



15
28
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

REUSO DE VINAZAS EN LA PRODUCCION
CONTINUA DE ETANOL A PARTIR DE
MELAZAS DE CAÑA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE SOTO MUNGUIA

Director de Tesis: Vicente López Mercado



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.

I N D I C E .

Pág.

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
Aspectos Económicos	3
Proceso de Obtención de Azúcar Cruda	5
Actividad Azucarera en México	6
Subproductos	7
Composición de Mielles	16
Obtención de Alcohol a Partir de Melazas de Caña.	17
Oferta y Demanda de Alcohol	19
Teoría del Cultivo Batch	28
Teoría del Cultivo Continuo	34
Levaduras	41
Bioquímica de la Generación de Energía	42
OBJETIVOS	48
MATERIALES Y METODOS	
Diseño del Medio de Cultivo	49
Determinación de Azúcares	53
Conteo Celular	54
Determinación de Alcohol	57
Conservación del Microorganismo	59

Demanda Química de Oxígeno	59
Demanda Bioquímica de Oxígeno	61
Sólidos en Todas sus Formas	63
Montaje de las Fermentaciones	65
Propagación	66

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimentación Previa	71
Experimentación en Cultivo por Lote	73
Experimentación en Cultivo Continuo	79
Energía de Mantenimiento	88
Experimentos con Vinaza	92

CONCLUSIONES	109
--------------------	-----

ALTERNATIVAS

Recirculación de Células	114
Variedad de Cepa	117
Procesos Utilizados	118
Inmovilización de Células	124

Bibliografía	126
--------------------	-----

RESUMEN

La actividad azucarera trae como consecuencia la generación de subproductos, que desde el punto de vista ambiental, son altamente dañinos y sus consecuencias originan un deterioro ecológico elevado.

El subproducto proveniente de las destilerías de alcohol conocido como vinaza, es el más problemático de todos ellos, pues además de su carga orgánica, que puede alcanzar los 25 gDQO/l, se genera a razón de 13 veces más del alcohol producido con un pH de 4.5 en promedio y a una temperatura de alrededor de los 74°C. Dichas características dan como consecuencia, alteraciones considerables en los cuerpos receptores donde es vertido.

Trabajos realizados a nivel laboratorio en fermentaciones en cultivo por lote, utilizando melazas como principal fuente de carbono y utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, muestran que es factible utilizar las vinazas sustituyéndolas por el agua de dilución hasta en un 100% en el medio de fermentación, ya que su contenido en minerales puede cubrir los requerimientos de éstos durante la fermentación.

El presente trabajo tuvo como finalidad incrementar las productividades para etanol, respecto a las obtenidas en cultivo por lote, utilizando un sistema de fermentación continuo.

La experimentación previa, proporcionó un valor de $\mu = 0.46 \text{ Hr}^{-1}$, valor que se tomó como referencia para las cinéticas en cultivo continuo. Las corridas en cultivo por lote obtenidas en forma previa al cultivo continuo, presentaron un valor de 3.18 --

gr_{ETOH}/lHr para productividad, a un 33% de recirculación de vinza, así como un valor de 4.12 gr_{ETOH}/lHr en cultivo continuo a una velocidad de dilución de 0.1 Hr^{-1} , con la misma proporción de recirculación.

Desafortunadamente, el impacto ambiental de las vinazas no queda resuelto del todo, ya que durante las fermentaciones en cultivo continuo, se obtiene un consumo de sustrato tan solo del 33%, lo que origina una carga orgánica muy elevada para la corriente de salida del sistema. Esto hace necesaria la consideración de alternativas que hagan mas eficiente el proceso utilizado, aunque se confirme la idea de que las vinazas pueden cubrir las necesidades de minerales requeridas por la levadura.

INTRODUCCION.

La caña de azúcar representa en elemento muy importante dentro de la economía de nuestro país.

Es una herbácea que pertenece al grupo de las gramíneas que se caracterizan por presentar como parte de su constitución un tallo recto, cilíndrico, nudoso y bastante firme que le proporciona gran resistencia y flexibilidad. En ocasiones, alcanza los cinco-metros de altura. Las hojas planas están insertas en cada uno de los nudos. (13).

La caña se ha cultivado por miles de años y las primeras evidencias de su procesamiento corresponden a los persas en el siglo-VII. Los árabes extendieron el cultivo a occidente por el Mediterráneo. En América, el cultivo de la caña comenzó en 1493 cuando Colón trajo la semilla con sembradores expertos, iniciando los cultivos en Haití. (17).

Crece por lo general en climas tropicales y subtropicales y es producida aproximadamente en cien países. Su valor principal se deriva de su alto contenido de sacarosa, la cual puede alcanzar hasta un 11% en peso, aunque su composición está en función de las condiciones del suelo que le dió origen, así como de la variedad de la caña.

Aspectos Económicos.-

El azúcar puede obtenerse a partir de dos fuentes principales:

la caña y la remolacha; la primera se desarrolla en climas tropicales y subtropicales y la segunda lo hace en climas templados.- Esto origina que se produzca en gran número de países; en algunos de ellos no se alcanza a cubrir la demanda interna y tienen que recurrir a la importación de esta.

En cuanto al tipo de producto existente en el mercado, se tiene el azúcar blanca y el azúcar cruda y ambos productos constituyen partes iguales del mercado total. Sin embargo, el azúcar blanca ha presentado mayor dinamismo. Su participación en el mercado total pasó de 19% en 1975, a casi 50% en 1985. (40)

Los principales países consumidores son la Unión Soviética, la Comunidad Económica Europea, Estados Unidos, Brasil, India, China y México, los cuales, a su vez, están entre los nueve principales países productores.

Los movimientos de azúcar a nivel internacional son tres: de Centroamérica y el Caribe a Europa Oriental; el segundo consiste en un mercado entre países asiáticos y por último el que corresponde a ventas de Europa Occidental a Asia y Africa.

Varias son las causas por las que el precio internacional del azúcar ha tendido ligeramente a la baja, principalmente en los últimos años. Una de las razones es que los países productores no toman como referencia los precios internacionales, sino únicamente los precios y las necesidades de consumo interno. Esto implica un incremento en su producción y en consecuencia, en la capacidad de exportación que origina mayor oferta y por lo tanto, una disminución en el precio.

Otro factor que ha tenido influencia en la disminución de la demanda de azúcar ha sido la creciente utilización de los sustitutos edulcorantes como el jarabe de maíz fructosado y el aspartame, principalmente en países altamente importadores como Estados Unidos, Japón y Canadá, pues algunas embotelladoras de refrescos han sustituido el uso de azúcar en un 75 y 100%. (2)

Proceso de Obtención de Azúcar Cruda.-

En la figura 1 se muestra el diagrama general para la obtención de azúcar en los ingenios.

Para esto, la caña llega del campo y se descarga con grúas radiales para que posteriormente sea molida con molinos de cuchillas tipo machete. Aquí, el jugo se separa de la parte insoluble de la caña, conocida también como fibra, fundamentalmente constituida por bagazo, que corresponde al 25% de la caña con un 49% de humedad.

Con objeto de eliminar los sólidos suspendidos y las partículas coloidales presentes en el jugo obtenido de la operación anterior, éste es sometido a una clarificación adicionando sustancias como cal, fosfatos solubles, dióxido de azufre o de carbono, polielectrolitos, etc., de acuerdo al tipo de azúcar que se desee obtener. Inmediatamente, el jugo clarificado es evaporado con un sistema de triple efecto, en donde en el primer evaporador, el jugo pasa de 18 a 30° Bx; en el segundo alcanza 80° Bx y por último, - llega a un evaporador de capa fina, en donde el jugo alcanza una-

concentración de 90° Bx.

La masa formada en la evaporación es una mezcla de azúcar -- cristalizada y una solución de sacarosa sobresaturada, que por -- medio de un descenso de temperatura, facilita la operación de -- cristalización. Los cristales formados cuando la solución se ha -- sobresaturado, son separados por centrifugación. Los subproductos formados en cada operación se muestran en la fig. 1.

Actividad Azucarera en México.-

La actividad azucarera resulta de gran importancia, ya que -- a consecuencia de ella, se genera una cantidad importante de sub -- productos sólidos como bagazo, cachaza y bagacillo y desechos lí -- quidos como melaza, esta última de gran utilidad como materia pri -- ma para la obtención de otros productos como etanol, levadura o -- también utilizada como alimento para ganado, principalmente en -- los países industrializados.

En nuestro país la industria azucarera resulta de particular interés ya que representa una fuente de ingresos para cerca de -- 297,000 personas, entre personal de campo y de fábrica, además -- de que produce un artículo de consumo generalizado.

Como caracteriza a una economía mixta, en nuestro país la -- producción azucarera se realiza mediante la participación de 52 -- ingenios públicos, 16 privados y dos cooperativas. Además, cuenta con una capacidad instalada de cuatro millones de toneladas de a -- zúcar/año.

Sin embargo, tanto en el campo como en la fábrica, esta in--

industria está inmersa en una problemática que no puede ignorarse. La fragmentación del campo cañero, con limitaciones en la disponibilidad de agua para riego, el uso de variedades inadecuadas de caña y en fábrica, dificultades de conservación y mantenimiento, así como equipo y maquinaria deteriorada con operación deficiente, con escaso aprovechamiento de sacarosa en caña, son algunos aspectos que dan como resultado, rendimientos en fábrica de un escaso 10%. (2)

Sin embargo, a pesar de esta problemática, las estadísticas muestran cifras elevadas tanto en la producción de azúcar como de subproductos, como se muestra en la fig. 2.

Hasta 1984 se había tendido a la importación del dulce, correspondiendo a un 8.6% de la producción para ese año. Para 1985 se suprimen las importaciones logrando satisfacer la demanda interna y colocando el 1.74% de la producción nacional en el exterior.

Subproductos.-

Los subproductos en la industria azucarera se pueden agrupar de acuerdo a la forma en que se obtienen:

- a) Durante la cosecha de la caña como cogollo, hojas, paja, etc.
- b) Los que resultan del proceso industrial como cachaza, bagazo y miel final.

Durante el proceso de obtención de azúcar es posible obtener de cada tonelada métrica de caña, 120 Kg de azúcar, 38 Kg de miel

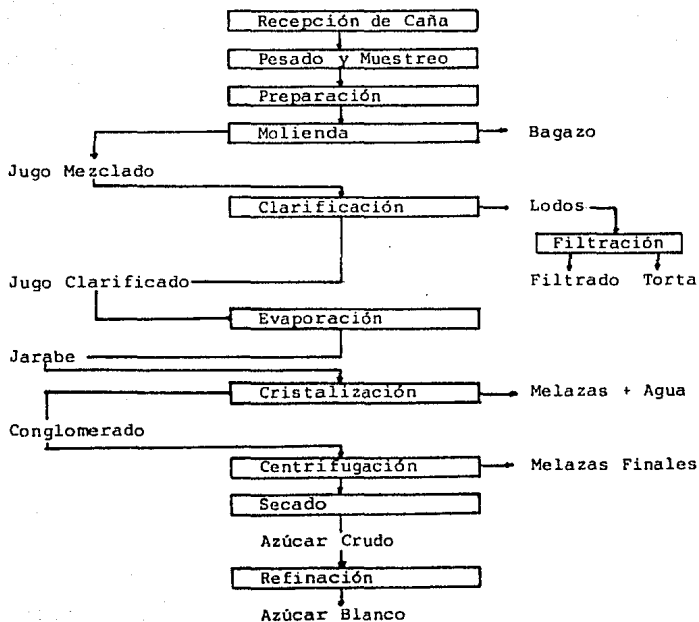
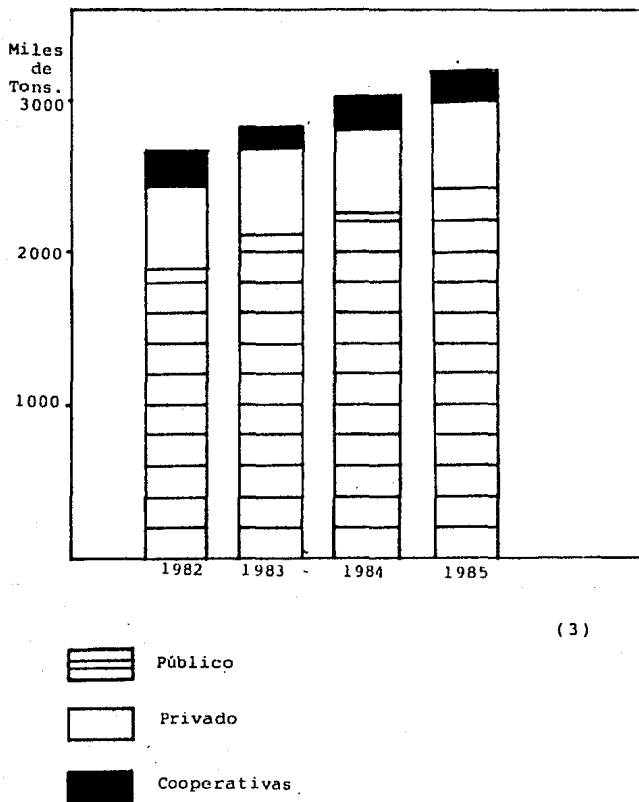


Fig.1 Diagrama de Bloques para la Obtención de Azúcar.



(3)

Fig.No.2 Producción de Azúcar
por Sectores.Zafras
1982-1985

final, 36 Kg de cachaza, 250 Kg de bagazo húmedo, 66 Kg de paja y hojas y 100 Kg de cogollo.

La melaza que resulta de particular interés para este trabajo, es un líquido denso y viscoso a partir del cual no puede extraerse más azúcar por métodos puramente físicos y actualmente resulta una fuente de ganancia para la industria azucarera.

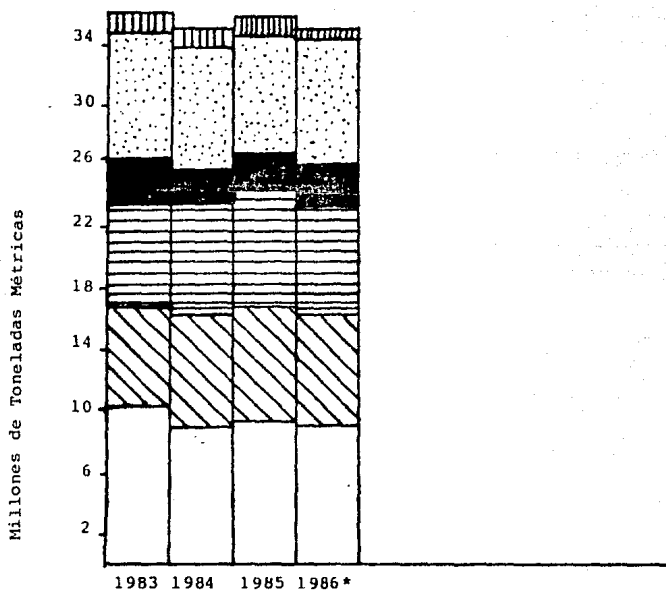
El volumen de melazas producido actualmente es importante puesto que representa casi la tercera parte del volumen de azúcar.

La producción mundial de melazas es de aproximadamente 36.16 millones de toneladas para 1985, de las cuales México produjo - el 3.94% para ese año.

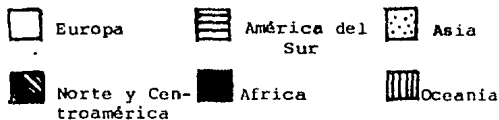
La Fig. 3 representa la producción de mieles por continentes para los últimos años registrados. Estas cifras no tienen un valor estadístico y solo se mencionan para recalcar la importancia del volumen en toneladas de producción. (2)

La importancia de las melazas estriba fundamentalmente en que pueden ser utilizadas como materia prima para la obtención de otros productos, ó bien, en forma directa como abono ó alimento para ganado. La Tabla 1 resume las alternativas para la utilización de las melazas.

En términos generales es posible afirmar que el rango de 38 Kg de miel por tonelada de caña, aunado a los contenidos de pureza de las mieles (entre 33 y 36% de sacarosa), significa un desaprovechamiento nacional que disminuye la productividad en la producción de azúcar.



(3)



*Estimado

Fig. No.3. Producción de Mielos
por Continentes.

Tabla 1

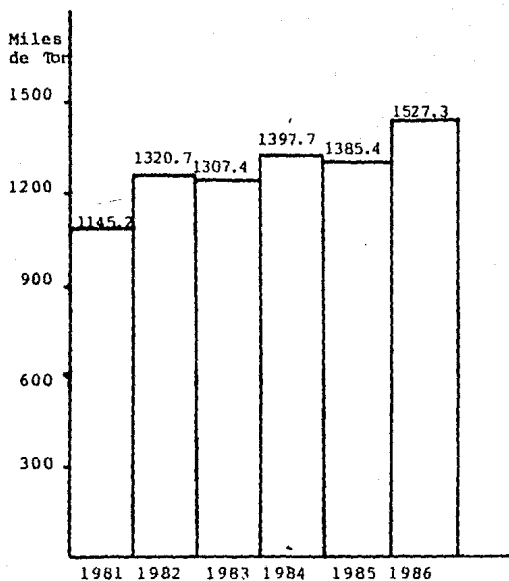
Alternativas para el uso de Melazas de Caña.

Utilización Directa	Fabricación Incluyendo un Proceso de Fermentación.
Alimento para Ganado	-Destilería para la Obtención de ron, aguardiente y alcohol de diversos grados -Levadura para Panificación -Levadura para Alimentación Humana y Animal -Acido Acético, Cítrico y Glutámico -Acetona y Butanol -Acido Láctico -Glicerina -Dextrinas

Por otro lado, la frecuencia de las paradas que provocan problemas en las operaciones de alcalinización, calentamiento y clarificación, el estado técnico de los dosificadores y filtros -- que ocasionan periodos prolongados de clarificación, así como - la centrifugación en periodos inadecuados y con frecuencia, de masas con elevada temperatura, debido al mal estado de los sistemas de enfriamiento de los cristalizadores, son algunos factores que dan como resultado, un alto indice de producción de miel por tonelada de caña molida y diferentes grados de pureza en - la clase de miel producida. (2)

De acuerdo a estadísticas nacionales elaboradas por Azúcar S.A., el nivel de miel producida en los últimos años, ha presentado una tendencia alcista, obteniéndose para 1986, un equivalente del 40% de miel producida respecto al total de azúcar obtenida. La Fig.4 resume la producción anual nacional para este periodo.

En nuestro país, las melazas de caña son utilizadas para - diferentes propósitos, siendo la alimentación animal su principal destino, ya que aproximadamente el 75% de la producción total se destina a este propósito, empleándose directamente ó combinada con una base celulósica. En estos casos, se utiliza como alimento energético para reemplazar cereales, materias amiláceas ó forraje. La Fig. 5 representa, en términos porcentuales, los principales destinos de este subproducto.



(3)

Fig.No.4 Producción Nacional de
Melazas de Caña.Zafras
1981 -1986.

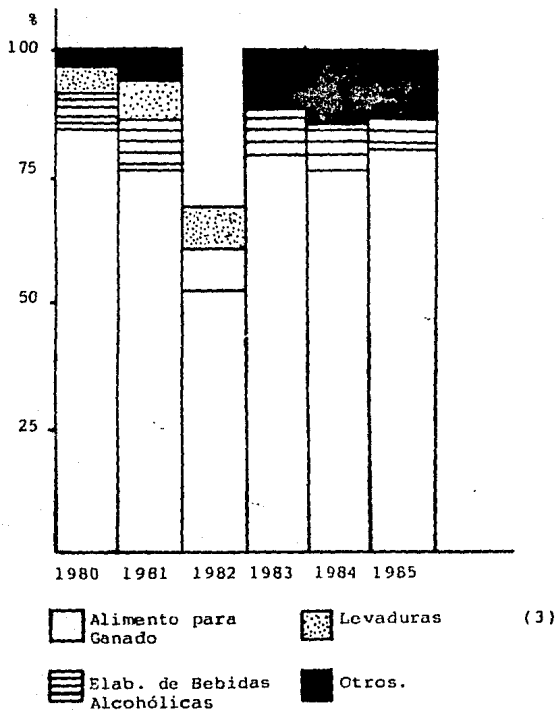


Fig. No.5 Ventas de Miel para Consumo Industrial.

Composición de Mieles.-

El interés de las melazas reside en la diversidad y valor de sus componentes que esencialmente son los mismos que los de la caña, con excepción de la celulosa en diferentes proporciones. La Tabla No.2 muestra un análisis aproximado de melazas de caña, aunque cabe mencionar que esta composición no es la general y básicamente depende de la calidad de la caña que le dió origen, de los modos de cultivo, del uso más o menos intensivo de abonos, así como de la tecnología empleada para realizar la extracción más completa posible.

Tabla No. 2

Composición Aproximada de Melazas de Caña

Componente	Gr/100 ml
Azúcares totales	47.85
Azúcares Reductores	28.10
Nitrógeno como N	0.591
Fósforo como P	0.0795
Calcio	0.744
Magnesio	0.138
Cenizas	8.25

Esta composición convierte a las melazas en un medio complejo e interesante, que le da un considerable valor industrial, ya que utilizándolas como materia prima, origina nuevos productos, mediante procesos de fermentación, principalmente.

