy semejantes entre sí, lo que implica que el empleo de vinaza en proporciones desde 33.3% hasta 100% respecto a la dilución del medio, no provoca cambios importantes en la producción de alcohol. Esto sugiere la posibilidad de reutilizar hasta 3 veces la vinaza como constituyente del medio de fermentación.

Resumiendo el análisis de los resultados de los experimentos con vinaza, bajo las condiciones estudiadas, podemos establecer que:

- 1.- Grandes cantidades de vinaza no afectan los rendimientos de alcohol pero si reducen la productividad en células a través de los parámetros μ y P , por lo que se ve afectada negativamente la productividad de alcohol.
- 2.- El uso de diferentes cantidades de vinaza no modifican significativamente, tanto el comportamiento como los resultados finales de las cinéticas con vinaza.
- 3.- Para alcanzar las concentraciones finales de alcohol, obtenidas en las fermentaciones sin vinaza, no fué necesario agregar sales adicionales al medio de fermentación, lo --

cual hace suponer que la vinaza proporciona estos nutrientes.

4.- La adaptación de las condiciones experimentadas en las cinéticas sin vinaza permite predecir un aumento en la productividad para alcohol al ser aplicadas a fermentaciones con vinaza.

CONCLUSIONES. Hemos apreciado que el desarrollo de un cultivo por lote involucra el manejo de variables interrelacionadas y dinámicas que no pueden ser establecidas en forma aislada; por lo que, considerando que se busca alcanzar la máxima eficiencia en la producción de alcohol en cultivos por lote, el estudio debe basarse en el análisis de las condiciones tanto individuales como en su conjunto.

Además de la relevancia que representan los factores ambientales y nutricionales, un factor de primer orden lo constituye el manejo y selección adecuados de la cepa, que debe poseer entre sus principales características, un condicionamiento en cuanto a resistencia a altas concentraciones de etanol y sustrato, así como la condición de encontrarse en fase logarítmica al momento del inóculo.

Un factor adicional que fué introducido en este trabajo es el empleo del residuo de la fermentación alcohólica denominado vinaza, que en primera instancia mostró que puede cubrir los requerimientos de sales en la fermentación sin provocar efectos negativos importantes; sin embargo, estudios complementarios deben ser realizados con el fin de excluir la posibilidad de alguna limitante en este sentido, dada la variabilidad

de su composición.

La integración de los estudios de las variables por separado en las fermentaciones por lote nos permitió relacionar sus efectos así como proponer un diseño tentativo para experimentos subsecuentes, tomando como base los valores obtenidos para los parámetros determinantes de la fermentación:

- Condiciones ambientales:

Oxígeno. Las necesidades para satisfacer un crecimiento óptimo indican valores de K_{La} superiores a $60h^{-1}$ durante la fase lag y K_{La} de 0 para las etapas de la cinética subsiguientes. Temperatura y pH. Estos factores han sido ampliamente estudiados, utilizándose los valores de pH=5 y $30^{\circ}C$ de temperatura.

- Condiciones nutricionales:

Azúcares y etanol. Los estudios de inhibición por sustrato y alcohol indican concentraciones máximas permisibles de 16% para azúcares y 0% de alcohol al inicio de la fermentación sin considerar que el tratamiento de la cepa podría permitir valores mayores.

Requerimientos de sales. La sustitución del agua de dilución del medio por vinaza puede cubrir tales requerimientos como se ha mencionado.

La importancia de los experimentos realizados y sus resultados no solo es de orden técnico sino que la aplicación de éstos dentro de un programa definido sobre producción masiva de alcohol, se reflejaría amplia y positivamente en los aspectos económicos y sociales relacionados con la industria del alco-

hol en México así como su problemática. Uno de estos problemas y posiblemente el más importante, como se ha mencionado, es el continuo daño ecológico provocado por los efluentes de elevada carga orgánica vertidos a los receptores naturales, ya que se vislumbra la posibilidad de reducir por lo menos en un 75% - los volúmenes de vinaza producida por la industria alcoholera.

Por otro lado, el aumento de la productividad del alcohol a nivel industrial abre nuevas perspectivas sobre su empleo como combustible en motores de combustión interna, el cual ha dado buenos resultados en el programa llevado a cabo actualmente en Brasil, que adicionalmente contribuye a disminuir la contaminación ambiental originada por los desechos de la combustión de la gasolina.

Estas aplicaciones a su vez, generarían grandes volúmenes de proteína unicelular susceptibles de ser aprovechadas en otros renglones y cuyo estudio se encuentra en pleno desarrollo.

Las consideraciones señaladas deben ser objeto de un profundo estudio socioeconómico y tecnológico para determinar su factibilidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alvarez G.J. 1978. Identificación de procesos de fermentación y optimización estática en cultivo continuo. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. - IPN.
- 2.- Araujo P.M.G. 1981. Propagación de *Pseudomonas cariophilli* en melaza de caña, para la obtención de proteína unicelular. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlan. UNAM.
- 3.- Biomass process handbook. Ethanol from biomass by fermentation. Technical Insights Inc. N. Jersey, USA.
- 4.- Borzani W. 1984. Producción de alcohol por fermentación. - Centro de Pesquisas. Instituto Mauá de Tecnología, Brasil.
- 5.- Bose K., Ghose 1973. Studies on continuous fermentation of Indian cane sugar molasses by yeast. Process Biochemistry. 6(2):23-26.
- 6.- Casida L.E. 1968. Industrial microbiology. J. Wiley & Sons Inc. N. York, USA.
- 7.- Concheiro A. 1985. Biotecnología y Energía. En prospectiva de la biotecnología en México. Fundación J. Barrios Sierra. p. 454.
- 8.- Correia I. & Van Uden N. 1983. Temperature profiles of ethanol tolerance: Effects of ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnology and - Bioengineering. XXV: 1665-1667.