Obtención de Alcohol a Partir de Melazas de Caña.-

El material más comunmente usado para la fabricación de este producto mediante el proceso de fermentación es la miel incristalizable, esta última, como se ha mencionado, es un subproducto de la fabricación de azúcar.

En su contenido se encuentran alrededor de 50% de azúcares totales en peso, de los cuales del 35 al 40% es sacarosa y del 10 al 15% son azúcares invertidos (glucosa y fructosa).

Las mieles una vez pesadas o medidas en volumen, son cargadas en un tanque de mezclado donde son diluidas con agua caliente hasta alcanzar una concentración de sólidos entre 20 y 22° Bx. Posteriormente se añade ácido sulfúrico para ajustar el pH entre 4.5 y 5.5 y quedar la mezcla entre 16 y 18° Bx. A esta mezcla se le denomina mosto fresco, que se distribuye en las tinas de fermentaciones donde se mezcla con la levadura preparada y propagada para iniciar el proceso.

Una vez terminada la fermentación que transcurre en un periodo de 48 horas, se obtiene el mosto muerto que es mandado a las operaciones de destilación. La Fig. No. 6 esquematiza las operaciones anteriores.

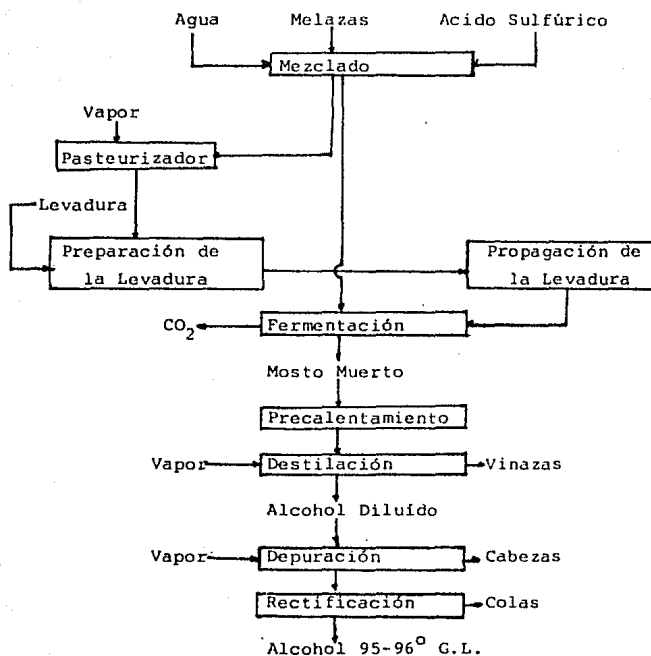


Fig.6 Diagrama de Bloques para la Obtención
de Alcohol por Fermentación.

Oferta y Demanda de Alcohol.-

El alcohol etílico, según la norma de calidad vigente se -
clasifica en un solo tipo con seis grados de calidad:

Grado 1: Anhidro Puro

Grado 2: Anhidro Común

Grado 3: Espíritu Neutro

Grado 4: Alcohol de Calidad

Grado 5: Alcohol Común

Grado 6: Alcohol Estándar

Sin embargo, los grados de calidad que pueden elaborarse en la industria azucarera mexicana con la tecnología disponible son: el alcohol espíritu neutro y los alcoholes de calidad, común y - estándar. En la Tabla 3, se muestran los niveles de impurezas permitidos para cada uno de ellos. (2)

Tabla No. 3

Contenido Máximo de Impurezas en los Alcoholes Producidos
en México.

Tipo de Alcohol	Grados Gay-Lussac	Máx.de Impurezas. (ppm)
Espíritu Neutro	46° Mínimo	75 Máximo
Alcohol de Calidad Superior	96° Mínimo	125 Máximo
Alcohol Estándar	94° Mínimo	300 Máximo

También en el proceso de elaboración de alcohol se obtienen como residuos cabezas y colas, que pueden ser redestilables o vendidas directamente como subproductos a la industria de solventes.

Para 1985 la producción de alcohol que correspondió a 120 millones de litros, el 42.5% se canalizó al sistema comercial nacional. El resto se destinó a la industria, alcanzando un 57.4% del total producido. La tabla No. 4 muestra las ventas de alcohol por destino.

Las melazas de caña, entre otros productos como la caña de azúcar, los cereales, etc., son una materia prima renovable cada año, a partir de la cual se puede producir alcohol de diferentes tipos: alcohol de uso industrial, alcohol destinado al hombre, (alcohol farmacéutico, de perfumería, cosmetológico), alcohol industrial utilizado sin transformación como disolvente o diluyente.

Además el petróleo, escaso y caro, justifica la fabricación de etileno a partir de alcohol obtenido por bioconversión de materiales de origen vegetal.

Por otro lado, y debido a las crecientes necesidades de combustibles, principalmente en las grandes ciudades que presentan problemas de contaminación por plomo, hacen de consideración la utilización de alcohol etílico como antidetonante, por su elevado índice de octanos, y su pequeño calor de combustión. (23) Además, su calor específico ($0.548 \text{ cal/g}^{\circ}\text{C}$) y su presión de vapor (44 mmHg a 20°C), resultan favorables para esta aplicación. Los mejores resultados se consiguen mezclándolo con gasolinas -

Tabla No. 4

Ventas de Alcohol Etílico
por Destino.
(1984 - 1985)

Destino	1984(%)	1985(%)
TOTAL*	107,756*	120,595*
<u>COMERCIO</u>	<u>45.90</u>	<u>42.50</u>
Almacenistas Foráneos	34.53	32.96
Almacenistas en el D.F.	9.36	7.88
Particulares	0.98	0.90
Dependencias Oficiales	0.63	0.63
Ingenios	0.25	
Farmacias	0.089	
Hospitales Generales	0.023	
Otros		0.114
<u>INDUSTRIA</u>	<u>54.1</u>	<u>57.49</u>
Fabricantes de Bebidas	21.39	20.57
Envasadores de Recipientes	15.44	16.23
Fabricantes de Productos Quím.	4.90	6.26
Fabricantes de Perfumes	4.77	4.60
Laboratorios	1.5	1.42
Fabricantes de Vinagre	2.6	2.04
Fabricantes de Pinturas*	1.2	3.12
Fabricantes de Eter	0.9	0.82
Fabricantes de Prod. Varios	0.68	0.79
Fabricantes de Cigarros	0.31	0.29
Fabricantes de Prod. Alimenticios	0.30	0.22

*Miles de Litros

(3)

de diversa procedencia y obtención en la proporción del 10 al 25% (20); aunque según Murtagh (29), una adición de etanol superior al 20% ya implica, necesariamente, modificaciones en los motores de combustión interna.

El etanol presenta un índice de octano superior al de la gasolina y mezclado con ésta, reduce la adición de tetraetilo de plomo.

Estudios económicos realizados en Brasil a consecuencia del Programa de Alcohol implementado hace algunos años, demuestran que el precio de gasolina-alcohol hidratado en proporción de 80-20% respectivamente, es del 80% del valor de un litro de nafta (23), así como de un 85% para una mezcla de gasolina-alcohol anhidro, en la misma proporción.

Algunas características de diferentes mezclas de alcohol-gasolina, se presentan en la Tabla No. 5.

Tabla No.5
Principales Características de Algunas Mezclas de Etanol-Gasolina.

Propiedad	Unidades	Composición de la Mezcla				
		0-100 E-G	10-90 E-G	20-80 E-G	30-70 E-G	100-0 E-G
Densidad	Kg/l	0.733	0.737	0.744	0.751	0.744
Indice de Octano		95.0	96.7	98.3	100	106
Consumo aprox. de Combustible	l/100Km	9.0	8.9	9.2	10.3	12.3

Lo anterior pone de manifiesto la necesidad e importancia de la industria azucarera y alcoholera como punto de partida para la existencia de otras industrias.

Desgraciadamente, el impacto ecológico causado por estas industrias es una consecuencia que no puede pasarse por alto.

Estudios realizados por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, demuestran que la mayor parte de la contaminación orgánica de las cuencas más deterioradas del país, es causada por la industria azucarera. Esta situación ha derivado de la gran cantidad de desechos contaminantes que resultan del proceso de elaboración, entre los que destacan, materia orgánica que acompaña a la caña, la alta temperatura y la falta de oxígeno disuelto, los enjuagues de desecho, la cachaza, así como los humos y polvos originados de la combustión del bagazo y petróleo.

Pero uno de los subproductos con mayor impacto ecológico es la vinaza, obtenida durante la fabricación de alcohol, como descarga de la columna destiladora, lo que puede observarse en la Fig. 6.

Su elevada carga orgánica, que en algunos casos alcanza los 25,000 mg DQO/l, así como la temperatura a la cual se descarga, hacen de ésta un grave problema de contaminación ambiental.

La composición química de la vinaza no es constante, pues varía de acuerdo al mosto de fermentación que le dió origen. Sin embargo, una composición aproximada puede representarse en la Tabla No. 6.

Las consecuencias ambientales de la producción de vinaza, resultan aún mas impactantes si se considera que se produce a -

razón de 11 a 13 veces más que el alcohol producido, por lo que los volúmenes finales son bastante elevados. La Fig.7 muestra la relación de alcohol y vinaza producidos en México, para los últimos años registrados.

Estudios realizados en Brasil, cuya producción alcohólica ha sido realmente importante, principalmente por la utilización de alcohol como combustible, demuestran que las actividades alcohólica y azucarera generan subproductos cuya carga contaminante es equivalente a los desechos domésticos que generarían 51 millones de personas en términos de Demanda Bioquímica de Oxígeno - (DBO_5) (28).

En México, si se compara la producción de vinaza con equivalente poblacional, en términos de desechos orgánicos, resulta particularmente interesante si se considera que la vinaza es tan sólo uno de los muchos elementos contaminantes en el país. La tabla número 7, muestra con mayor claridad lo anterior.

Por otro lado, existen diversas alternativas para el aprovechamiento de la vinaza, debido a que, pese a su elevado contenido de materia orgánica, su composición mineral la hace atractiva para ser utilizada como fertilizante en campos cañeros. Tecnologías más sofisticadas la concentran obteniendo fertilizantes en polvo, pero los problemas de corrosión e incrustación en el equipo, así como el elevado costo del mismo, las hacen poco atractivas para ser utilizadas en nuestro país.

Tabla No. 6.

Composición Aproximada de Vinazas en Destilerías de Alcohol Etilico..

Parámetro	Origen	
	Melazas g/l	Jugo de Caña g/l
Sólidos Totales	81.0	23.7
Sólidos Volátiles	60.0	20.0
Sólidos Fijos	21.0	3.7
Carbón (como C)*	18.2	6.1
Sustancias Reductoras	9.5	7.9
Proteína Cruda**	7.5	1.9
Potasio (K_2O)	7.8	1.20
Sulfatos (SO_4)	6.4	0.6
Calcio (CaO)	3.6	0.7
Cloruros ($NaCl$)	3.0	1.0
Nitrógeno (N)	1.2	0.3
Magnesio (MgO)	1.0	0.2
Fósforo (P_2O_5)	0.2	0.01
DBO ₅	25.2	16.4
Acidez***	4.5	4.5

*Contenido de Carbono= Contenido de Sólidos Orgánicos- 33

**Contenido de Proteína Cruda= Contenido de Nitrógeno x 6.25

***Expresado en Unidades de pH.

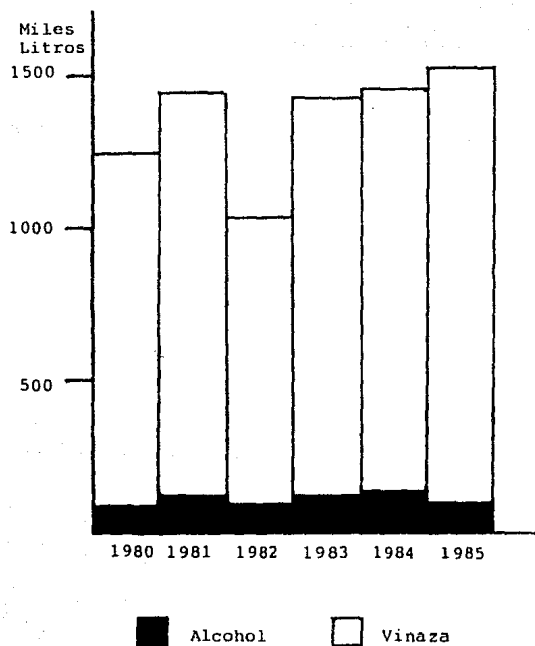


Fig. 7 Producción de Vinaza en
Relación al Alcohol.

Tabla No. 7

Impacto Ambiental de la Vinaza Producida en México
Carga Orgánica Referida al Equivalente Poblacional
en México.

Año	Alcohol Producido (litros)	Vinaza Generada* (litros)	Población Equi- valente. No. de Habitantes.**
1980	87,724,000	109,050,000	82,952
1981	106,887,000	1,336,087,000	933,095
1982	83,390,000	1,042,375,000	793,283
1983	110,918,000	1,386,475,000	1,055,156
1984	113,680,000	1,421,000,000	1,081,430
1985	112,854,000	1,410,670,000	1,081,436

* Volúmen calculado considerando 12.5 veces el alcohol producido en ese año.

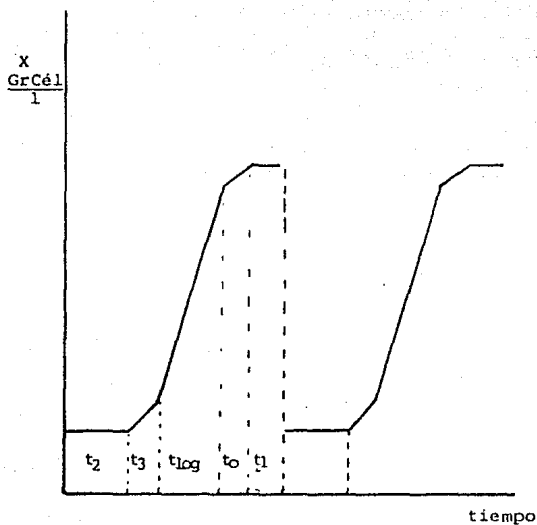
** Valores obtenidos en base a los datos reportados por Monteiro (28)

Teoría del Cultivo Batch.-

El presente trabajo se realizó utilizando un sistema de fermentación continuo, sin embargo, resulta conveniente aclarar algunos conceptos acerca del cultivo por lote, considerando a éste, como un antecedente teórico y práctico del primero y a su vez, poder comparar las ventajas de uno sobre otro, de acuerdo a los resultados obtenidos.

Un cultivo por lote consiste en colocar en un recipiente el medio de cultivo con la composición adecuada y al microorganismo en proporción necesaria para que el crecimiento sea evidente, bajo condiciones ambientales favorables. Conforme va transcurriendo el tiempo, el consumo de sustrato se incrementa y el microorganismo va presentando diferentes etapas de crecimiento que dependen principalmente de la disponibilidad de la fuente de carbono que disminuye conforme transcurre el tiempo. Básicamente son seis etapas que pueden representarse gráficamente en la Fig. 8.(36) en donde:

- I.- Corresponde a la Fase Lag o de Adaptación y la velocidad de crecimiento es igual a cero. Las células realizan fuertes fenómenos de inducción y producción enzimática.
- II.- Fase de Aceleración en donde la velocidad de crecimiento es positiva.
- III.- Fase Logarítmica ó Exponencial en donde la velocidad de crecimiento adquiere su máximo valor.
- IV.- Fase de Retardamiento en donde la velocidad de crecimiento disminuye y se manifiesta por inhibición del crecimiento y falta de sustrato.



t_2 = Tiempo de la Fase Lag
 t_3 = Tiempo de la Fase de Aceleración
 $t_{\log}$ = tiempo logarítmico
 t_0 = Tiempo de la Fase de Declinación
 t_1 = Tiempo Requerido para preparar un lote nuevo

Fig.No.8 Distribución de Tiempos en un Cultivo por Lote.

V.- Fase Estacionaria en donde el crecimiento es nulo.

VI.- Fase de Muerte en donde la velocidad de crecimiento es negati
va.

Las fermentaciones realizadas en este trabajo corresponden a las de Tipo I que según Gaden, son aquellas en las que la forma-
ción de producto está relacionado directamente con la utilización de carbohidratos.(36)

El etanol producido, principal producto de fermentación, se considera como un metabolito asociado al crecimiento, aunque no se pasa por alto la formación de otros compuestos como glicerol, suc-
cinato, acetaldehído y aceite de fusel, como menciona Oura (31). De acuerdo a lo anterior, resulta conveniente analizar la cinética de crecimiento en la fase logarítmica.

Si se define la velocidad de crecimiento celular como:

$$v = \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

y esta velocidad es directamente proporcional a la cantidad de cé-
lulas:

$$\frac{dx}{dt} \propto x \quad (2)$$

eliminando la constante de proporcionalidad:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (3)$$

en donde μ se conoce como Velocidad Específica de Crecimiento. Se se-
parando variables e integrando la expresión de x_0 a x y de t_0 a t :

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{X} = \mu \int_{t_0}^t dt \quad (4)$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu (t - t_0) \quad (5)$$

sacando antilogaritmos a la expresión anterior:

$$\frac{x}{x_0} = e^{\mu(t-t_0)} \quad (6)$$

despejando a x y considerando que $t_0=0$:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (7)$$

ecuación que permite conocer el número de células presentes en el sistema, conociendo la cantidad inicial de éstas y la velocidad específica de crecimiento μ .

En la fase logarítmica, cuando la población inicial se ha duplicado y por lo tanto, $x = 2x_0$, sustituyendo en la ecuación 7, el tiempo "t" corresponderá al tiempo de duplicación o t_d , por lo que:

$$\ln \frac{2x_1}{x_1} = \mu (t - t_0) \quad (8)$$

$$\ln 2 = \mu t_d \quad (9)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (10)$$

expresión que indica el tiempo que tarda la población en duplicar su masa celular.

Si consideramos que existe una relación entre el crecimiento celular y el consumo de sustrato, (1) se tiene que:

$$\frac{dx}{dt} = -Y_{x/s} \frac{ds}{dt} \quad (13)$$

y sustituyendo diferenciales por incrementos y despejando $Y_{x/s}$ que se define como constante de rendimiento celular en base a sustrato, tenemos que:

$$Yx/s = \frac{x}{s} = \frac{(x-x_0)}{(s-s_0)} \quad (13)$$

que es una medida de la eficiencia con que el sustrato es consumido.

Para evaluar la rentabilidad de un proceso, es conveniente analizar la productividad del mismo. En este trabajo se analizarán las productividades obtenidas, en cultivo por lote y en sistema continuo.

Por lo pronto, la productividad para células en un cultivo por lote se define como:

$$\text{Productividad} = P = \frac{\text{Producción Celular}}{\text{Tiempo Total}} \quad (14)$$

Una de las variables que hace menos eficiente el cultivo - por lote, son los tiempos muertos que incrementan el tiempo total invertido para lograr una producción celular determinada.

De acuerdo a la Fig. 8, el tiempo total en un cultivo batch estaría definido como:

Tiempo Total = tiempo requerido en la fase lag (t_0) + tiempo requerido en la fase de aceleración (t_1) + tiempo logarítmico ($t_{\log}$) + tiempo requerido en la fase de desaceleración (t_3) + tiempo requerido para preparar un lote nuevo (t_m).

Partiendo de la expresión 5 en donde t sería el tiempo logarítmico ó tiempo requerido para duplicar la concentración, se tiene:

$$\begin{aligned} \ln \frac{x}{x_0} &= \mu t_{\log} \\ t_{\log} &= \ln (x/x_0) / \mu \end{aligned} \quad (15)$$

Por lo tanto, la expresión 14 equivale a:

$$P = \frac{x}{\text{tiempo}} = \frac{S Yx/s}{\text{tiempo}}$$

$$= \frac{Yx/s (S_0 - S)}{\text{Ln } (x_1/x_0)/\mu + T} \quad (16)$$

en donde $T = t_0 + t_1 + t_2 + t_3 + t_m$

que es la expresión final para calcular la productividad celular en un cultivo por lote.

Teoría del Cultivo Continuo.-

Como se ha mencionado, las fermentaciones realizadas en este trabajo, se efectuaron utilizando un sistema continuo de fermentación que permite mantener a las células creciendo en forma logarítmica, evitando que se manifiesten las fases de desaceleración y -- muerte características del cultivo batch, por medio de la adición de medio fresco en forma continua y a una velocidad de flujo definida previamente.

Todos los sistemas de este tipo consisten en alguna forma de reactor dentro del cual los reactantes fluyen a una velocidad fija, e igualmente emergen productos.(18)

El modelo de fermentador ó reactor utilizado para este propósito se conoce como "reactor tipo tanque agitado", considerado como el mas adecuado para reacciones ó sistemas autocatalíticos, cuya velocidad de reacción se incrementa conforme transcurre el tiempo. El fermentador consiste en un vaso para cultivo, en el cual las células pueden crecer bajo condiciones favorables. El medio de cultivo se alimenta en forma estéril a una velocidad de flujo "F", saliendo también caldo de fermentación a la misma velocidad. El nivel del fermentador se mantiene constante introduciendo un tubo ajustado exactamente al volumen de operación deseado, de tal manera que si se rebasa este nivel, el medio sale instantáneamente. El sistema se mantiene lo suficientemente agitado, para ajustarse al modelo de reactor perfectamente agitado, que permite que el medio que se alimenta, se mezcle y disperse homogéneamente.

El diagrama general para cultivo continuo puede represen -

tarse en la Fig. 10.

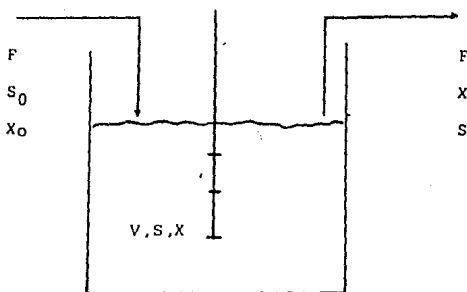


Fig.No.10.Esquema General para un Cultivo Continuo.

en donde:

F = Velocidad de Alimentación del Medio Estéril.

l / Hr

S_0 = Concentración de Sustrato en la Alimentación.

g/l

X_0 = Concentración de células en la alimentación

V = Volumen de operación del fermentador. l

S = Concentración de sustrato en el Fermentador

g/l

X = Concentración de células en el fermentador

g/l

El balance celular en el fermentador queda como sigue:

Acumulación = Entrada - Salida + Crecimiento - Muerte (17)

expresando matemáticamente la ecuación 17, se tiene:

$$V \frac{dX}{dt} = FX_0 - FX + \mu XV - \alpha XV \quad (18)$$

en donde α es la velocidad específica de muerte de las células. Asumiendo que la velocidad específica de crecimiento μ es mucho mayor que la velocidad específica de muerte α :

$$V \frac{dX}{dt} = FX_0 - FX + \mu X \quad (19)$$

dividiendo entre el volumen:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{FX_0}{V} - \frac{FX}{V} + \mu X \quad (20)$$

considerando que el medio de alimentación es estéril y por lo tanto, la concentración de células en la alimentación es igual a cero, se tiene:

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{FX}{V} + \mu X \quad (21)$$

Alcanzando el estado estacionario, no existe cambio de ninguna variable respecto al tiempo, por lo que:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (22)$$

entonces:

$$\frac{FX}{V} = \mu X \quad (23)$$

Un parámetro importante dentro de los sistemas continuos es aquél que define el tiempo de residencia de las partículas presentes, también conocido como espacio-tiempo, que es inversamente proporcional al flujo manejado y representa el tiempo que las partículas permanecen en el fermentador, expresado como:

$$\theta_H = V/F \quad (24)$$

en donde:

Θ_H = Tiempo de Residencia Hidráulico (Hr)

V = Volumen del fermentador l

F = Flujo de alimentación lHr⁻¹

El inverso de Θ_H conocido como espacio-velocidad ó velocidad de dilución D, representa la fracción de volumen del reactor que en el sistema continuo se cambia por unidad de tiempo. Sustituyendo la expresión 24 en la expresión 23, se tiene que:

$$\begin{aligned} DX &= \mu X \\ D &= \mu \end{aligned} \quad (25)$$

ecuación que en cultivo continuo representa la regulación de un parámetro biológico (μ) a través de uno hidráulico como es el flujo de alimentación al sistema.

De la misma manera, puede plantearse un balance global para sustrato dentro del fermentador que conducirá a la expresión general para calcular la producción celular en el sistema, de tal manera que:

Acumulación = Entrada - Salida - Consumo (26)
de Sustrato

$$\frac{dSV}{dt} = FS_0 - FS - \left(\frac{\mu XV}{YX/s} \right) \quad (27)$$

en donde:

S_0 = Concentración de Sustrato en la Alimentación gl⁻¹

S = Concentración de sustrato en el fermentador gl⁻¹

F = Flujo de alimentación y de salida lHr⁻¹

μ = Velocidad específica de crecimiento celular Hr⁻¹

V = Volumen del fermentador l

$Y_{x/s}$ = Rendimiento celular en base a sustrato g/g

En el estado estacionario, cuando no hay variación del sus
trato respecto al tiempo se tiene:

$$\frac{dS}{dt} = 0 \quad (28)$$

por lo que:

$$0 = F(S_0 - S) - \frac{\mu_{xv}}{Y_{x/s}}$$

$$\frac{\mu_{xv}}{Y_{x/s}} = F(S_0 - S)$$

$$\frac{\mu_x}{Y_{x/s}} = \frac{F(S_0 - S)}{V}$$

$$\frac{\mu_x}{Y_{x/s}} = D(S_0 - S)$$

si $\mu = D$, entonces:

$$X = (S_0 - S)Y_{x/s} \quad (29)$$

ecuación que permite calcular la cantidad de células produci-
das, una vez alcanzado el estado estacionario.

La productividad en un cultivo continuo, queda definida
como:

$$\begin{aligned} \text{Productividad} &= P \\ &= \frac{\text{Producción Celular}}{\text{Tiempo de Residencia}} \\ &= \frac{Y_{x/s} (S_0 - S)}{\theta_H} \\ &= \frac{Y_{x/s} (S_0 - S)}{\frac{1}{D}} \\ &= XD \quad (30) \end{aligned}$$

Balance de Sustrato para un Fermentador Continuo Completamente Agitado.-

De acuerdo a la expresión 26, definida para sustrato, se tiene:

$$\frac{dS}{dt} = FS_0 - FS - \frac{XV\mu}{Y_{x/s}} - \frac{PV\beta}{Y_{p/s}} \quad (31)$$

en donde:

F = Flujo Volumétrico l/Hr

S₀ = Concentración Inicial de Sustrato g/l

S = Concentración Final de Sustrato g/l

μ = Velocidad Especifica de Crecimiento Celular Hr⁻¹

X = Concentración Celular g/l

V = Volúmen de Operación l

Y_{x/s} = Rendimiento Celular en base a Sustrato gcél/gsustrato

β = Velocidad Especifica de Producción de Alcohol

P = Producción de Alcohol g/l

Y_{p/s} = Rendimiento de Producto en base a Sustrato $\frac{\text{grEtOH}}{\text{gr sust.}}$

dividiendo entre el volumen:

$$\frac{dS}{dtV} = \frac{FS_0}{V} - \frac{FS}{V} - \frac{X\mu}{Y_{x/s}} - \frac{P\beta}{Y_{p/s}}$$

de acuerdo al inverso de la expresión 24 se tiene:

$$\frac{dS}{dtV} = DS_0 - DS - \frac{X\mu}{Y_{x/s}} - \frac{P\beta}{Y_{p/s}}$$

en el estado estacionario :

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

por lo que:

$$0 = D S_0 - D S - \frac{\mu_X}{Y_{X/S}} - \frac{\beta_P}{Y_{P/S}}$$

$$D(S_0 - S) = \frac{X}{Y_{X/S}} + \frac{\beta_P}{Y_{P/S}} \quad (32)$$

$$D(S_0 - S) - \frac{\mu_X}{Y_{X/S}} = \frac{\beta_P}{Y_{P/S}}$$

$$\frac{Y_{P/S}}{\beta} \left[D(S_0 - S) - \frac{\mu_X}{Y_{X/S}} \right] = P \quad (33)$$

Ecuación que permite conocer la concentración de producto durante un cultivo continuo,

Levaduras.-

Las levaduras son hongos unicelulares, de forma oval, que se reproducen por gemación, formando gemas que producen células-hijas que se separan de la madre y producen nuevas hijas.

Se presenta división celular por la formación de una pared que divide a ambas células. La gemación puede ser unilateral, que es característica de *Saccharomyces cerevisiae*. Su tamaño oscila entre 5 y 10 μ .

Se les denomina organismos facultativos por su capacidad de fermentar la glucosa en presencia de oxígeno ó en ausencia de él, obteniendo diferentes productos finales según el caso. En ambos - existe una degradación común de glucosa hasta la formación de piruvato (Ruta Embden-Meyerhof), y de acuerdo a las condiciones existentes, puede presentarse la formación de alcohol y CO_2 mediante la ruta fermentativa, ó la formación de CO_2 y agua mediante la ruta Embden-Meyerhof y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La amplia diversidad de las levaduras comprende alrededor de 39 géneros y cerca de 350 especies. Las evidencias por las cuales se distinguen las especies son básicamente por su fisiología y en menor grado por su morfología (41).

Como células independientes, tienen una velocidad metabólica mucho más alta que los micelios u hongos mas organizados, muy probablemente por presentar mayor área superficial.

Los requerimientos nutricionales mas frecuentes en levadu --

ms incluyen una fuente de carbono, otra de nitrógeno orgánico e inorgánico, varios minerales (incluyendo compuestos conteniendo elementos traza) y al menos, una fuente de vitaminas.

En general, las levaduras no son afectadas por cambios en el pH y por lo general, todas ellas pueden crecer en un amplio-rango, considerando como adecuado un intervalo de 4.5 a 6.5.

La temperatura óptima de crecimiento depende de la especie en particular. Se puede decir que temperaturas entre 20 y 30° - son adecuadas para la gran mayoría de ellas.

Se ha encontrado que algunas especies son altamente osmofílicas, esto es, que pueden crecer en elevadas concentraciones de azúcares, llegando a requerir hasta un 40% en peso en algunos -- casos.

Por otro lado, algunas especies del género *Debaryomyces*, -- pueden crecer lentamente en medios con elevada concentración de cloruro de sodio. Tales levaduras se les denomina osmodúricas.

Puede decirse que ningún otro tipo de microorganismos ha es tado tan íntimamente relacionado con el progreso del hombre, --- principalmente por los productos obtenidos de los procesos fermentativos, además del esclarecimiento de la bioquímica y de los procesos metabólicos en los microorganismos. (41)

Bioquímica de la Generación de Energía.-

La célula puede utilizar fermentación ó respiración para la

biodegradación de sustrato. En este caso, requiere oxígeno así como un sistema de transporte de electrones. En ausencia de oxígeno, muchos organismos pueden oxidar algunos compuestos orgánicos con la liberación de energía. Parte de la fuente de energía es transformada en CO_2 y el resto es utilizada para la formación de un producto que es liberado por la célula. La sustancia excretada ó producto de fermentación puede ser un ácido ó un alcohol y la vía mas común es la glicólisis (5) que se presenta en la figura 11.

En la primera etapa llamada fosforilación, una molécula de ATP ocupa la posición 6 de la D-Glucosa, formando la glucosa-6-fosfato por acción de la enzima hexoquinasa. Posteriormente, la glucosa-fosfato isomerasa cataliza la isomerización para la formación de la D-Fructosa-6-fosfato. A continuación se efectúa una segunda fosforilación para la obtención de la D-Fructosa-1,6-difosfato, catalizada por la 6-fosfofructoquinasa. El D-Gliceraldehído -3-fosfato resulta de la condensación aldólica de la D-Fructosa-1,6-difosfato por acción de la enzima fructosa difosfato aldolasa, originando dos fosfatos de triosa diferentes, siendo uno de ellos el D-gliceraldehído-3-fosfato, que continua degradándose directamente en las reacciones subsecuentes de la glicólisis.

En la segunda etapa se llevan a cabo, reacciones de óxido-reducción y fosforilación. En esta reacción, el grupo aldehído del gliceraldehído-3-fosfato se oxida a un grupo carboxilo, que con ácido fosfórico, da lugar a la formación del 3-difosfoglicerato. El NAD en su forma oxidada actúa como aceptor electrónico del grupo aldehído. Posteriormente se efectúa la transferencia -

de un grupo fosfato del 3-difosfoglicerato al ADP, catalizada -- por la fosfoglicerato quinasa formando el 3-fosfoglicerato. El grupo fosfato se transfiere a la posición 2 de la 3 del ácido - glicérico por la enzima fosfo-glicero quinasa y a continuación sucede la conversión del 2-fosfoglicerato a fosfoenol piruvato - con la deshidratación del primero, produciéndose un fosfato de - alto contenido energético. La reacción es catalizada por la eno- lasa. A continuación, la transferencia del grupo fosfato desde - el fosfoenol piruvato hasta ATP, produce piruvato libre cataliza- da por la piruvato-quinasa. Este piruvato se descarboxila hasta acetaldehído y CO_2 por la piruvato descarboxilasa.

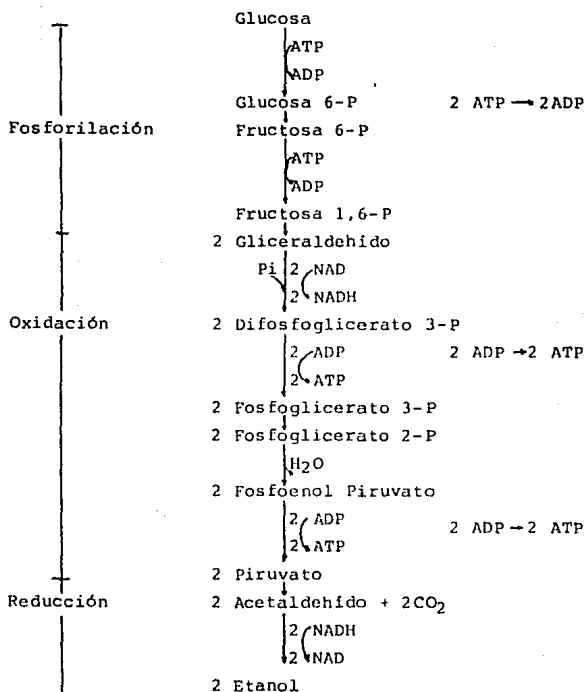
En la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetal- dhído se reduce a etanol, el $\text{NADH} + \text{H}^+$, aporta el potencial reduc- tor, catalizado por la alcohol-deshidrogenasa, produciendo eta- nol y CO_2 .

En el caso de la respiración ó ruta oxidativa, el sustrato como glucosa, es metabolizado hasta piruvato y posteriormente - es degradado aeróbicamente por las reacciones enzimáticas invo- lucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Fig.12), en donde el grupo acetilo del Acetil CoA actúa como combustible, - degradándose hasta CO_2 y átomos de Hidrógeno. Estos últimos son conducidos a través de una secuencia de proteínas transportado- ras de electrones hasta el oxígeno molecular que se reduce para formar agua.

En primer lugar, el piruvato se oxida con pérdida de CO_2 -

a acetil CoA, que reacciona después, enzimáticamente con el oxaloacetato para formar citrato. La oxidación del piruvato es catalizada por el complejo piruvato-deshidrogenasa.

El ácido cítrico se forma por acción de la citrato-sintetasa. El paso siguiente que corresponde a la conversión del citrato en isocitrato, es catalizado por la aconitasa, formando el intermediario cis-aconitato, unido a la enzima. A continuación se manifiesta la oxidación del isocitrato a α -oxoglutarato por la acción de la isocitrato-deshidrogenasa, dependiente del NAD como aceptor electrónico; posteriormente el α -oxoglutarato se oxida a succinil CoA y es efectuada por el complejo de la α -oxoglutarato deshidrogenasa. Dicha reacción es análoga a la oxidación del piruvato a Acetil CoA, participando como coenzimas - el pirofosfato de Tiamina, el ácido lipoico, el CoA, el FAD y - el NAD. Posteriormente, el succinil CoA experimenta la pérdida del grupo CoA en una reacción de conservación de energía con el difosfato de guanosina (GDP) y el fosfato, catalizando la reacción la enzima succinil-CoA-sintetasa formando succinato, que a su vez es oxidado a fumarato por una flavoproteína, la succinato-deshidrogenasa que contiene FAD unido covalentemente. A continuación se efectúa la hidratación reversible del fumarato a l-malato por la fumarato-hidratasa. Finalmente, la última reacción del ciclo, corresponde a la oxidación del l-malato a oxalacetato en presencia de la l-malato, deshidrogenasa, dependiente del NAD.



(5)

Fig.11 Ruta Glicolítica para la Formación de Etanol.

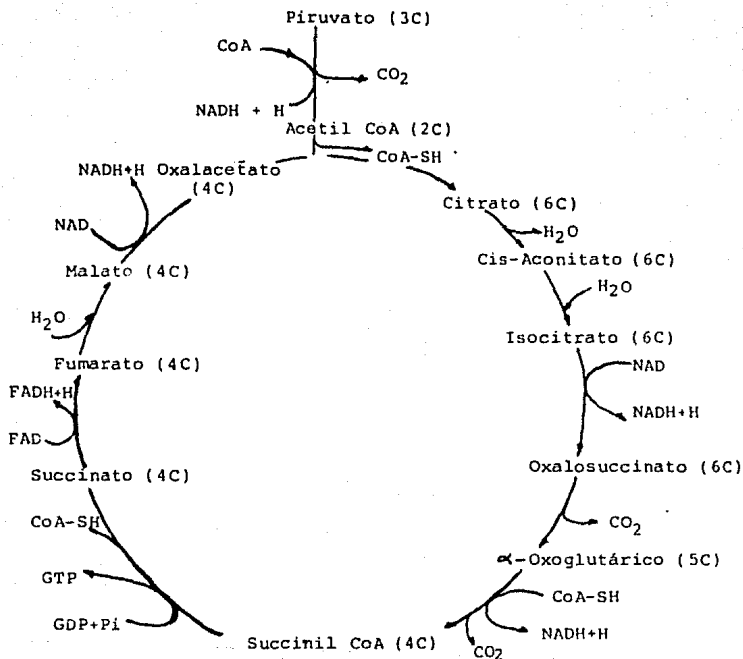


Fig.12 Ciclo de los Acidos Tricarboxilicos.

OBJETIVOS:

En base a la información anterior que muestra la necesidad de reutilizar los efluentes de la industria azucarera, así como de las destilerías, se proponen los siguientes objetivos:

I.- Establecer la influencia que tiene la Velocidad de Dilución, la Velocidad de Agitación y la Concentración de Sustrato en un Sistema Continuo de Fermentación.

II.- De acuerdo al objetivo anterior, establecer las condiciones mas adecuadas para la Recirculación de Vinazas dentro de la fermentación alcohólica.

III.- Evaluar la posibilidad de la Recirculación de Vinaza, analizando los efectos ambientales que este proceso ocasiona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Medio de Cultivo.-

De acuerdo con los resultados obtenidos por Rodríguez y García, (39) respecto a la concentración mas adecuada de sales en función de la concentración de sustrato, y en base a la composición elemental de las levaduras, propuesta por Aiba (1) y presentada en la Tabla 8, se diseñó el medio de cultivo, suministrando las sales necesarias en base a un 2% de sustrato, para las diferentes cinéticas desarrolladas.