- 9.- Costa C. & Castello J.R. 1980. Ethanol Stillage: A resource disguised as a nuisance. Centro de Tecnología PROMON. R. Janeiro, Brasil.
- 10.-Chen T.S. 1982. Industrial fermentation in China. Journal of Chemical Technology and Biotechnology.
- 11.-Da Gloria N. 1975. Utilización agrícola de la vinaza. Reporte de Brasil Azucareiro.
- 12.-De la Torre M. 1985. Aprovechamiento de esquilmos agrícolas y residuos agroindustriales. En " Prospectiva de la Biotecnología en México ".p. 219-233. Fundación J. Barros Sierra. CONACYT.
- 13.-Doelle H.W. 1975. Bacterial metabolism. Academic Press, Inc, 2a. Edición. New York, USA. p.609-627.
- 14.-Dubois M. y col. 1956. Colorimetric method for determination of sugars & related substances. Analytical Chemistry. 28(3): 350.
- 15.-Eder K. 1976. Tratamiento y aprovechamiento de aguas residuales en fábricas de levaduras y alcohol. Ingeniería Química. p. 113 Jun.
- 16.-Faber M. 1981. Production of ethanol from renewable resources: an assesment. Developments in industrial microbiology. 22: 111-117.
- 17.- Flores M.T. y S. Mendo R. 1983. Producción de proteína unicelular a partir de jugo de tuna. Tesis profesional. IPN.
- 18.-López M. V. 1985. Tratamiento Biológico de aguas residuales. En " Prospectiva de la Biotecnología en México ". Fundación J. Barros Sierra. CONACYT. p. 263-268.

- 19.- López H. 1964. Ensayos de purificación de melazas. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.
- 20.- Luchi N.R. 1981. Ethanol value as a naphta substitute. - Chemical Economy & Engineering review, 13(6): 12-16.
- 21.- Monteiro C.E. 1975. Brazilian experience with the disposal of waste water from the cane sugar and alcohol industry. p. 33.
- 22.- Moulin G., Boze H. & Galzy P. 1980. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, XXII: 2375-2381.
- 23.- Nojima S. 1983. The development of continuous alcohol fermentation by inmobilized living cells. Chemical Economy & Engineering review, 15(4): 17-22.
- 24.-Quintero R. 1985. "Prospectiva de la Biotecnología en México". p. 492. Fundación J. Barros Sierra. CONACYT.
- 25.- Rico M. 1984. Producción y consumo mundial de mieles. En "La importancia de los mercados de melaza". Coloquio Internacional sobre edulcorantes. Cuadernos GEPLACEA.p. 12-13.
- 26.- Rodríguez L. 1984. Comercialización internacional de mieles. En "La importancia de los mercados de la melaza". Coloquio Internacional sobre Edulcorantes. Cuadernos GEPLACEA. p. 32-34.
- 27.- Romero F. 1985. La biotecnología en México: Tratamiento Biológico de aguas residuales. En "Prospectiva de la Biotecnología en México". Fundación J. Barros Sierra. CONACYT p. 398-399.

- 28.- S.R.H. 1979. Métodos de análisis de agua y agua residual. Vol. II, CIECCA. p.238. México.
- 29.- Sitton O. C., G.L. Fouthch, N.L. Book y J.L. Gaddy. 1979. Ethanol from agricultural residues. Process Biochemistry. 14(9): 7-10.
- 30.- Umbreit W. 1972. Manometric Biochemical Techniques. Burgess Publishing Company. 5a. Edición. Capítulos 1, 2, 3, 4.
- 31.- Williams D. & Munnecke M. 1981. The production of ethanol by immobilized yeast cells. Biotechnology & Bioengineering. XXIII: 1813-1825.
- 32.- Yang V. & Trindade S. 1979. Gasohol program in Brasil. - Chemical Economy & Engineering review. 11(3): 12-19.

T A B L A 5

EQUIVALENTE EN TERMINOS DE POBLACION PARA LA CONTAMINACION POR UN INGENIO AZUCARERO CON DESTILERIA (BASADO SOBRE 1000 TONELADAS DE CAÑA DE AZUCAR)

Residuo	Volumen (x 10 ³ l)	DBO ₅ , 20°C (mg/l)	DBO ₅ , 20°C (carga Kg)	Población equiv. (hab)	% relativo
De la producción de azúcar (lavado de caña, evaporación, etc.)	16 765	1 110	2 564	47 100	31.6
Residuo de desti- lación (vinaza)	360	15 000	5 400	100 000	67.1
Agua de lavado de fermentación	20	5 000	100	1 900	1.3

Monteiro, C.E. (1975). (21)