Tomando como base un rendimiento celular aerobio $Y_{x/s}$ igual a 0.5 gr células/gr de sustrato consumido, se tiene:

a) Nitrógeno.- Suministrado como $(NH_4)_2SO_4$ con P.M. = 132.14 -- gr/grmol:

$$\frac{80 \text{ mg N}}{\text{gr cél}} \times \frac{0.5 \text{ gr célula}}{\text{gr sustrato}} = \frac{40 \text{ mg N}}{\text{gr sustrato}}$$

$$\frac{40 \text{ mg N}}{\text{g sust.}} \times \frac{132.14 \text{ mg } (NH_4)_2SO_4}{28 \text{ mg N}} = \frac{188.73 \text{ mg } (NH_4)_2SO_4}{\text{gr sustrato}}$$

b) Fósforo.- Suministrado como Fosfato Dídico de Potasio.---

$$KH_2PO_4. \text{ P.M.} = 136.09 \text{ g/gmol}$$

$$\frac{26 \text{ mg P}}{\text{gr cél}} \times \frac{136.09 \text{ mg } KH_2PO_4}{31 \text{ mg P}} = \frac{57.07 \text{ mg } KH_2PO_4}{\text{gr sustrato}}$$

c) Azufre.- Suministrado como Sulfato de Amonio. P.M.=132.14

gr/gr mol

$$\frac{2.5 \text{ mg S}}{\text{gr cél}} \times \frac{0.5 \text{ gr cél}}{\text{gr sustrato}} = \frac{1.25 \text{ mg S}}{\text{gr sustrato}}$$

$$\frac{1.25 \text{ mgr S}}{\text{gr sust}} \times \frac{132.14 \text{ mg } (NH_4)_2SO_4}{32 \text{ mg Azufre}} = \frac{5.16 \text{ mg } (NH_4)_2SO_4}{\text{gr sustrato}}$$

d) Potasio.- Suministrado como Fosfato Diácido de Potasio --

KH_2PO_4 . P.M. = 136.09 g/grmol

$$\frac{10 \text{ mg K}}{\text{gr cél}} \times \frac{0.5 \text{ gr cél}}{\text{gr sustrato}} = \frac{5 \text{ mg K}}{\text{gr sust.}}$$

$$\frac{5 \text{ mg K}}{\text{gr sust}} \times \frac{136.09 \text{ gr KH}_2\text{PO}_4}{39 \text{ mg K}} = \frac{17.55 \text{ gr KH}_2\text{PO}_4}{\text{gr sustrato}}$$

e) Magnesio.- Suministrado como Sulfato de Magnesio Heptahidrato.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.M. = 246.48 gr/ grmol

$$\frac{5 \text{ mg Mg}}{\text{gr cél}} \times \frac{0.5 \text{ gr cél}}{\text{gr sustrato}} = \frac{2.5 \text{ mg Mg}}{\text{gr sustrato}}$$

$$\frac{2.5 \text{ mg Mg}}{\text{gr sustrato}} \times \frac{246.48 \text{ gr MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{243 \text{ g Mg}} = \frac{25.35 \text{ mg MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{\text{gr sustrato}}$$

f) Calcio.- Suministrado como Cloruro de Calcio Dihidratado -

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.M. = 147.2 gr/grmol

$$\frac{3 \text{ mg Ca}}{\text{gr cél}} \times \frac{0.5 \text{ gr cél}}{\text{gr sustrato}} = \frac{1.5 \text{ mg Ca}}{\text{gr sustrato}}$$

$$\frac{1.5 \text{ mg Ca}}{\text{gr sustrato}} \times \frac{147.2 \text{ mg CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{40 \text{ mg Ca}} = \frac{5.52 \text{ mg CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{gr sustrato}}$$

Los experimentos realizados por Rodríguez y García (39) demostraron que la célula no presentaba inhibición por presión osmótica, si las sales minerales se adicionaban en base a una concentración de sustrato de 2%. De acuerdo a este hecho, la composición del medio de cultivo fué la siguiente:

- Nitrógeno:

$$\frac{188.73 \text{ mg (NH}_4)_2\text{SO}_4}{\text{gr Sustrato}} \times \frac{20 \text{ gr Sustrato}}{\text{litro}} = \frac{3774.6 \text{ mg (NH}_4)_2\text{SO}_4}{\text{litro medio}}$$

- Fósforo :

$$\frac{57.07 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4}{\text{gr sustrato}} \times \frac{20 \text{ gr Sustrato}}{\text{litro medio}} = \frac{1141.9 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4}{\text{litro medio}}$$

- Azufre:

De acuerdo a los cálculos, las necesidades de azufre que-

dan cubiertas por la cantidad necesaria para satisfacer los -
requerimientos de nitrógeno.

- Potasio:

Como en el inciso anterior, los requerimientos de potasio
quedan cubiertos por la cantidad adicionada de fosfato diácido
de potasio necesaria para satisfacer la demanda de fósforo.

- Magnesio:

$$\frac{2.5 \text{ mg MgSO}_4}{\text{gr sustrato}} \times \frac{20 \text{ gr Sustrato}}{\text{litro medio}} = \frac{50 \text{ mg MgSO}_4}{\text{litro medio}}$$

- Calcio:

$$\frac{5.52 \text{ mg CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{gr sustrato}} \times \frac{20 \text{ gr sustrato}}{\text{litro medio}} = \frac{110.4 \text{ mg CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{litro medio}}$$

Tabla 8
Composición Elemental de 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

(1)

Determinación de Azúcares.-

La determinación de azúcares totales presentes, se llevó a cabo utilizando el método del fenol-sulfúrico, basado en la generación de una coloración anaranjada que es proporcional al contenido de azúcares presentes en la muestra (39).

Se construyó una curva tipo que relacionara concentración y absorbancia, de tal manera que en el transcurso de las fermentaciones, la concentración de sustrato se determinó por extrapolación en la curva obtenida.

La curva tipo se construyó partiendo de una solución de dextrosa al 10%. Fué necesario diluir esta solución 1000 veces para obtener una solución cuya concentración de azúcares proporcionara una lectura de absorbancia que cayera dentro de la gama del espectrofotómetro utilizado. Para ello, se preparó una serie de tubos colocando en cada uno de ellos 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 ml de la solución diluida, completando a un mililitro con agua destilada en los casos necesarios. Se preparó un blanco con agua destilada. Inmediatamente se adicionó a cada tubo, 1 ml de solución de fenol al 5%, posteriormente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, cuidando de que la mezcla no se proyectara. Se agitó en el Vortex (Super Mixer Lab-Line Instruments). Se colocaron los tubos en un baño de hielo, hasta que alcanzaran temperatura ambiente. Se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch and Lomb) a una longitud de onda de 490 nm. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

Conteo Celular.-

El número de células en un cultivo puede medirse por cuenta directa al microscopio. El hematocitómetro, conocido también como cámara de Neubauer para conteo de células sanguíneas, se utiliza para este propósito cuando se tienen células con un tamaño superior a $3 \mu\text{m}$ de diámetro. Esta cámara consiste en un portaobjetos en cuyo centro se localizan dos cuadrículas trazadas superficialmente con cuadros de área conocida. Esta cuadrícula está dividida en nueve cuadros primarios de 1 mm^2 de área cada uno, que son los mas utilizados para el conteo de leucocitos. Estos cuadros están subdivididos en en 25 cuadros secundarios de 0.2 mm^2 de área. El portaobjetos presenta una hendidura de exactamente 0.01 mm de profundidad. Los cuadros secundarios están divididos en 16 cuadros mas pequeños de 0.05 mm^2 de superficie Figs. 12 y 13. Al efectuar el conteo, se tiene una relación de número de células por unidad de volumen.

Para llevar a cabo la cuenta celular en el transcurso de las fermentaciones, se tomó 1 ml de la muestra extraída del fermentador, diluyéndose ésta diez veces y agitándola con el Vortex. De esta solución se colocó una gota en cada una de las cuadrículas de la cámara de conteo, localizando en el campo del microscopio, el cuadro primario central y efectuando el conteo en cinco de los veinticinco cuadros secundarios. La observación se llevó a cabo utilizando el objetivo $40\times$ del microscopio (Zuiho No. 67223). Fig. 13-b

Las células por unidad de volumen se obtienen de acuerdo a la relación:

$$\frac{\text{No. Cél}}{1} = \frac{\text{Células en}}{5 \text{ cuadros}} \times 5 \times 10^7 \times \text{Dilución}$$

en donde 10^7 corresponde al factor de conversión de mm^3 a litros y el factor de dilución es igual a 10. La Fig. 13-b representa esquemáticamente la cámara de conteo y los cuadros secundarios localizados para la cuenta de células.

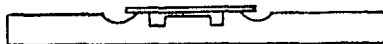
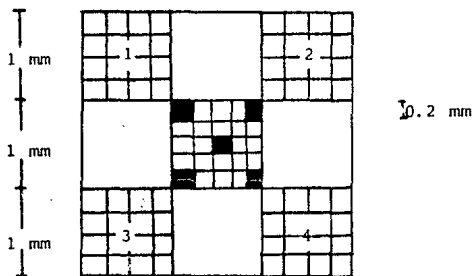


Fig. 12 Corte Longitudinal de Sección Transversal de la Cámara de Conteo con cubroobjetos en la Superficie.



Fig. 13 a) Sección Transversal que Muestra la Profundidad de la Cámara.



b) Cuadrante de la Cámara de Neubauer para realizar el Conteo Celular.

Para obtener resultados en unidades de peso seco por litro, se elaboró una curva que relacionara cantidad de células con su equivalente en gramos, de tal manera que se facilitaran los cálculos posteriores para rendimiento celular y productividades.

La determinación anterior se obtuvo preparando 14 matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo líquido (Medio Dextrosa-Saburoud), esterilizados en autoclave a 1.1 Kg/cm^2 durante 20 minutos.

Se tomaron 2 tubos mantenidos a 40°C conteniendo al microorganismo en cuestión en medio sólido. Se efectuó una suspensión celular con agua destilada estéril en cada uno de ellos, tomándose 5 ml de ésta para sembrar los matraces conteniendo medio líquido, incubándose durante 24 horas a 28°C y con agitación a 50 RPM en la incubadora (Modelo Lab-Line).

Concluida la propagación, se sembraron los doce matraces restantes, conteniendo medio líquido y utilizando en inóculo en proporción de 10%. Se incubaron a 28°C y 50 RPM.

El muestreo se realizó a intervalos de dos horas y con ayuda de un equipo Millipore de filtración, se llevó a cabo la separación celular, utilizando tres ml de muestra y membranas Millipore mantenidas en el desecador, previamente secadas en la estufa (Thelco Modelo 28) y pesadas cuidadosamente en balanza analítica (Mettler H-20).

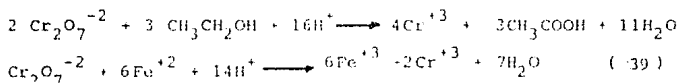
Cada filtración se llevó a cabo por duplicado secando nuevamente las membranas a 80°C .

Simultáneamente a la filtración, se llevó a cabo el con-

teo celular, de acuerdo al método descrito anteriormente.

Determinación de Alcohol.-

La determinación de alcohol durante el transcurso de las fermentaciones, se llevó a cabo utilizando el método del dicromato de potasio que consiste en hacer reaccionar el alcohol con una solución de dicromato de potasio de concentración conocida, cuantificando el dicromato residual por medio de titulación con sulfato ferroso amoniacal en medio ácido, de acuerdo a las siguientes reacciones:



Para lo anterior se tomaron 25 ml de la muestra extraída del fermentador y se colocaron en un equipo de destilación, consistente en un matraz balón de 250 ml, una columna y un refrigerante. Se destiló la muestra y el destilado se aforó a 25 ml con el objeto de garantizar que la concentración de alcohol en el destilado fuera la misma que en la muestra original.

Simultáneamente y por duplicado, se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 5 ml de solución de dicromato de potasio 0.4 N. Se agregaron 30 ml de agua destilada y se colocaron en un baño de hielo hasta que alcanzaran una temperatura de 40°C aproximadamente. Se adicionaron 30 ml de

ácido sulfúrico concentrado, procurando que la solución no -- se proyectara demasiado.

Cuando la mezcla alcanzó los 25°C, se agregó 1 ml del destilado para las muestras que no contuvieran demasiado alcohol y 0.5 ml ó menos para aquéllas que presentarían un contenido de etanol superior al 5%. Estas soluciones se titularon con Sulfato Ferroso Amoniacal 0.1 N, utilizando 1-10 fenantrolina como indicador. Para cada determinación se preparó un blanco, - sustituyendo la muestra de destilado por un ml de agua destilada.

La relación que proporciona los gramos de etanol por litro es la siguiente:

$$\frac{\text{Gr ETOH}}{1} = \frac{(\text{MSFAB} - \text{MSFAM})(47000)(\text{NSFA})}{(3)(\text{V.M.D.})(1000)}$$

en donde:

Gr ETOH = gramos de etanol /litro

MSFAB = ml de Sulfato Ferroso Amoniacal gastados en el blanco

MSFAM = ml de Sulfato Ferroso Amoniacal gastados en la muestra

NSFA = Normalidad del Sulfato Ferroso Amoniacal

VMD = Volumen de muestra

Conservación del Microorganismo.-

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para este trabajo, fué anteriormente aislada de un agave tequilero y proporcionada por el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.

Para evitar las resiembras frecuentes a lo largo del trabajo que podrían causar mutaciones en el microorganismo, se prepararon desde el inicio, una cantidad abundante de tubos de ensaye con medio de cultivo en la forma de agar inclinado, conteniendo al microorganismo en la siembra conocida como estriado. El medio se preparó al 5% de azúcares, utilizando melaza como fuente de carbono, adicionando las sales de acuerdo al medio previamente diseñado. La siembra se llevó a cabo con asa de Cromo-Niquel en la campana de flujo laminar y en condiciones estériles. Los tubos sembrados se incubaron a 28°C en incubadora durante 48 horas.

Una vez presentado el crecimiento, se observaron diez tubos al azar, para asegurar la ausencia de contaminación. Finalmente se sellaron con papel parafilm para evitar evaporación del gel, manteniéndose en refrigeración a 4°C.

Demanda Química de Oxígeno (DQO) .-

La determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), es una medida equivalente de una porción de materia orgánica en

una muestra que es susceptible de oxidarse por un agente altamente oxidante. En general, toda la materia orgánica se destruye por una mezcla de ácido sulfúrico y dicromato. La muestra se refluja con cantidades conocidas de dicromato y ácido sulfúrico. El exceso de dicromato es titulado con una solución de sulfato ferroso amoniacal. La cantidad de materia orgánica oxidable, es proporcional a la cantidad de dicromato consumido. (43)

Para llevar a cabo la determinación, se prepararon 8 matases balón de 250 ml con perlas de vidrio y una pequeña cantidad de sulfato mercúrico utilizado como catalizador. Se colocaron 10 ml de Dicromato de Potasio 0.25N y 30 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se adicionaron por duplicado 0.5, 1.0 y 1.5 ml de muestra previamente diluida a 100 veces, completando a 10 ml con agua destilada según el caso, corriendo un blanco con 10 ml de agua destilada para cada determinación, también por duplicado.

Las muestras se sometieron a digestión a 145°C en Parrilla de calentamiento durante dos horas, contadas a partir del inicio de la ebullición. Se utilizaron refrigerantes Friedrich como condensadores de los vapores producidos durante la digestión.

Terminada la digestión y ya frías las muestras, se tituló el Dicromato de Potasio remanente con Sulfato Ferroso Ammoniacal 0.1 N, utilizando una solución de 1-10 fenantrolina como indicador. Los cálculos se efectuaron de acuerdo a la relación:

$$\frac{\text{mg DQO}}{1} = \frac{(a-b) \cdot N (8000)(Dln.)}{\text{ml muestra}}$$

en donde:

DQO = Demanda Bioquímica de Oxígeno

a = ml de Sulfato Ferroso Amoniacal gastados en
el blanco

b = ml de Sulfato Ferroso Amoniacal gastados en
la muestra

N = Normalidad del Sulfato Ferroso Amoniacal

8000 = Miliequivalentes de Oxígeno.

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)₅ .-

La Demanda Bioquímica de Oxígeno, es una medida de la can
tidad de oxígeno requerido por una determinada población de mi
croorganismos, para degradar la materia orgánica existente en
una muestra determinada.

La degradación de la materia orgánica llevada a cabo por
los microorganismos presentes en la muestra, en condiciones -
aerobias, es llevada hasta una oxidación completa, produciendo
dióxido de carbono, agua y amoníaco.

Esta determinación se basa en la cuantificación de oxíge
no disuelto en diferentes intervalos de tiempo, con la adición
de una solución divalente de manganeso. El oxígeno presente, o
xida una cantidad equivalente de hidróxido de manganeso, obte
niéndose hidróxidos con niveles de valencias mayores, formando
un precipitado café. En presencia de iones yoduro, y seguido de

una acidificación, el manganeso oxidado vuelve a su estado divalente, liberando iodo, con una cantidad equivalente al contenido original de oxígeno disuelto en la muestra. El iodo se titula con tiosulfato de sodio.

Para efectuar la prueba, fué necesario preparar el agua - de dilución adicionando 1 ml/l de las soluciones de Sulfato de Magnesio, Cloruro de Calcio, Cloruro Férrico y solución reguladora de fosfatos, de acuerdo a las concentraciones que el método especifica. (43)

Dicha agua de dilución se conservó a 20°C durante 24 ho--ras, con el propósito de que se saturara de oxígeno a la temperatura a la que se efectuaría la prueba.

Haciendo una dilución 1:100 para la muestra en cuestión, - se colocaron 0.5, 1.0 y 1.5 ml de ésta solución en las bote--llas de dilución especialmente utilizadas para ésta prueba. - Cada prueba se realizó por triplicado, preparando dos blancos a la entrada, con el fin de determinar la cantidad de oxígeno - disuelto inicial, así como dos blancos de salida, para compro--bar que no hubiese variación en el contenido de oxígeno durante el experimento.

Se llenaron las botellas con el agua de dilución por medio de sifón, con el objeto de evitar la entrada de oxígeno a tra--ves de burbujeo. Se taparon colocando, además del tapón esmerilado, un tapón plástico a manera de sello hidráulico, con el - fin de evitar la entrada de aire.

Se determinó el oxígeno inicial a las botellas del blanco y el resto se incubaron a 20°C durante cinco días.

El oxígeno remanente se determinó por el método de Win - kler modificado, adicionando 2 ml de solución de álcali-yoduro azida, 2 ml de solución de sulfato manganoso y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado una vez fijado el oxígeno, con una solución de Tiosulfato de Sodio 0.1 N, utilizando almidón como indicador. (43).

Cálculos:

$$\frac{\text{mg}}{1} \text{ O.D.} = \frac{(\text{ml T.S.})(\text{N T.S.})(\text{Equiv. O}_2)(1000)}{\text{ml muestra}}$$

y:

$$\text{mg/l DBO}_5 = \frac{(\text{O.Di}) - (\text{O.D. al } 5^{\circ} \text{ día})}{\% \text{ Dilución en Decimales}}$$

en donde:

O.D. = Oxígeno Disuelto

T.S. = Tiosulfato de Sodio gastado en la titulación

N.T.S. = Normalidad del Tiosulfato de Sodio

O.Di. = Oxígeno Disuelto inicial

Sólidos en Todas sus Formas.-

Los sólidos se refieren a la totalidad de la materia que queda en un recipiente tarado, después de la evaporación de una muestra determinada y del secado subsecuente a una temperatura definida.

El residuo remanente representa sólo aquellos materiales presentes en la muestra que tienen presión de vapor insignificante a 105°C.

Los sólidos volátiles son una medida de la cantidad de materia orgánica presente. Esta prueba consiste en un procedi -- miento de combustión, en el cual, la materia orgánica es con - vertida en CO_2 y agua. La temperatura se controla para preve - nir la corrosión y volatilización de las sustancias inorgánicas. La pérdida de peso se intepr~~ta~~ en términos de materia orgáni ca.

El ~~método~~ consiste en calcinar la muestra a 550 °C. A esta temperatura, la mayoría de las sales inorgánicas son estables, a excepción del carbonato de magnesio. (43)

Para la determinación de sólidos totales, fué necesario tarar las cápsulas de porcelana y una vez determinado el peso constante, se adicionaron 10 ml de muestra, colocándose en la estufa (Thelco Modelo 28) a 105°C durante un día. Una vez - secas las muestras, se colocaron en el desecador y posteriormen te se pesaron en balanza analítica (Mettler H-20). Por diferen cia de pesos y dividiendo entre el volumen de muestra, se calculó la cantidad de sólidos totales presente.

Los Sólidos Volátiles Totales (SVT) se determinaron cal cinando los Sólidos Totales a una temperatura de 550°C durante una hora en la mufla (Caisa 434 D.L.) . De ésta forma se garan tiza que toda la materia orgánica presente ha sido eliminada.

La diferencia de pesos entre la cápsula después de la cal cinación y el peso de la misma después de secar a 105°C, divi dido entre el volumen de muestra, proporcionan los sólidos volá tiles existentes. La suma de los Sólidos Volátiles Totales (que representan la materia orgánica presente) y los sólidos tota -

les fijos (que corresponden a la materia inorgánica existente), proporcionan los Sólidos Totales presentes.

La determinación de los sólidos en todas sus formas, son de gran importancia para el diseño de sistemas de tratamiento primario de efluentes.

Para la determinación de Sólidos Volátiles Totales (SVT) -- fué necesario preparar una serie de crisoles Gooch con una cámara de asbesto, con el fin de obtener un lecho para retener el material suspendido en la muestra. Se determinó el peso constante, y se colocaron 5 ó 10 ml de muestra, dependiendo de la facilidad del crisol para retener ó dejar pasar la muestra con la ayuda de vacío. Filtrada la muestra, se secaron los crisoles a 105°C por una hora y se pesaron una vez fríos. La diferencia entre éste y el obtenido a peso constante, dividido entre el volumen de muestra, proporciona los Sólidos Suspendidos Totales.

Los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), se obtuvieron calculando los Sólidos Totales a 550°C por una hora y por diferencia entre el peso después de secar a 105°C y el peso después de calcinar a 550°C , dividiendo ésta diferencia entre el volumen de muestra, se obtuvieron los Sólidos Suspendidos Volátiles.

Montaje de las Fermentaciones.-

Las fermentaciones correspondientes para la realización de este trabajo, se llevaron a cabo en el Fermentador Virtis Mode

lo 43-100 del Laboratorio 16 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.

El medio de crecimiento para la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada, se preparó con melazas de caña proporcionadas por la Planta Piloto de Fermentaciones del mismo Departamento.

Fué necesario llevar a cabo la clarificación de la miel con el propósito de eliminar las sales de calcio y Magnesio existentes en la melaza cruda.

La clarificación consistió en hacer una dilución 1:1 en volumen de la melaza cruda y posteriormente acidularla con ácido sulfúrico concentrado hasta alcanzar un pH de 3.5. Se sometió a ebullición por 5 minutos y se mantuvo en refrigeración - con objeto de lograr la precipitación de las sales presentes y (39) se determinó el contenido de azúcares totales presentes por el método del Fenol-Sulfúrico, descrito anteriormente.

En base a este contenido de azúcares se preparó el medio de fermentación a la concentración de sustrato deseada, adicionando además, las sales de Calcio, Magnesio, Nitrógeno y Potasio, requeridas por la levadura y de acuerdo al medio previamente diseñado.

Propagación.-

Antes de inocular el fermentador, se efectuó la propagación, partiendo de uno de los tubos mantenidos en refrigeración conteniendo a la cepa de levadura.

Con el objeto de arrastrar las células crecidas en la superficie del agar en el tubo inclinado, se hizo una suspensión con agua destilada estéril, tomándose 5 ml de dicha suspensión para sembrar un matraz conteniendo 50 ml del medio de fermentación.

A las 24 horas, se resembraron dos matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio estéril con 5 ml del inóculo propagado en el primer matraz. A las 24 horas siguientes, se sembraron dos matraces Erlenmeyer de 1 litro, conteniendo 200 ml del medio de fermentación, adicionando a cada uno de ellos, 20 ml de inóculo propagado el día anterior.

Los matraces con el medio sembrado se incubaron a 28°C -- con una velocidad de agitación de 100 RPM, con el propósito de favorecer la aireación y en consecuencia, el crecimiento celular.

A las 24 horas siguientes se inoculó el fermentador con los matraces sembrados el día anterior.

Las propagaciones y la inoculación del fermentador se realizaron en la campana de flujo laminar en condiciones estériles.

Una vez inoculado, el fermentador se acopló a la parte complementaria del equipo, haciendo las conexiones necesarias para mantener temperatura, velocidad de agitación y aireación constantes. La figura 14 es un diagrama con las partes fundamentales del equipo.

Las muestras tomadas para el seguimiento de las fermentaciones, se sacaron a intervalos de 2 ó 3 horas, según la con--

centración de sustrato inicial.

Una vez concluido el cultivo por lote, se conectaron las mangueras de alimentación de medio fresco y de salida de mosto, controlando los flujos deseados con bombas peristálticas (Mas-terflex). El fermentador se operó a 4 litros de capacidad, con-
trolando el volumen con un tubo a nivel.

Las condiciones de trabajo para las cinéticas realizadas se presentan en la Tabla 9.

Tabla No. 9

Condiciones de Trabajo para las Cinéticas
Desarrolladas en Cultivo Continuo.

Cinética	S g/l	T °C	pH	Agitación RPM	Dilución Hr ⁻¹
1	50	30	3.5-4.0	50	.1
2	50	30	3.5-4.0	100	.1
3	50	30	3.5-4.0	250	.1,.2,.3
4	150	30	3.5-4.0	100	.1
5	100	30	3.5-4.0	300	.1
6	100	30	3.5-4.0	150	.2
7	100	30	3.5-4.0	150	.3
8	150	30	3.5-4.0	150	.1
9	150	30	3.5-4.0	150	.2
10	150	30	3.5-4.0	150	.3

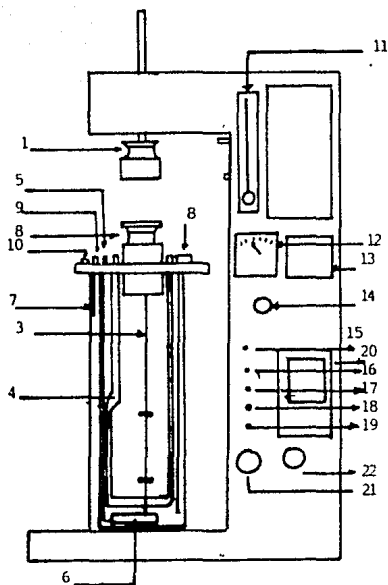


Fig. No. 14 Diagrama del Fermentador Virtis.

en donde:

- 1.- Valero Magnético
- 2.- Arreglo Magnético Exterior
- 3.- Agitador
- 4.- Circuito de Control de Temperatura
- 5.- Toma de Muestra
- 6.- Difusor de Aire
- 7.- Control de Nivel
- 8.- Entrada para Inoculación
- 9.- Alimentación de Medio Fresco
- 10.- Salida de Mosto
- 11.- Rotámetro
- 12.- Indicador de Velocidad de Agitación
- 13.- Indicador de Temperatura
- 14.- Selector de Velocidad de Agitación
- 15.- Switch de Agitación
- 16.- Switch de Bomba de Agua
- 17.- Switch del Calentador
- 18.- Switch del Graficador
- 19.- Switch del sistema de Refrigeración
- 20.- Graficador de Temperatura
- 21.- Manómetro de Aire
- 22.- Válvula de Entrada de Aire

RESULTADOS Y DISCUSION

La experimentación realizada, puede dividirse en las siguientes etapas:

- a) Experimentación Previa
- b) Experimentación en Cultivo por Lote
- c) Experimentación en Cultivo Continuo
- d) Experimentación en Cultivo Continuo con Reciclado de Vinaza.

a) Experimentación Previa.-

En esta etapa se realizaron cinéticas de fermentación en matraces, con objeto de conocer los rangos de velocidad de crecimiento que proporcionaba la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, bajo diferentes medios y condiciones. Los medios de cultivo utilizados para este propósito fueron medio en base a sacarosa a una concentración de 4% para sustrato, medio de infusión papa-dextrosa y medio melaza al 4%, adicionando los micronutrientes en forma de sales, de acuerdo al medio diseñado previamente y considerando los resultados de Rodríguez y García (39), que establecen una proporción de sales en base a un 2% de azúcares como la más adecuada para esta levadura.

Por tratarse de un microorganismo facultativo, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada, puede desarrollarse en condiciones de aereación o en ausencia de ella. En el primer caso, su metabolismo es orientado a la producción de CO₂, agua y bio

masa. En el segundo caso, los productos del metabolismo son alcohol y CO_2 con una manifestación menos intensa de crecimiento que la obtenida bajo condiciones aerobias. En consecuencia, los valores de velocidad de crecimiento serán diferentes en ambos casos y se presentan en la tabla 10.

Tabla No. 10

Velocidades de Crecimiento Obtenidas para Diferentes
Medios de Cultivo para la Cepa Utilizada.

Medio de Cultivo	Velocidad de Crecimiento (Hr ⁻¹)	Condición
Papa-Dextrosa	0.30	Aeróbica
Papa-Dextrosa	0.33	Anaeróbica
Sacarosa 4%	0.46	Aeróbica
Sacarosa 4%	0.33	Anaeróbica
Melaza 4%	0.34	Aeróbica
Melaza 4%	0.30	Anaeróbica

De acuerdo a los valores de la Tabla 10, se tiene un valor máximo de velocidad de crecimiento de 0.46 Hr^{-1} , por lo que este valor sirvió como referencia para establecer los niveles de variación en la velocidad de dilución en los experimentos en cultivo continuo.

b) Experimentos en Cultivo por Lote.-

Con el propósito de establecer las mejores condiciones de operación del cultivo continuo y estudiar el efecto que cada variable involucrada en un sistema de este tipo tiene sobre los parámetros establecidos previamente, se desarrolló una serie de fermentaciones cuyos resultados se presentan en la Tabla 12.

Generalmente, a cada fermentación en cultivo continuo, le precedía una en cultivo por lote. Por ello, la Tabla 11 presenta los resultados de las cinéticas en cultivo por lote, previas al continuo. De acuerdo a esta tabla, los valores de sustrato residual al término de la fermentación, se incrementan conforme aumenta la concentración de sustrato inicial.

La productividad celular tiende a aumentar a medida que aumenta la concentración de azúcares, alcanzando un valor máximo de 0.62 grCél/1Hr a una concentración de azúcares del 15%, cuando se alcanza en el sistema una concentración de alcohol de 86.16 grET/1, confirmando los resultados de Rodríguez y García (39), quienes presentan inhibición de la levadura a concentración de alcohol del 8% manejando, inclusive, una concentración de sustrato menor, correspondiente al 12%.

Respecto a los valores de rendimiento celular, estos disminuyen conforme aumenta la concentración de sustrato, lo que se explica por el Efecto Crabtree en donde, a concentraciones altas de sustrato, se favorece el metabolismo fermentativo, suprimiéndose el desarrollo de las mitocondrias, organelo celular donde se lleva a cabo el proceso de respiración (36).

Tabla No. 11

Resultado de las Fermentaciones en Cultivo por Lote

S ₀ gl ⁻¹	S gl ⁻¹	X ₀ gl ⁻¹	X gl ⁻¹	P ₀ gl ⁻¹	P gl ⁻¹	μ Hr ⁻¹	P' _c g/lhr	P' _p g/lhr	Y _{x/s} gcél/gust	Y _{p/s} g CH ₃ OH/gust.	β g CH ₃ OH/hr
50	6.95	0.79	6.90	6.37	37.4	0.24	0.511	1.44	0.149	0.710	0.671
100	29.85	1.03	9.07	9.04	67.9	0.25	0.503	2.72	0.123	0.835	0.452
150	68.46	1.43	9.92	11.57	86.16	0.28	0.62	3.82	0.104	0.914	1.14

S₀ = Concentración Inicial de Sustrato
 S = Concentración Final de Sustrato
 X₀ = Concentración Inicial de Células
 P₀ = Concentración Inicial de Producto
 P = Concentración Final de Producto
 μ = Velocidad Específica de Crecimiento

P'_c = Productividad de Células
 P'_p = Productividad de Alcohol
 Y_{x/s} = Rendimiento Celular en base a Sustrato
 Y_{p/s} = Rendimiento de Producto en base a Sustrato
 β = Velocidad Específica de Producción de ETOH

Con los valores obtenidos en la Tabla 11, es posible conocer la relación existente entre la concentración de sustrato y la velocidad de crecimiento de acuerdo a la Ec. de Monod, descrita por Aiba (1) y Quintero (36). De acuerdo a esta expresión y a concentraciones bajas de sustrato, la velocidad específica de crecimiento μ , aumenta linealmente conforme se incrementa la concentración de sustrato. Sin embargo, existe un punto dentro del rango de concentración de sustrato en el cual, la velocidad de crecimiento alcanza su valor máximo que no cambia mas, a pesar de que la concentración de sustrato se incremente.

Linearizando la ecuación de Monod, utilizando el método propuesto por Lineweaver-Burk se tiene lo siguiente:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (32)$$

y con los valores promedio, obtenidos en las cinéticas en cultivo por lote:

S	gl ⁻¹	Hr ⁻¹	1/S	l/gr	1/ μ	Hr
50		0.24	0.02		4.16	
100		0.25	0.01		4.0	
150		0.28	0.0066		3.57	

es posible construir la gráfica 1/S V.S. 1/ μ Fig. 15, en donde la pendiente representa la relación $K_s/\mu_{\max}$ y la ordenada al origen, corresponde al inverso de la velocidad máxima de crecimiento $\mu_{\max}$.

De la misma Fig. 15 se tiene que:

$$m = 38.15 \text{ gr AzHr/l}$$

$$b = 3.44$$

de tal manera que, de acuerdo a la Ec. de Monod:

$$b = 1 / \mu_{\text{máx}}$$

$$3.44 = 1 / \mu_{\text{máx}}$$

$$\mu_{\text{máx}} = 0.29 \text{ Hr}^{-1}$$

y:

$$m = \frac{K_s}{\mu_{\text{máx}}}$$

$$K_s = (\mu_{\text{máx}})(m)$$

$$= (0.29 \text{ Hr}^{-1})(38.15 \text{ gr AzHr/l})$$

$$K_s = 11.06 \text{ grAz/l}$$

Esto significa que para el intervalo de concentración de sustrato manejado, se esperaría una velocidad máxima de crecimiento de 0.29 Hr^{-1} .

El valor de K_s ó constante de saturación, da una idea de la concentración de sustrato bajo la cual, se tendría la mitad de la velocidad máxima de crecimiento.

Por otro lado, un promedio de las velocidades de crecimiento obtenidas para una misma concentración de azúcarews, muestra que la velocidad de crecimiento se incrementa conforme aumenta S_0 , -- confirmando el comportamiento esperado en la Ec. de Monod.

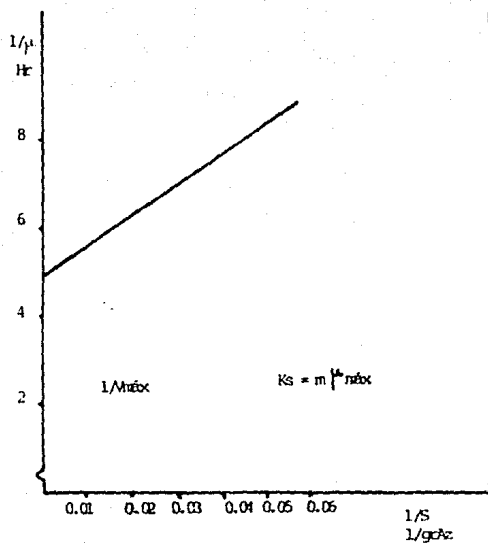


Fig. No.15 Linealización de la Ecuación de
Morod por el Método de Lineweaver-Burk.

Además, conforme se aumenta la concentración inicial de sustrato, y este no es totalmente agotado, la diferencia entre la -- concentración inicial y la concentración final, que aparece en -- la expresión para rendimiento (Ec. 13), se hace mas grande, por -- lo que el valor de rendimiento obtenido es menor, de acuerdo a es ta expresión.

Por otro lado y de acuerdo a la estequiometría de la degrada ción de glucosa en la glicólisis, se observa que:



lo que quiere decir que por cada gramo de glucosa degradada por -- esta ruta, se tienen aproximadamente 0.51 g de Etanol.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 11, se -- tiene que las producciones para etanol alcanzan un valor superior al teórico esperado, obteniendo una producción máxima de 86.16 -- g ETOH/l que da como resultado, un valor de 3.82 g ETOH/lhr de -- productividad.

Si se considera que la melaza es un medio complejo, cuya com posición es rica en constituyentes orgánicos, (Tabla 6), se pue -- den explicar los valores ligeramente superiores a los esperados -- para producción de alcohol y productividad del mismo obtenidos.

Experimentos en Cultivo Continuo.-

La Tabla 12 muestra los resultados de las fermentaciones realizadas en cultivo continuo.

Los resultados muestran un efecto decreciente tanto de producción de biomasa como de producción de alcohol al incrementarse la velocidad de dilución, en forma contraria a lo que teóricamente se esperaría, ya que se tendría una producción celular casi constante, aún manejando diferentes velocidades de dilución, siempre y cuando no se excediese el valor de dilución crítica, ya que de ser así, los valores de células y alcohol se volverían nulos.

Unicamente a concentración de sustrato del 15% las células alcanzan a mantenerse en 4 gr/l en un intervalo de dilución de -- 0.08 a 0.22 Hr⁻¹, disminuyendo drásticamente a un valor de 1.47 - gr cél/l, para un valor de velocidad de dilución de 0.295 Hr⁻¹, - lo cual se observa en la Fig. 18.

A bajas concentraciones de sustrato, los valores de azúcares consumidos son mayores, lo que no sucede a concentraciones de sustrato del 15%. Lo anterior puede explicarse si se considera un posible efecto inhibitorio por sustrato, al incrementarse la presión osmótica en las células por la elevada concentración de azúcares, - lo que origina una disminución en la actividad fermentativa. (39)

Aún cuando la producción de alcohol tiende a disminuir en el sistema a consecuencia del incremento en la velocidad de dilución, la productividad del mismo se incrementa, si se considera que uno de los términos del producto PD aumenta también, como se muestra -

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla No.12

Resultado de las Fermentaciones en Cultivo Continuo.

$(S_0 - S)$	(S_0)	(S)	D	X	P'x	POH	P'OH	%Azúcares Consumidos	Yx/s.	Yp/s
g/l	g/l	g/l	Hr ⁻¹	g/l	g/lhr	g/l	g/lhr		g/l	gEt/gs
39.86	50	10.14	0.097	6.42	0.62	37.93	3.67	79.72	0.161	0.95
40.87	50	9.13	0.087	5.0	0.43	32.19	2.80	81.74	0.122	0.787
35.3	50	14.70	0.197	4.59	0.90	24.63	4.67	70.6	0.130	0.697
27.83	50	22.17	0.297	3.21	0.95	20.09	5.96	55.66	0.115	0.72
34.53	100	65.47	0.091	4.70	0.427	44.57	4.05	34.53	0.136	1.29
57.91	100	42.09	0.106	4.67	0.467	46.88	4.68	57.91	0.080	0.80
34.31	100	65.69	0.176	3.24	0.57	20.92	3.68	34.31	0.094	0.60
14.18	100	85.82	0.275	2.24	0.61	11.88	3.26	14.18	0.157	0.83
70.86	150	74.14	0.080	4.18	0.33	53.54	4.32	47.24	0.058	0.75
53.79	150	96.21	0.221	4.07	0.89	27.38	6.05	35.86	0.075	0.509
31.5	150	118.5	0.295	1.47	0.43	12.73	3.75	21.0	0.046	0.404

en las figuras 16, 17 y 18.

El efecto de la velocidad de dilución sobre los valores de rendimiento celular y rendimiento para producto, se aprecian en las figuras 19 y 20, respectivamente.

No es un comportamiento constante, ni para biomasa ni para producción de alcohol como sería de esperarse de acuerdo a la teoría.

Sin embargo, a concentraciones de sustrato bajas, los valores de $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ tienden a ser mas constantes que aquellos obtenidos a concentraciones de sustrato de 10 y 15%.

Si se considera que para ciertos organismos, concentraciones de glucosa superiores al 5% inhiben la síntesis de enzimas respiratorias y la formación de mitocondrias, (36) y tomando en cuenta que a altas concentraciones de azúcar y a elevadas velocidades de dilución, la levadura está sometida en forma constante a condiciones mas difíciles para su desarrollo, pueden explicarse estas disminuciones en los valores de rendimiento, ya que el sustrato se está aprovechando en forma menos eficiente.

Las productividades tanto de células como de alcohol, se incrementan conforme se incrementa la velocidad de dilución. Únicamente a concentración de sustrato de 15% y una velocidad de dilución de 0.295 Hr^{-1} , el valor de P'_{x} y P'_{OH} , disminuye en un 50% respecto al valor anterior obtenido.

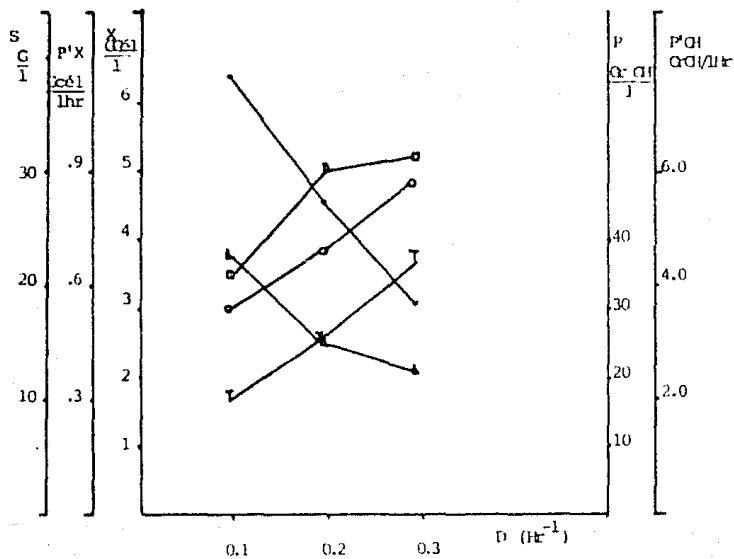


Fig. 16 Influencia de la Velocidad de Dilución Sobre X , P , $P'x$ y $P'CH$ para Concentración de Sustrato de 5%.

$\circ$ $P'x$
 $\square$ X
 $\triangle$ P
 $\diamond$ $P'CH$

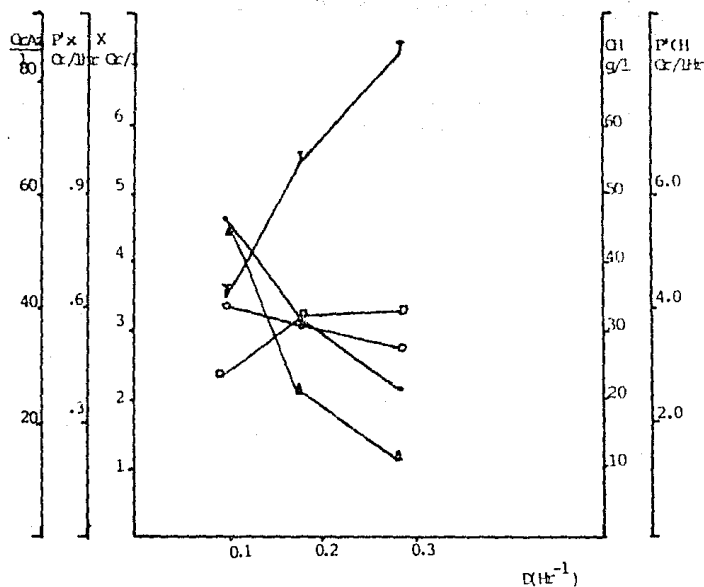


Fig. No. 17. Influencia de la Velocidad de dilución sobre $P'x$, Px , $P'OH$ y $P'OH$ para Concentración de Azúcar del 10%.

$\bullet$ Px
 $\circ$ $P'x$
 $\triangle$ $P'OH$
 $\square$ $P'OH$
 $\times$ S

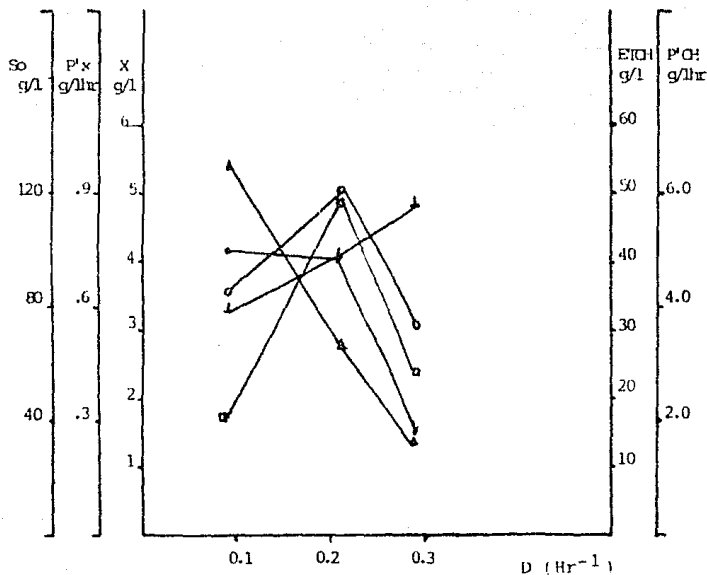


Fig.No. 18 Influencia de la Velocidad de Dilución sobre X, P'x, P'OH, P'CH, para -- Concentración de 15% de Sustrato.

□ P'x
 ○ X
 △ P
 ◇ P'CH
 × S

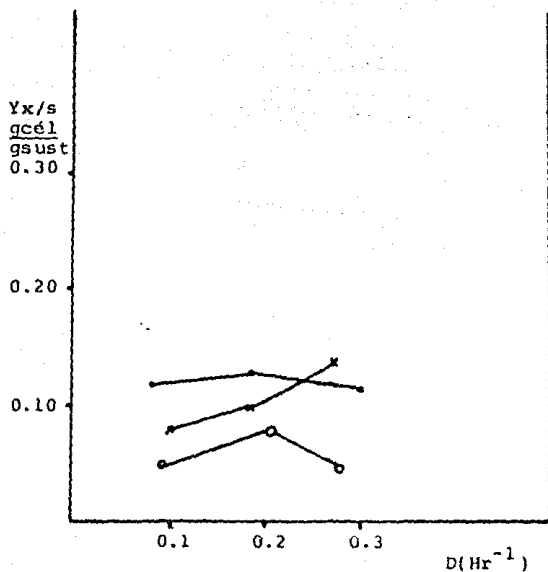


Fig.No.19 Rendimiento Celular
V.S. Velocidad de Dilución para
Diferentes Concentraciones de
Azúcar.

•5%
•10%
•15%

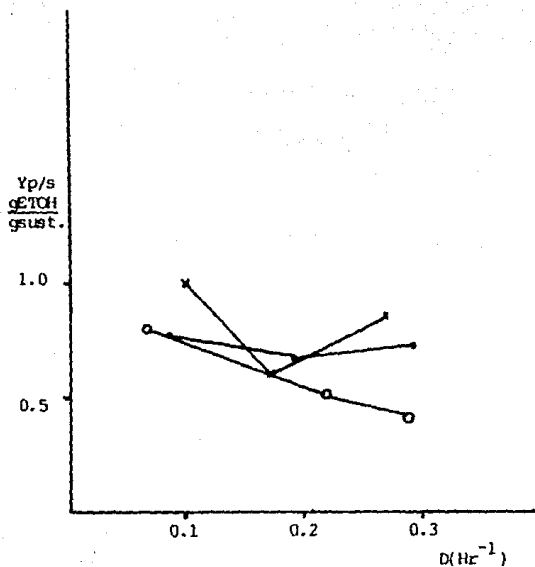


Fig. 20 Relación entre el Rendimiento
para Producto y la Velocidad
de Dilución para Diferentes
Concentraciones de Sustrato.

• 5%
• 10%
• 15%

Las oscilaciones violentas características generalmente --- al inicio del cultivo continuo, son más frecuentes a concentra- ciones de azúcares bajas. El mecanismo de estas oscilaciones - no ha sido totalmente definido. Sin embargo, de acuerdo a los-- resultados presentados por Parulekar y col. (32), la tendencia oscilante en sus experimentos con *Saccharomyces cerevisiae*, coincide a concentraciones bajas de sustrato, y puede ser inducida - ó eliminada variando la velocidad de dilución, velocidad de agi- tación y concentración de oxígeno en el medio.

Por otro lado y con el propósito de evitar la formación de- sedimento celular en el fermentador, que representaba una can-- tidad considerable de levaduras inactivas, se decidió estudiar - el efecto de la velocidad de agitación en el sistema para lo -- cual se varió esta de acuerdo a las condiciones presentadas en- la Tabla 9.

En forma semejante a los resultados presentados por Kópe-- lli y col. (19), a velocidades de agitación altas, en este ca-- so de 250 RPM, disminuyen los agregados que tienden a precipi-- tarse, dando como consecuencia una disminución en la producción- celular, ya que se favorece la salida de células del fermenta-- dor, como se aprecia en la Tabla 12, para los dos primeros va- lores de producción celular. De igual manera, la concentración- de alcohol se ve disminuida en su valor de 37.93 gETOH/l a 32-- gr ETOH/l.

Además, a una velocidad de agitación de 250 RPM, se difi-- culta la identificación de un estado estacionario, por lo que-- las fermentaciones posteriores se trabajaron a una velocidad --- intermedia de 150 RPM, impidiendo por un lado, la sedimenta -

ción celular y por otro, un disturbio excesivo en el sistema.

Energía de Mantenimiento.-

En cultivos biológicos la energía consumida no solo se utiliza para la producción de células ó biomasa sino también, para mantener las estructuras básicas de las células. Esta energía se conoce como Energía de Mantenimiento. A esto se debe -- que los valores de rendimiento no sean constantes en un cultivo continuo. (21)

La energía de mantenimiento se calcula a partir de un balance para sustrato, en forma semejante al tratamiento presentado por López Mercado, (22) como sigue:

$$\frac{dS}{dt} = (dS/dt)_m + (dS/dt)_g \quad (33)$$

en donde:

$\frac{dS}{dt}$ = Velocidad Global de utilización de Sustrato

$\left(\frac{dS}{dt}\right)_m$ = Velocidad de utilización de sustrato para mantenimiento

$\left(\frac{dS}{dt}\right)_g$ = Velocidad de utilización de sustrato para crecimiento

Por definición:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (34)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y} \quad (35)$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_m = -mX \quad (36)$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_g = -\frac{\mu X}{Y_g} \quad (37)$$

Sustituyendo las ecuaciones 34,35,36 y 37 en la expresión 33, se tiene que:

$$\frac{\mu X}{Y} = mX + \frac{\mu X}{Y_g} \quad (38)$$

en donde:

Y_g = Coeficiente de rendimiento verdadero en base a Sustrato.

Simplificando la ec. 38, y dividiendo entre μX , se tiene:

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{\mu} + \frac{1}{Y_g} \quad (39)$$

que se define como Ecuación de Pirt, para el cálculo de la Energía de Mantenimiento.

Graficando la Ec. de Pirt, para $1/\mu$ V.S. $1/Y$ como se muestra en la Fig. 21 se obtiene una recta cuya pendiente representa a m ó coeficiente de mantenimiento, que es igual a la cantidad de sustrato utilizado por célula por unidad de tiempo, para propósitos de mantenimiento. La ordenada al origen representa el rendimiento celular corregido para consumo de sustrato, durante el metabolismo de mantenimiento. (21) y (22).

Los valores para el coeficiente de mantenimiento, así como para el rendimiento real, presentado en la Fig.21, muestra lo siguiente:

Para la concentración de sustrato inicial de 10%, se tiene:

$$m = 0.989 \text{ gr sustrato/gr cél Hr}$$

$$Y_g = 0.275 \text{ gr célula/ gr sustrato}$$

Para concentración de azúcares del 15% se tiene:

$$m = 0.489 \text{ gr sustrato/ gr célula Hr}$$

$$Y_g = 0.090 \text{ gr sustrato / gr célula Hr}$$

Los valores obtenidos para concentración de sustrato de 5% carecen de lógica al obtenerse un valor negativo para el valor de coeficiente de mantenimiento.

El rendimiento celular corregido es en los casos reportados, mayor que los obtenidos para concentración de azúcar de 10 y 15%, de acuerdo a la Tabla 12.

Los coeficientes de mantenimiento proporcionan la cantidad de sustrato que la célula consume para cuestiones de manteni-miento, exclusivamente.

De acuerdo a las fermentaciones realizadas en cultivo contínuo y de acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 12, se tiene una mayor productividad para producto, a una concentración de azúcares de 15% y una velocidad de dilución de 0.2 Hr^{-1} .

Sin embargo, las fermentaciones realizadas, muestran que se obtiene un estado estacionario en forma más evidente a velocidades de dilución bajas. Por ello, se decidió establecer como condiciones mas adecuadas de fermentación para los experimentos con vinaza, una concentración inicial de sustrato de 150--g/l a una velocidad de dilución de 0.1 Hr^{-1} , aunque, bajo es--tas condiciones, la productividad de alcohol, fué de 4.32 grEt/HR .

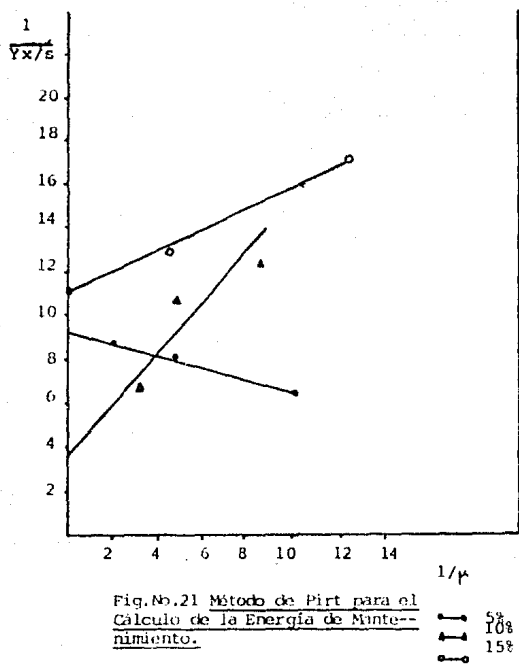


Fig. No. 21 Método de Pirt para el
Cálculo de la Energía de Monte-
nimiento.

Experimentos con Vinaza.-

Establecidas las condiciones de operación en cultivo continuo bajo las cuales se llevó a cabo la recirculación de vinaza, se decidió preparar el medio de crecimiento sustituyendo el agua de dilución por vinaza, en proporciones de 33, 66 y 100%.

La adición de sales inorgánicas fué suprimida totalmente, - al considerar que los requerimientos de minerales utilizados por la levadura, serían cubiertos por la vinaza presente, ya que su contenido en materia tanto orgánica como mineral, (8) la hacen -- particularmente atractiva para estos propósitos.

Los resultados en cultivo por lote para cada una de las proporciones manejadas, se presentan en las figuras 22, 24 y 26. Las fermentaciones en cultivo continuo a velocidad de dilución de 0.1 Hr^{-1} y concentración de azúcares de 15%, se presentan en las figuras 23, 25 y 27.

Respecto a los valores obtenidos para biomasa en cultivo batch, no existe diferencia significativa en los tres experimentos probados, ya que se obtienen valores muy semejantes en las producciones celulares, como se muestra en la Tabla 13.

De igual forma, las velocidades de crecimiento no se ven afectadas mayormente por la cantidad de vinaza utilizada. Sin embargo, estos valores de 0.133 Hr^{-1} , comparados con 0.045 y 0.106 Hr^{-1} obtenidos por Rodríguez y García (39) para concentraciones de vinaza de 33 y 66% respectivamente, resultan ligeramente mayores.

Los valores para producción de alcohol no se ven disminuidos considerablemente si se comparan estos con las fermentaciones sin vinaza. Estos valores se presentan en forma resumida en la Tabla 13. Respecto a las corridas sin vinaza, la producción celular se ve disminuida casi en un 50% y para alcohol, la diferencia es tan solo del 4% respecto al valor obtenido sin recirculación.

De acuerdo a la teoría, los parámetros que influyen directamente en la velocidad de crecimiento son la concentración de sustrato, la temperatura, el pH y la concentración de inóculo. Si se toma en cuenta que tanto la concentración de azúcares, correspondiente al 15%, así como las proporciones de vinaza y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, son las mismas que las utilizadas en el trabajo de Rodríguez y García (39), la posible explicación para las diferencias en las velocidades de crecimiento, pueden atribuirse a que la composición, tanto de las mieles como de las vinazas, presentan diferencias de zafra a zafra e incluso de ingenio a ingenio, ya que la caña utilizada no tiene una composición uniforme como para considerarla como un parámetro fijo.

El valor de rendimiento celular para la fermentación sin vinaza a 15% de azúcares, correspondió a 0.104 gr cél/gr sustrato, como se aprecia en la Tabla 11 y en forma comparativa en la Tabla 13. Si este valor se compara con aquellos obtenidos en las fermentaciones con recirculación de vinaza, presentados en la Tabla 13, se puede apreciar una disminución hasta de diez veces, respecto al obtenido sin recirculación.

En los valores que corresponden a rendimiento para producto, en esta misma tabla, se presentan resultados por arriba de lo teórico esperado. Tomando en consideración que la melaza es un medio complejo, cuya composición no se reduce exclusivamente a azúcares como fuente de carbono, sino que se incluyen en ella algunas vitaminas y aminoácidos, que proporcionan un aporte de nitrógeno (Tabla No. 2), es probable que la levadura utilice este tipo de compuestos siguiendo una ruta metabólica alterna y generar otros productos que favorezcan los incrementos anteriores, ya que, de acuerdo a lo que menciona Phaff (35), las levaduras pueden convertir aminoácidos a alcoholes mayores, por la eliminación de amoníaco y CO_2 , formando un alcohol con un átomo de carbono menos que el aminoácido que lo contenía. Ejemplos de lo anterior son la conversión de leucina a alcohol isoamílico e isoleucina a alcohol amílico activo.

Otro factor que en un momento dado podría favorecer los incrementos en rendimiento obtenidos, es que el método de determinación de alcohol, probablemente esté detectando, además del etanol presente, otro tipo de compuestos producto de la misma fermentación, que contienen dentro de su estructura al grupo hidroxilo, ya que de acuerdo a la teoría, en un método semejante para la determinación de alcohol, se considera a este radical como interferencia en la determinación de etanol. (24)

Por otro lado, y tomando en cuenta los resultados obtenidos por García (39) en fermentaciones semejantes en cultivo por lote, con 66% de recirculación de vinaza y 15% de concentración de sus-

trato inicial, se alcanzan valores mayores para velocidad de crecimiento, producción de alcohol y productividad del mismo, correspondiendo a valores de 0.28 Hr^{-1} , 83.97 gr ETOH/l y 2.99 gr ETOH/lh respectivamente, (ver Tabla 13), a diferencia de un valor de 2.18 gr ETOH/lHr en productividad de alcohol, para la misma proporción de vinaza recirculada. Lo anterior puede explicarse si se considera, que tanto las mieles como las vinazas utilizadas en este trabajo, tienen un origen diferente a las utilizadas en el trabajo anterior y en consecuencia, la composición del medio de cultivo puede presentar algunas diferencias.

Los resultados en cultivo continuo, muestran por su parte, un efecto decreciente sobre la productividad de alcohol y células al recircular la vinaza en el medio, como puede observarse en la Tabla 14 y en la Fig. 28.

Los resultados obtenidos en las fermentaciones sin recirculación a 15% de concentración inicial de azúcares y 0.1 Hr^{-1} para -- velocidad de dilución, proporcionan un valor de productividad de 4.32 gr/lHr para etanol. Si se compara este valor con las productividades obtenidas utilizando la vinaza en el medio, se observa una disminución del 4, 20 y 30%, para 33, 66 y 100% de recirculación, respectivamente.

Respecto a la influencia de la vinaza sobre la producción celular, se tiene un efecto negativo para las tres fermentaciones -- con recirculación, lo que puede observarse en la Tabla 14. Desafortunadamente y de acuerdo a la Figura 28 conforme aumenta la concentración de vinaza, disminuye la productividad tanto de alcohol como de células, originando, en consecuencia, un aumento en la concen

tración de azúcares residuales.

Al existir un efecto inhibitorio que estaría dado, fundamentalmente por el exceso en la concentración de sólidos y en consecuencia, en un cambio en la presión osmótica del medio, haciendo que este se incremente, esto origina una alteración en la cantidad de biomasa y por lo tanto, en la cantidad de etanol producido, si se toma en cuenta que el metanol es un metabolito asociado al crecimiento, su concentración se ve alterada al presentarse una disminución en la concentración celular, de tal manera que al no existir una elevada concentración de ésta, el producto de fermentación no se incrementa y en consecuencia, no existe un adecuado consumo de sustrato, incrementándose por lo tanto, la concentración de azúcares residuales. Además, tomando en cuenta las condiciones bajo las cuales se tiene sometido el sistema, esto es, que en forma continua se está alimentando medio estéril con una concentración elevada de azúcares, proporcionada por la melaza como fuente de carbono, el microorganismo está expuesto a condiciones de elevada presión osmótica, a diferencia de lo que sucedería en el cultivo por lote, en el cual, la concentración de sustrato es consumida en una forma paulatina, conforme va transcurriendo el tiempo de fermentación.

Sin embargo, las corridas realizadas con vinaza, muestran que este efluente puede cubrir las necesidades de minerales requeridas por la levadura y presentadas por Aiba (1), tomando en cuenta que en las fermentaciones en cultivo por lote previas al continuo, es evidente el crecimiento del microorganismo, lo que-

puede apreciarse en las Figuras 22, 24 y 26, en las diferentes cinéticas con recirculación de vinaza.

Si se comparan los resultados de las corridas en cultivo -- continuo sin recirculación (Tabla 12), con aquellos donde se adicionó vinaza al mrdio, (tabla 14), se pueden observar en estas -- últimas, disminuciones en las producciones de células y alcohol-- hasta del 50%, respecto a las corridas sin recirculación.

Por otro lado, trabajos realizados por Tajima y Yoshisum -- (45), muestran que concentraciones elevadas de sales en mieles -- de purga, inhiben la fermentación alcohólica, disminuyéndose el etanol y aumentando productos anormales de fermentación como -- glicerol, acetaldehído y ácidos volátiles, de acuerdo a diferentes rutas metabólicas.

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en evaluar la posibilidad de recircular la vinaza, utilizando un sistema -- continuo de fermentación que favoreciera la productividad de alcohol, además de que atenuara o de ser posible, eliminara el impacto ambiental de las vinazas, al evitarse su descarga directa a los cuerpos receptores.

Por ello se consideró necesario realizar la caracterización de la vinaza proporcionada por el Ingenio Azucarero Casasano ubicado en el estado de Morelos, así como de la vinaza obtenida en el laboratorio, después de efectuar la separación de alcohol de las muestras, una vez alcanzado el estado estacionario en las -- fermentaciones con recirculación.

Los resultados de la caracterización de la vinaza de inge--

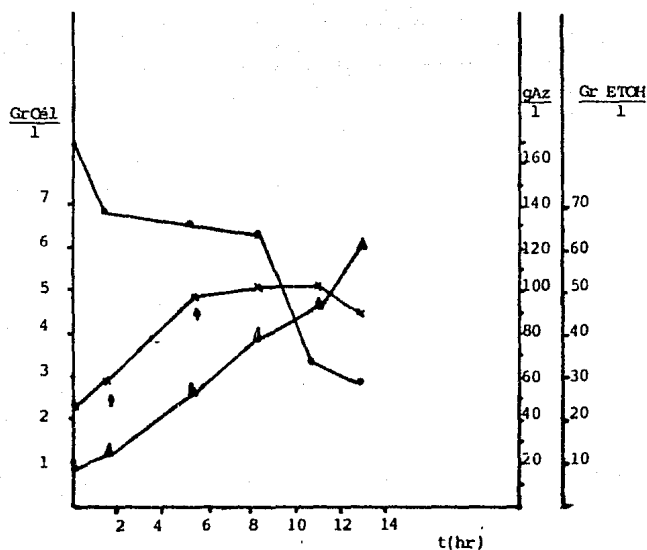


Fig.No.22 Fermentación en Cultivo por Lote.Medio Melaza a 15% de Sustrato y 33% de Recirculación de Vinaza.

- Células
- Azúcares
- ▲ Alcohol

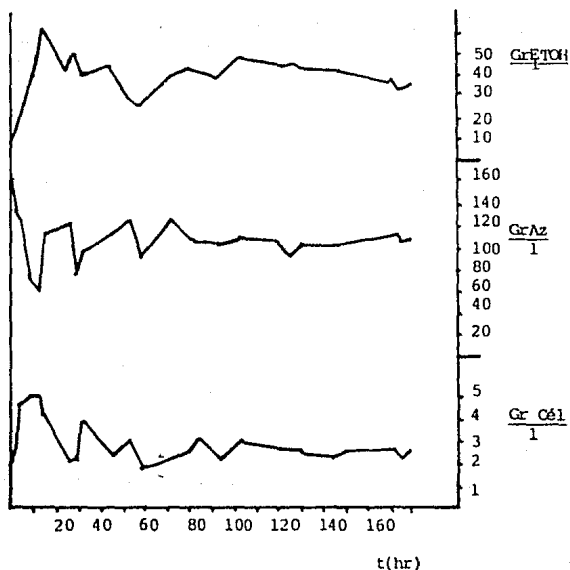


Fig.No.23 Fermentación en Cultivo
Continuo. Medio Melaza 15% Sustrato
y 33.3% de Recirculación.
 $F=0.396 \text{ l/hr}$ $D=0.1 \text{ hr}^{-1}$

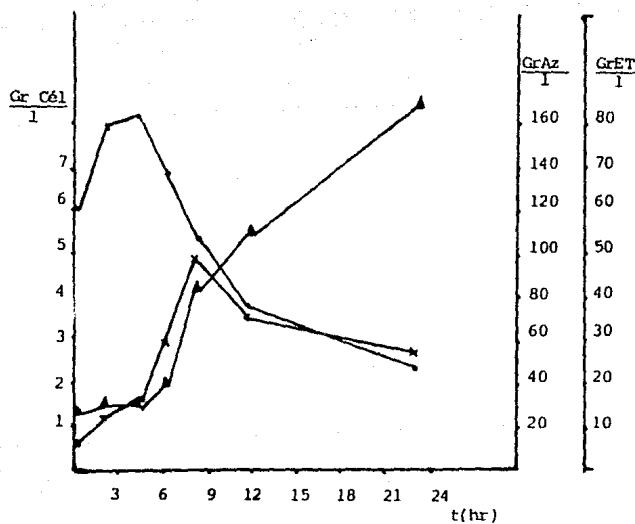


Fig.24 Fermentación en Cultivo por Lote.
Medio Melaza 15% de Sustrato. 66.6% de Re-
circulación.

- ✕ Células
- ▲ Alcohol
- Azúcares

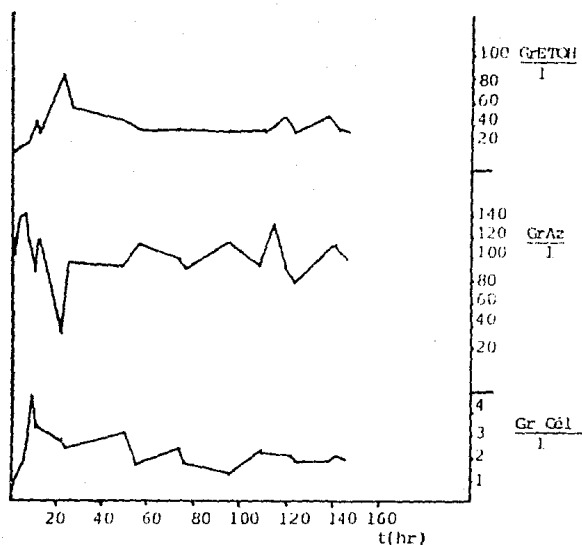


Fig.No.25 Fermentación en Cultivo Continuo.
 Medio Melaza 15% de Sustrato. 66.6% de Re--
 circulación de Vinaza.
 $F=0.38 \text{ l/hr}$ $D=0.95 \text{ hr}^{-1}$

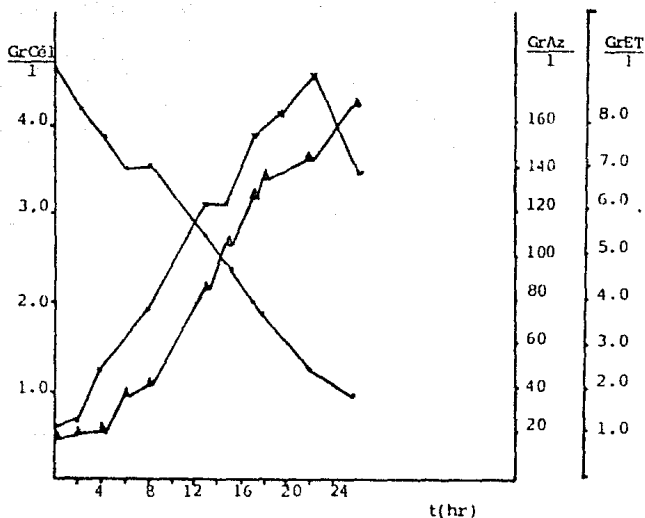


Fig.26 Fermentación en Cultivo por Lote. Medio Melaza 15% de Azúcares y 100l de Recirculación de Vinaza.

- × Células
- ▲ Alcool
- Azúcares.

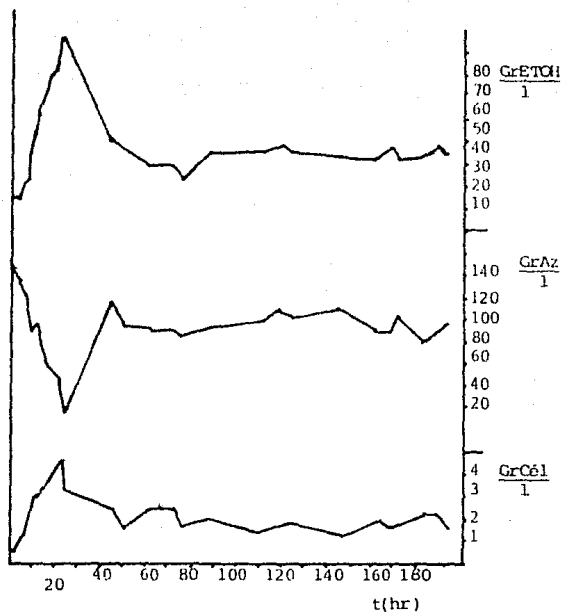


Fig. 27 Fermentación en Cultivo Continuo.
Medio Melaza a 15% de Sustrato y 100% de--
Recirculación de Vinaza.
 $F=0.426 \text{ l/hr}$ $D=0.106 \text{ hr}^{-1}$

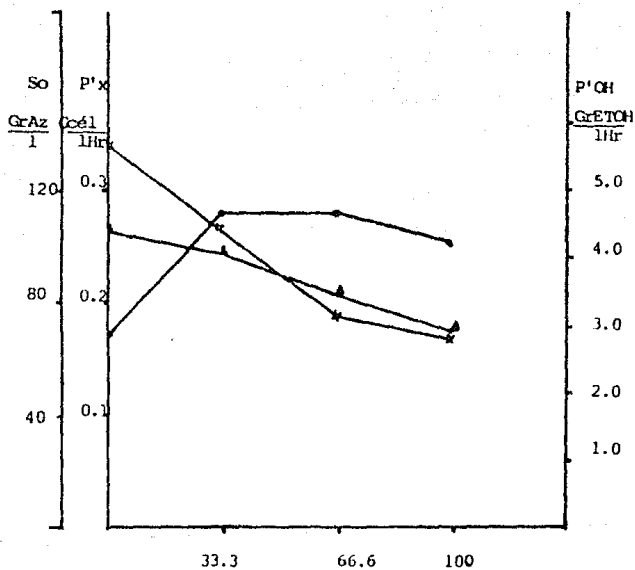


Fig.No28 Efecto de la Concentración de Vinaza sobre P'x, P'OH, y Azúcares Residuales en Cultivo Continuo.

%Recirculación de Vinaza.

- S residual
- * P'x
- Δ P'OH

nio, así como los de las obtenidas en el laboratorio, se muestran en la Tabla 15 . Estos resultados son mucho más elevados y en consecuencia alarmantes, que aquéllos presentados por Monteiro (28)- ó Ribero y Castello (8), quienes reportan un valor para Demanda Química de Oxígeno (DQO) de 27000 y 25000 mgDQO/l, respectivamente.

Para la fermentación en donde la vinaza es recirculada en un 33%, los valores tanto de DQO como de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) y sólidos, resultan muy semejantes a los obtenidos en la vinaza de ingenio y los incrementos considerables en estos parámetros para las proporciones de recirculación de 66 y 100%, se pueden deber fundamentalmente, a que bajo estas proporciones, la fuente de carbono (melaza a una concentración inicial de sustrato de 150 g/l), fué consumida tan solo en un 32 y 33%, obteniéndose una concentración promedio de sustrato residual de 110 y 102 --- gAz/l, para las proporciones de 66 y 100% de recirculación.

Esto trae como consecuencia, una elevación considerable en la carga orgánica de la corriente de salida del medio de fermentación, lo que puede observarse en la Tabla 15.

Por otro lado, resulta importante considerar que si el aporte de azúcares en la vinaza de ingenio es de un escaso 1% determinado experimentalmente, la elevación de la concentración de ésta en la corriente de salida del fermentador se debe exclusivamente al bajo consumo de sustrato durante la fermentación y no por un aporte adicional por la vinaza durante la preparación del medio.

Tabla No. 13

Cinéticas en Cultivo por Lote con Diferentes Proporciones de Recirculación de Vinaza.

Vinaza	S	X	P	μ	P'c	P _{OH}	Y _{x/s}	Y _{p/s}
%	g/l	g/l	g/l	Hr ⁻¹	g/lhr	g/lhr	gc/gs	get/gs
0	68.46	9.92	86.1	0.28	0.62	3.82	0.104	0.914
33	60.01	4.55	60.4	0.133	0.239	3.18	0.019	0.485
66	49.69	4.94	83.9	0.28	0.352	2.99	0.040	0.655
100	37.12	4.52	83.3	0.133	0.164	2.77	0.028	0.542

Tabla No. 14

Cinéticas en Cultivo Continuo con
Diferentes Proporciones de Recir-
culación de Vinaza.

Vinaza	S ₀	S	D	X	P _{OH}	P' _x	P' _{OH}	Y _{x/s}	Y _{p/s}
%	g/l	g/l	Hr ⁻¹	g/l	g/l	g/lHr	g/lHr	gc/gs	ge/gs
0	150	74.14	0.10	4.18	53.54	0.33	4.32	0.058	0.75
33	167.5	109.6	0.102	2.72	40.41	0.277	4.12	0.046	0.69
66	163.6	110.8	0.095	1.95	36.34	0.185	3.45	0.037	0.69
100	162.6	102.8	0.105	1.64	27.86	0.174	2.95	0.027	0.46

Tabla No. 15

Caracterización de la Vinaza Ob-
tenida del Ingenio Casasano y de
Aquellas Obtenidas en el Laborato-
rio.

	DQO	DBO ₅	Sól. Tot. Fijos	Sól. Volá- tiles Tot.	Sól. Susp. Totales	Sól. Susp. Volátiles
	mg/l	mg/l	g/l	g/l	g/l	g/l
Vinaza del Inge- nio Casasano Es- tado de Morelos.	87,400	55,000	85.67	67.61	15.60	13.16
Vinaza del Mos- to Agotado con 33% de Recircu- lación.	85,600	48,627	110.78	79.92	13.516	7.04
Vinaza del Mos- to Agotado con 66% de Recircu- lación.	179,800	125,700	233.84	168.81	175.65	137.5
Vinaza del Mos- to Agotado con 100% de Recir- culación.	342,000	176,800	367.98	280.45	278.11	241.41

CONCLUSIONES

De acuerdo a la experimentación previa, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10, se obtiene un valor para $\mu_{\text{máx}}$ de 0.46 Hr^{-1} . Sin embargo, durante las fermentaciones en cultivo continuo, se tienen indicios de lavado a una velocidad de dilución de 0.29 Hr^{-1} .

Por otro lado, con los resultados obtenidos en cultivo por lote, y de acuerdo al tratamiento de Lineweaver-Burk, se obtiene una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.29 Hr^{-1} , valor muy semejante al obtenido en forma experimental, además de ser mas cercano a las condiciones reales de cultivo.

En los experimentos en cultivo por lote, previos al cultivo continuo, se alcanza una productividad máxima de alcohol a una concentración de 150 gr/l, obteniéndose un valor de 3.82 grET/lHr, que resulta bastante mayor que la obtenida por Rodríguez y García-(39) cuyo valor reportado es de 2.53 grETOH/lHr.

La diferencia en la concentración de inóculo ó probablemente, en las mieles utilizadas (ya que de zafra a zafra ó inclusive, de ingenio a ingenio, se pueden presentar variaciones), pueden ser -- algunas de las razones que justifiquen las diferencias anteriores.

En lo que al cultivo continuo se refiere, las desviaciones -- presentadas en los valores para producción, tanto para células como para producto, mostrados en las figuras 19, 20 y 21, de acuerdo al comportamiento teórico, en el cual, estos parámetros permanecerían constantes al variar la velocidad de dilución, pueden tener alguna

relación con un exceso en la concentración de sólidos en el medio, ya que, a pesar de que se procura la precipitación de sales y gomas presentes en la melaza con el proceso de clarificación, aún pueden quedar algunos residuos que tienen influencia osmótica sobre las células, trayendo una disminución considerable en éstas y en el producto a concentración de azúcares de 15%, de acuerdo a lo mostrado en las Figuras 20 y 21.

Por otro lado, respecto a la agitación en el sistema, se pretendió trabajar con un reactor continuo de tanque agitado, (CSTR) el cual requería tener una velocidad de agitación establecida previamente y que permitiera mantener una concentración homogénea y constante en cualquier punto del mismo.

Se determinó que una velocidad intermedia de 150 RPM impedía una sedimentación celular y en consecuencia, la inactividad celular, prevaleciendo las condiciones de anaerobiosis requeridas para la obtención de alcohol.

Por su parte, las fermentaciones realizadas en cultivo por lote muestran valores mayores en productividad de alcohol y velocidades de crecimiento que los obtenidos por Rodríguez y García (39) en fermentaciones semejantes, obteniendo una productividad de 2.18 grETOH/1Hr a una proporción de 66% de vinaza en el medio.

No parece tener influencia significativa la concentración de vinaza sobre la velocidad de crecimiento, sin embargo, altas concentraciones de la misma, afectan la productividad de células y alcohol, lo cual se muestra en la Tabla 13.

A diferencia de los resultados presentados por García, (39)

en donde se reporta una inhibición celular en presencia de vinaza pero una estimulación en la producción de alcohol, los resultados presentados en este trabajo, muestran una inhibición en los dos parámetros, como puede observarse en la Figura 28 y en la Tabla 13.

Si se considera que el etanol es un metabolito asociado al crecimiento y si además se está teniendo una disminución en las productividades celulares por la presencia de vinaza en el medio, se explica de esta manera la disminución en las producciones de etanol, tomando en consideración que la concentración de producto, está en función de la cantidad de biomasa presente en el sistema.

En lo que respecta a los resultados en cultivo continuo, la disminución en la productividad de alcohol, presenta un 30% si se compara con la obtenida en la cinética sin recirculación, lo cual se presenta en la Figura 28 y en la Tabla 14.

Por otro lado, el análisis presentado en la Tabla 15, para la vinaza de ingenio y aquella obtenida en el laboratorio, muestran cargas orgánicas altas. Unicamente los resultados de la fermentación 33% de recirculación, son casi semejantes a aquellos obtenidos de la vinaza proveniente del Ingenio Casasano.

Desafortunadamente, estos valores elevados en carga orgánica se deben a que, el desarrollo de las fermentaciones sin recirculación se llevó a un escaso 30% de consumo de azúcares dando como consecuencia, un incremento en los azúcares residuales, alcanzando valores del orden de 110 grAz/l (Tabla 14), lo que trajo como consecuencia, el incremento tan drástico en los valores para DQO.

Por otro lado y considerando que las condiciones ambientales de temperatura ($T=30^{\circ}\text{C}$), velocidad de agitación (150 RPM) y pH -- (3.5-4.0), bajo las cuales trabajó la cepa de *Saccharomyces Cerevisiae* utilizada, eran las adecuadas, la posible razón que originó la baja conversión de sustrato a producto, fué que la variedad de la cepa no fué lo suficientemente resistente como para soportar las condiciones prevalecientes a lo largo de un cultivo continuo, en lo que se refiere a concentración de sustrato y producto, trayendo como consecuencia, una elevación de azúcares residuales y productividades para etanol no del todo satisfactorias.

Por ello se hace necesaria la investigación de alternativas -- que mejoren las producciones, tanto de células como de etanol, principalmente, haciendo más atractivo el proceso descrito.

Finalmente, tomando en consideración que existen diferentes -- compuestos, producto de la misma fermentación, como los alcoholes -- de fusel por ejemplo, sería conveniente, en caso de futuras investigaciones sobre esta línea, utilizar un método alternativo para -- la determinación de alcohol, ya que los valores de rendimiento para producto obtenidos, son altos respecto al teórico esperado, tomando en cuenta además, que este método puede presentar interferencias -- por grupos hidroxilo.

ALTERNATIVAS

Los resultados obtenidos en las fermentaciones en cultivo continuo, muestran productividades para alcohol que según Quintero (36), están por debajo de un valor que económicamente sería rentable, esto es, manejar productividades alrededor de -- 10 g/lhr de producto.

Por ello, resulta importante plantear algunas alternativas que, en un momento dado, pudieran incrementar los valores obtenidos de productividad, tanto de células como de producto, así como aumentar también, los valores de azúcares consumidos en la fermentación.

Una opción es que, en base a la ecuación de Monod, en la cual, la velocidad específica de crecimiento aumenta al aumentar la concentración de sustrato, se manejen concentraciones altas de éste, con el fin de que la velocidad específica de crecimiento elevada, favorezca el crecimiento celular, dando como resultado, mayor concentración de biomasa, para que -- con ello, favoreciendo el metabolismo fermentativo de la levadura, la concentración final de alcohol sea mayor, originando también, el consumo general de sustrato.

Por otra parte, se ha reportado que en un cultivo continuo que opera en un rango cercano a la velocidad de dilución crítica (D_c), presenta mayores rendimientos y productividades para células y producto, según el caso . (15), (18), (1), (24).

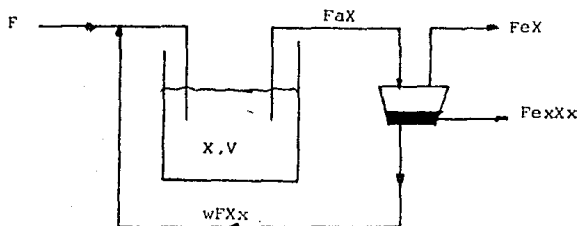
Si se reduce el rango de variación para la velocidad de -

dilución a valores que no excedan de 0.29 Hr^{-1} , se podrían tener resultados interesantes.

Recirculación de Células.-

Con el propósito de que la cantidad de sustrato residual sea menor, es decir, que la mayor cantidad de este sea consumido durante la fermentación, existe la posibilidad de utilizar un sistema de recirculación de células, ya quea la salida del reactor, en un sistema continuo como el utilizado en este trabajo, se tiene una elevada concentración celular. (25)

Si el sistema traaja e acuerdo al modelo de reactor completamente agitado (CSTR), la cantidad de células a la salida deberá ser igual a la concentración que existe dentro del fermentador. Un sistema de este tipo se puede representar en la siguiente forma:



Aplicando un Balance Celular en el Tanque agitado y en el separador:

$$F + wF = Fa$$

(40)

$$(1 + w)F = F$$

el Separador:

$$F = F_e + F_{ex} \quad (41)$$

considerando el balance general en el reactor se tiene:

$$\text{Entra} - \text{Sale} + \text{Produce} = \text{Acumula}$$

$$F X_0 + w F X_x - F_a X + \left(\frac{dX}{dt} \right) V = \left(\frac{dX}{dt} \right) V \quad (42)$$

Si se alimenta medio estéril:

$$\begin{aligned} F X_0 &= 0 \\ w F X_x - F_a X + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecim}} &= 0 \end{aligned} \quad (43)$$

En el Estado Estacionario:

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

Utilizando la Ec. 40 en la expresión 43:

$$\begin{aligned} w F X_x - (1+w) F X + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecim}} &= 0 \\ w F X_x - F X - w F X + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecim}} &= 0 \end{aligned}$$

dividiendo entre el Volumen V:

$$\frac{w F X_x}{V} - \frac{F X}{V} - \frac{w F X}{V} + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecim}} = 0$$

$$w D X_x - D X - w D X + \left(\frac{dX}{dt} \right) V = 0$$

$$V \frac{dX}{dt} = D X + w D X - w D X x$$

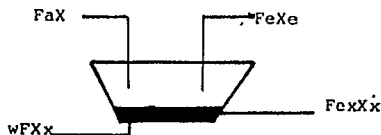
$$V \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = D - \frac{w D X x}{X} + w D$$

$$\mu = D + w D - \frac{w D X x}{X}$$

$$\mu = D \left[1 + w - \frac{w X x}{X} \right]$$

$$\mu = D \left[1 + w \left(1 - \frac{X x}{X} \right) \right] \quad (44)$$

Efectuando un Balance Celular en el Separador:



$$FaX = FeXe + FexXx + wFXx$$

$$Fa = \frac{FeXe}{X} + \frac{FexXx}{X} + \frac{wFXx}{X}$$

$$Fa = \frac{FeXe}{X} + \frac{Xx}{X} [FeX + wF]$$

$$\frac{Xx}{X} = \frac{Fa - Fe(Xe/X)}{Fex + wF} = \frac{Fa - Fe(Xe/X)}{Fa - Fe}$$

De las ecuaciones 40 y 41:

$$\frac{Xx}{X} = \frac{(1+w)F - Fe(Xe/X)}{(1+w)F - Fe}$$

multiplicando el numerador y el denominador por el inverso de F:

$$\frac{Xx}{X} = \frac{1+w - FeXe/FX}{1+w - Fe/F} \quad (45)$$

Sustituyendo la Ec. 45 en 44:

$$\mu = D \left[1+w \left[1 - \left(\frac{1+w - FeXe/FX}{1+w - Fe/F} \right) \right] \right] \quad (46)$$

Si Xe/X es muy cercano a cero entonces la Ec. 46 se reduce a:

$$\mu = \left[1+w \left[1 - \left[(1+w)/1+w - (Fe/F) \right] \right] \right] \quad (47)$$

La Ec. 47 explica porqué un sistema con recirculación es más-productivo que un cultivo continuo tradicional.

El factor asociado a la velocidad de dilución D , obliga a que éste sea mayor que la velocidad de crecimiento μ , lo que -

implica que el sistema tiene la capacidad de trabajar a mayores velocidades de dilución sin que esto traiga consigo un lavado de células, ya que, a pesar de que la velocidad de crecimiento es la misma, la cantidad de biomasa es mayor debido a que está presente un flujo de alta concentración celular, con la capacidad de operar mayores volúmenes de alimentación.

Variedad de la Cepa.-

Otro factor importante a considerar en cuanto al mejoramiento del proceso utilizado, es el microorganismo empleado, ya -- que en el cultivo continuo, es importante que la cepa utilizada tolere concentraciones elevadas y constantes de alcohol, ya que el sistema así lo requiere.

Existen diferentes microorganismos productores de etanol, pero su elección depende del sustrato utilizado. (7)

Generalmente, las levaduras del género *Saccharomyces* han sido las más utilizadas en la fermentación etanólica.

Por otra parte, se está intentando obtener etanol de una forma directa, a partir de celulosa mediante el uso de la bacteria anaeróbica termofílica *Clostridium Thermocellum*; también por la acción combinada de levaduras *Saccharomyces Uvarum* y *Pachisolen Tannophilus*, sobre sustrato de celulosa y hemicelulosa hidrolizadas; empleando hongos del género *Aspergillus* y la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, sobre materiales amiláceos; la fermentación de carbohidratos por medio de bacterias anaerobias del género *Zimomonas*; empleando levaduras del géne

ro *Kluyveromyces Marxianus* para fermentar inulina (7) y finalmente el uso de levaduras del género *Saccharomyces saké* que en los últimos años ha sido de gran estudio por presentar una tolerancia de alcohol hasta de un 15% v/v (46).

Procesos Utilizados.-

Con el propósito de eliminar la inhibición por etanol durante la fermentación, se puede utilizar un sistema de fermentación al vacío, pues se pueden tener ahorros hasta del 7% de la energía requerida para la destilación en forma tradicional.

Ramalingham y col. (37) reportan como necesaria, una presión reducida de 32 mmHg a 30°C para no causar muerte a las levaduras.

La utilización de enzimas inmovilizadas puede ser otra alternativa que mejore la obtención de alcohol. Sin embargo, el problema no es fácil, pues necesario inmovilizar una gran cantidad de enzimas, ó en su defecto, células completas, con los consiguientes problemas difusionales. (7)

Por otro lado, la aplicación del Rotorfermentador en la fermentación alcohólica, puede ser otra alternativa que mejore la producción de alcohol.

Este modelo de reactor consiste en una membrana microporosa giratoria que está colocada dentro de un reactor cerrado. Los productos metabólicos en el medio se remueven continuamente por filtración a través de la membrana porosa, mientras que

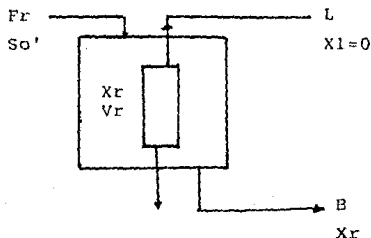
las células pueden retenerse en el fermentador.

Esta doble función tanto de crecimiento y concentración celular, con la simultánea remoción de cualquier producto metabólico, es la principal función de este tipo de reactor.

Los detalles en cuanto a la descripción y funcionamiento del reactor, se presentan más a fondo en los trabajos de Margarithis y Wilke (26), quienes reportan en otros trabajos, (27) productividades para etanol, hasta de 10 veces más, que aquellas obtenidas en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR).

Un Rotorfermentador, puede inclusive, ser mas atractivo en cuanto a productividad de producto, que un reactor continuo con reciclado (26).

Un diagrama general de un Rotorfermentador, se muestra en la Figura siguiente:



Aplicando un balance celular, se tiene:

Entra - Sale + Produce = Acumula

$$0 - BX_r - LX_l + \mu X_r V_r = \frac{V_r dX_r}{dt} \quad (48)$$

en donde:

B = Corriente Celular en el Estado Estacionario 1Hr^{-1}

L = Velocidad de Flujo de Filtrado l/Hr

V = Volumen del Rotorfermentador l

X_r = Concentración Celular dentro del Rotorfermentador g/l

X_l = Concentración Celular en el Filtrado g/l

μ = Velocidad Específica de Crecimiento Hr⁻¹

De igual manera un balance para producto, está dado por:

Entra - Sale + Produce = Acumula

$$0 - BPr - LPr + \beta X_r V_r = \frac{dPr}{dt} V_r \quad (49)$$

en donde:

Pr = Conc. de Producto g/l

β = Velocidad Específica de Producto grEt/grcélHr

definiendo velocidades de Dilución y una Velocidad de dilución global, en base a la velocidad de alimentación Fr , se tiene:

$$D_0 = \frac{Fr}{V_r} = \frac{B}{V_r} + \frac{L}{V_r} \quad (50)$$

D en base a la corriente celular B

$$D_1 = \frac{B}{V_r} \quad (51)$$

D en base a la velocidad de filtrado:

$$D_2 = \frac{L}{V_r} \quad (52)$$

lo que quiere decir que:

$$D_0 = D_1 + D_2 \quad (53)$$

en el estado estacionario y considerando que $X_l = 0$, la Ec.48 se expresa:

$$-BX_r + \mu X_r V_r = 0 \quad (54)$$

$$\mu = \frac{B}{V_r} = D_1 \quad (55)$$

La Ec. 49 expresada para producto bajo las mismas condiciones:

$$-BPr - LPr + X_r V_r = 0 \quad (56)$$

$$BPr V_r = Pr(B+L) = PrFr$$

$$\beta = \frac{Pr D_0}{X_r} \quad (57)$$

Los rendimientos tanto para células como para producto se expresan como:

$$\begin{aligned} Y_{x/s} &= \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{B X_r}{Fr S_0' - (LSr + BS_1)} \\ &= \frac{B X_r}{Fr(S_0' - Sr)} \end{aligned} \quad (58)$$

$$\begin{aligned} Y_{p/s} &= \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{LPr + BPr}{Fr(S_0' - Sr)} \\ Y_{p/s} &= Pr(S_0' - Sr) \end{aligned} \quad (59)$$

en donde:

Fr = Velocidad de Flujo de Medio Fresco al fermentador 1/hr

So' = Concentración de Sustrato en la Alimentación g/l

Sr = Conc. de Sustrato en el Fermentador g/l

Pr = Conc. del Producto dentro del fermentador g/l

Si se compara la productividad obtenida en el rotorfermentador con aquella obtenida en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) se tiene:

$$P' = \frac{FX}{V} = DX \quad (60)$$

en donde:

P = Productividad para células en un (CSTR) g/lhr

F = Flujo Volumétrico l/hr

V = Volumen del Reactor l

D = Velocidad de Dilución Hr⁻¹

Para un Rotorfermentador la productividad celular se define como:

$$Q_r = \frac{B X_r}{V_r} \quad (61)$$

en donde:

Q_r = Productividad en el Rotorfermentador gcél/lhr

B = Corriente celular en el estado estacionario l/hr

V_r = Volumen Neto del Rotorfermentador l

X_r = concentración Celular g/l

La proporción en productividad celular del Rotorfermentador y el CSTR, R_x, está dada como:

$$R_x = (B V / V_r F) (X_r / X) \quad (62)$$

En el estado Estacionario la velocidad específica μ en cada sistema está dada como:

$$\mu = F/V = B/V_r \quad (63)$$

Si se asume que el rotorfermentador opera a la misma velocidad de crecimiento μ que en el CSTR, la ec. 62, se reduce a:

$$R_x = X_r / X \quad (64)$$

La Ec. para la concentración celular en CSTR, se define como - lo expresa la Ec. 29.

$$X = Y_x / s (S_o - S)$$

y para el Rotorfermentador:

$$X_r = Y_x / s (S_o - S_r) \quad (65)$$

Si los dos fermentadores operan a la misma concentración de sus

trato, cumpliendo la expresión de la Ec. 64 y asumiendo los mismos valores de rendimiento, pueden combinarse las expresiones 29 y 65, obteniéndose:

$$\frac{X_r}{X} = \frac{F_r}{B} = 1 + \frac{L}{B} \quad (66)$$

$$R_x = 1 + \frac{L}{B} \quad (67)$$

Las ecuaciones 65 y 66 muestran que pueden alcanzarse elevadas proporciones de productividad, empleando el Rotorfermentador, empleando una relación alta de velocidad de alimentación y de velocidad de corriente celular.

De ahí, por medio de una adecuada selección de velocidades de flujo, el rotorfermentador puede cubrir las funciones de un fermentador tradicional y un separador de células.

Con respecto al producto, se puede obtener la misma proporción de productividad, de acuerdo a las expresiones para ésta, en CSTR y rotorfermentador como sigue:

$$R_p = \frac{(F_r/V_r)Pr}{(F/V)P} = \frac{B/V_r + (L/V_r)Pr}{(F/V)P} \quad (68)$$

Considerando que:

$$\mu = \frac{B}{V_r} = \frac{F}{V}$$

la Ec. 68 se reduce a:

$$R_p = 1 + (D_2/D_1)(Pr/P) \quad (69)$$

en donde R_p es la proporción de productividades para producto en CSTR y en el rotorfermentador.

En la Ec. 69, si $Pr \gg P$ y $D_2 \gg D_1$, entonces la proporción

R_p es mayor a 1. De aquí que la adecuada selección en las condiciones de operación para que $D_2 > D$ y además sea máxima, mientras que $Pr \gg P$, es posible alcanzar elevadas productividades para producto.

Algunas ventajas en el uso de un rotorfermentador y otros sistemas como reciclado, se presentan en los trabajos de Margarithis y Wilke (27).

Inmovilización de Células.-

Actualmente, el uso de células inmovilizadas en procesos industriales, ha tenido considerable atención en los últimos años.

Algunos de los sistemas inmovilizados para células se están utilizando ahora para la producción de jarabes fructosados y aminoácidos estereoespecíficos, además de la intensa investigación realizada por países desarrollados, para la obtención de combustibles y derivados del petróleo.

Para efectuar la inmovilización, las células pueden adherirse a sustancias de intercambio iónico insolubles en agua, por enlaces cruzados de célula a célula o entre células y un acarreador con un reactivo bifuncional, ó atrapándolas a un polímero donde permanecen físicamente retenidas.

Las ventajas de utilizar un sistema de este tipo, radican en que pueden alcanzarse cantidades mayores de células por volumen de fermentador, que en un sistema por lote, continuo ó con reciclado, dando en consecuencia, una mayor producción de alcohol. Además, no es necesaria la remoción ó reciclado de células.

las, lo que hace más eficiente la obtención de producto. Por último, el mantener una velocidad de crecimiento, no es un factor limitante para manejar una determinada velocidad de dilución, por lo que las velocidades de flujo pueden optimizarse para un mejor funcionamiento en el sistema, además de que se minimizan las posibilidades de contaminación, por las elevadas velocidades de dilución y por las altas densidades celulares.

Williams y Munneke (46) reportan productividades para alcohol en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando alginato y cloruro de calcio, hasta de 53.8 gETOH/lHr, a una velocidad de dilución de 4.6 Hr^{-1} , para concentración de glucosa de 100 g/l.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aiba, S. et.al. "Biochemical Engineering". Academic Press. New - York. 2nd. Ed. 1973.
- 2.- Azúcar S.A. "Programa Institucional de Mediano Plazo de Azúcar S.A. de C.V. 1984-1988" SEMIP-AZUCAR S.A.
- 3.- Azúcar S.A. "Estadísticas Azucareras 1985"
- 4.- Bose, K., T.Ghose. 1973. "Studies of Continuous Fermentation of Sugar Cane Molasses by Yeasts". Process Biochemistry. 6 -- (2): 23-26.
- 5.- Brok, T., K.Brok. "Basic Microbiology." Prentice-Hall Inc. --- 2nd. Ed. Ed. Englewood Cliffs. N.Y. 1978.
- 6.- Campbell, W. 1977. "Waste-Water Treatment in Brewing and Distilling". Process Biochemistry. June. 6-8, 32.
- 7.- Cedeño, Cruz M. "Perspectivas de la Producción de Etanol a -- Partir del Jugo de Henequén (Agave Four Craydes)". Revista del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico-de Mérida. Año I. No.1 Julio 1985.
- 8.- Costa Ribero, C.O., Castello. J.R. 1980. "Ethanol Stillage: A Resource Disguised as a Nuisance". Centro de Tecnología Pro -- mún. Rio de Janeiro. Brasil.
- 9.- Chichester, C.O., Gorgatti Netto, A., Prebluda, H.J. 1981. "The Biotechnology Challenge in Brazil." Developements in Industrial Microbiology. 22 p.121-123.
- 10.- Dhamija, S.S., Sharma, S. et.al. "Fermentation Alcohol from Cane Molasses by Fast Fermenting Yeast and its Cell Recycling". Pro

- ceedings of the XVII Congress of International Society of -
Sugar Cane Technology. Brión López, M., Madrazo, C.
- 11.- Dombek, K.M., Ingram, L.O. "Ethanol Production During Batch Fermentation with *Saccharomyces Cerevisiae*. Changes in Glycolytic Enzyme and Internal pH." Applied and Environmental Microbiology. p.1286-1291. June. 1987.
 - 12.- Eder, K. 1976. "Tratamiento y Aprovechamiento de Aguas Residuales en Fábricas de Levadura y Alcohol." Revista de Ingeniería Química. Junio. p.103-111
 - 13.- Enciclopedia Monitor. Tomo III. p.1142-1143.
 - 14.- Faber, M.D. 1981. "Production of Ethanol from Renewable Resources. An Assessment." Developments in Industrial Microbiology. 22. p.111-117.
 - 15.- Furukawa, K. et.al. 1983. "Influence of the Oxygen on the -- Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture."-- Biotechnology and Bioengineering. XXV. p.2293-2317.
 - 16.- Guerrero Reynoso, J.L. "Fábrica de Alcohol". Unión Nacional de Productores de Azúcar S.A. Gerencia Técnica de Fábrica. FINASA. 1980.
 - 17.- Hagelberg, G.B., Krause, E.W. "Technological Choices in Sugar Processing." Appropriate Industrial Technology for Sugar. Vie nna. United Nations Industrial Development Organization.
 - 18.- Herbert, D. et.al. 1956. "The Continuous Culture of Bacteria: A Theoretical and Experimental Study." Journal of General Microbiology. 14 (8): p.601-622.
 - 19.- Kapelli, O., González, L., Frechter, A. "Biochemical Engineering

Aspects of the Aerobic Production of Ethanol". Institute of Biotechnology. Swiss Federal Institute of Technology. Hongerberg. 8093. Zürich, Switzerland.

- 20.- Kretzschmar, G. "Levaduras y Alcoholes y otros Productos de Fermentación." Ed. Reverté. Barcelona, España. 1961
- 21.- Leuenberger, H. 1971. "Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture." Arch. Microbiology. 79. p.177-186.
- 22.- López Mercado, V. "Estudio de la Cinética de Degradación de Detergentes de uso Doméstico en un Sistema de Lodos Activados. Tesis de Maestría. Depto. de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. 1988.
- 23.- Luchi, N.R. 1981. "Ethanol Value as a Nafta Substitute." Chemical Economy and Engineering Review. 13. (6). p.12-16.
- 24.- Maites, L. "Handbook of Analytical Chemistry". McGraw-Hill - Co. 1a. Ed. 1963.
- 25.- Málek, I. et.al. 1969. "Continuous Cultivation of Microorganisms." Academic Press. N.y. and London.
- 26.- Margaritis, A., Wilke, Ch. 1978. "The Rotofermentor I. Description of the Apparatus, Power Requirements and Mass Transfer Characteristics. "Biotech. and Bioeng. XX. p. 709-726.
- 27.- Margaritis, A., Wilke, Ch. 1978. "The Rotofermentor II. Applications to Ethanol Fermentation. "Biotech. and Bioeng. XX -- p. 727-753.
- 28.- Monteiro, C.E. 1975. "Brazilian Experience with the Disposal of Waste-Water from the Cane Sugar and Alcohol Industry." Process Biochemistry. p.33-49. Nov.
- 29.- Murtagh, J.E. 1986. "Fuel Ethanol Production. The United States

- Experience." Process Biochemistry. p.61-65.
- 30.- Namba, A., Nishisawa, Y. 1987. "Kinetic Analysis for Batch --- Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Fermentation Technology. 65. (3): p. 277-283.
- 31.- Oura, E. 1977. "Reaction Products of Yeast Fermentations." Process Biochemistry. p.1921-35. April.
- 32.- Parulekar, S.J., et.al. 1986. "Induction and Elimination of - Oscillations in Continuous Cultures of *Saccharomyces cerevi - stae*." Biotech. and Bioeng. XXVII. p. 700-710.
- 33.- Paturau, J.M. "Is Ethanol the Fuel of the Future from Sugar - Cane Producing Territories of the Third World?". Proceedings - of the VII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Brion López, M., Madrazo, C.
- 34.- Peregó, L. et.al. 1985. "Influence of Temperature, Dilution -- Rate and Sugar Concentration on the Stablishment on Steady --- State of Continuous Ethanol Fermentation of Molasses." Biomass, 6. p. 247- 256.
- 35.- Phaff, H.J. et.al. "The Life of Yeasts." Harvard University - Press. Cambridge Massachusetts. 2nd. Ed. 1968.
- 36.- Quintero Ramirez, R. "Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaci^o nes." Ed. Alhambra Mexicana S.A. 1a. Ed. 1981.
- 37.- Ramalingham, A., Fin, R.K. 1977. "The Vacuform Process, a New - Approach to Fermentation Alcohol." Biotech. and Bioeng. XIX: - p.583-589.
- 38.- Reed, G., Peppler, H.J. "Yeast Technology". AVI Publishing Co. Westport, Connecticut. 1973.

- 39.- Rodríguez Arreola, C., García Olivares, J. "Optimización de la Producción de Etanol a Partir de Melaza y Reuso de Vinaza." Tesis Profesional. FES-Cuautitlán. UNAM. México. 1986.
- 40.- Rodríguez L. 1984. "Comercialización Internacional de Mieles. La Importancia de los Mercados de Melaza." Coloquio Internacional sobre Edulcorantes. Cuadernos GEPLACEA.
- 41.- Rose, A.H. "the Yeasts". Academic Press. London and N.Y. V.1 - 1969.
- 42.- Sa-Correia, I., van Uden, N. 1986. "Ethanol Induced Death of *Saccharomyces cerevisiae* at Low and Intermediate Growth Temperatures." Biotech. and Bioeng. XXVIII: 301-303.
- 43.- Secretaría de Recursos Hidráulicos. 1973. "Métodos de Análisis de Agua y Agua Residual." CIECCA.
- 44.- Skinner, F.A., Passmore, S.M. 1980. "Biology and Activities of Yeast." Symposium Series. No.9. Society Applied Microbiology. Academic Press. England. 1980.
- 45.- Tajima, K. H. Yoshizum. 1975. "Mechanisms of Abnormal Fermentations of Distillery Yeasts in Salted Media (such as Molasses Media), from the Point of NADP Redox Balances." Journal Fermentation Technology. 53 (12): p.841.
- 46.- Williams, F., Munneke, D.M. 1981. "The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells." Biotech. and Bioeng. XXIII. p.1813-1825.
- 47.- Yang, V., Trindade, S.C. 1984. "Gashol Program in Brazil." Chemical Economy and Engineering Review. 2 (3): p.12-19.