



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA

FACULTAD DE INGENIERÍA

**INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS
Y
FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS CONCENTRADOS DE MELAZA**

TESIS

Presentada a la Junta Directiva de la
Facultad de Ingeniería
por

VERA VLASTA NOVOTNY PRIBIK

Al conferirsele el título de

INGENIERO QUÍMICO

Guatemala, marzo de 1996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

08
T(3703)
C.4

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de tesis titulado:

**INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS
Y
FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS CONCENTRADOS DE MELAZA**

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química.


Vera Vlasta Novotny Pribik



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE INGENIERÍA

MIEMBROS DE LA JUNTA DIRECTIVA

DECANO	ING. JULIO ISMAEL GONZÁLEZ PODSZUECK
VOCAL PRIMERO	ING. MIGUEL ANGEL SÁNCHEZ GUERRA
VOCAL SEGUNDO	ING. JACK DOUGLAS IBARRA SOLORZANO
VOCAL TERCERO	ING. JUAN ADOLFO ECHEVERRÍA MÉNDEZ
VOCAL CUARTO	BR. FERNANDO W. DE LEÓN CONTRERAS
VOCAL QUINTO	BR. PEDRO IGNACIO ESCALANTE PASTOR
SECRETARIO	ING. FRANCISCO JAVIER GONZÁLEZ LÓPEZ

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	ING. JULIO ISMAEL GONZÁLEZ PODSZUECK
EXAMINADOR	ING. OTTO RAUL R. DE LEÓN
EXAMINADOR	ING. MARIO RIVERA
EXAMINADOR	ING. OSCAR AVENDAÑO
SECRETARIO	ING. EDGAR JOSÉ A. BRAVATTI CASTRO



INSTITUTO CENTROAMERICANO DE
INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA INDUSTRIAL
(ICAITI)

COSTA RICA
EL SALVADOR
GUATEMALA
HONDURAS
NICARAGUA
PANAMÁ

CENTRAL AMERICAN RESEARCH INSTITUTE FOR INDUSTRY
Avenida La Reforma 4-47, Zona 10-01010
APARTADO POSTAL 1552-01901
GUATEMALA, C. A.

Cables: ICAITI
TELÉFONOS: 310631/5 P. B. X.,
340209/12, 340672/5
Fax: (502-2) 317470
CORREO ELECTRÓNICO:
icaigt@uvg.edu.gt

Guatemala, 18 de septiembre de 1995

Dr. Adolfo Gramajo
Director
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Ciudad Universitaria Zona 12
Guatemala

Estimado Dr. Gramajo:

Por medio de la presente le comunico a usted que he asesorado el trabajo de tesis "Inmovilización de levaduras y fermentación de sustratos concentrados de melaza" desarrollado por la estudiante Vera Vlasta Novotny Pribik, para optar al título de Ingeniero Químico.

En mi calidad de asesor, procedí a supervisar el trabajo de protocolo, la realización práctica y el informe final de tesis que resume lo efectuado por la Señora Novotny y me parecen satisfactoriamente desarrollados. Por lo tanto ella y yo nos responsabilizamos por el contenido de los mismos.

Es, por tanto, mi opinión que dicho informe de tesis sea aprobado, procediéndose posteriormente, a su impresión y divulgación.

En espera de que ustedes queden igualmente satisfechos con el presente trabajo, me suscribo,

Atentamente,

Sheryl Schneider de Cabrera
Jefe, Area de Servicios Analíticos y de Información

OFICINAS REGIONALES DEL ICAITI EN:

ICAITI - Costa Rica
Cámara de Industrias de
Costa Rica
A. P. 10 003
San José, Costa Rica
Tel: 2232411
Fax: (506) 2229881

ICAITI - El Salvador
Edificio Torre Roble
A.P. 14113
San Salvador, El
Salvador
Tel: 2232835
Fax: (503) 2232635

ICAITI - Honduras
Plaza Miraflores
A. P. 20449
Comayagua, Honduras
Tel: 312246
Fax: (504) 310434

ICAITI-Nicaragua
Cámara de Industrias de
Nicaragua
A. P. 1436
Managua, Nicaragua
Tel: 684209
Fax: (505-2) 684209

ICAITI-Panamá
A. P. 9034
Panamá, República de
Panamá
Tel: 618993
Fax: (507) 617112

Miembro de la Comisión Panamericana de Normas Técnicas, COPANT

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERIA

Escuelas de Ingeniería Civil, Ingeniería
Mecánica Industrial, Ingeniería Química,
Ingeniería Mecánica Eléctrica, Técnica
y Regional de Post-grado de Ingeniería
Sanitaria.

Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Centroamérica

Guatemala, 10 de Octubre de 1,995

Dr. Adolfo Gramajo
Director
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Ciudad Universitaria zona 12
Guatemala

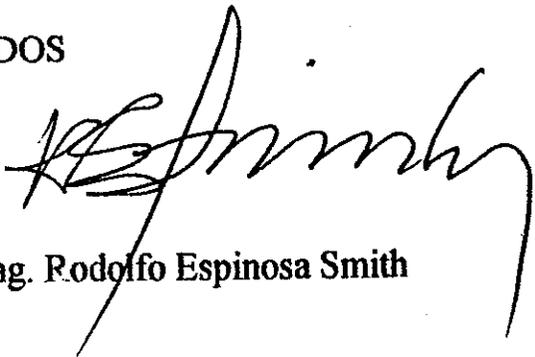
Estimado Doctor Gramajo:

Por este medio deseo manifestarle que, luego de revisar el Informe Final de Tesis de la estudiante **VERA VLASTA NOVOTNY PRIBIK**, titulado: **INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS Y FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS CONCENTRADOS DE MELAZA**, considero satisfactoria la realización de dicho trabajo de investigación y procede el trámite de autorización del mismo.

Sin otra particular y agradeciendo la atención que se sirva dar a la presente, le saluda

Atentamente

ID Y ENSEÑAD A TODOS


Ing. Rodolfo Espinosa Smith

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERIA

Escuelas de Ingeniería Civil, Ingeniería
Mecánica Industrial, Ingeniería Química,
Ingeniería Mecánica Eléctrica, Técnica
y Regional de Post-grado de Ingeniería
Sanitaria.

Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Centroamérica

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor con el Visto Bueno del Revisor al trabajo de tesis titulado **INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS Y FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS CONCENTRADOS DE MELAZA**, presentado por la estudiante **VERA VLASTA NOVOTNY PRIBIK**, recomienda la autorización del mismo.

ID Y ENSEÑAD A TODOS

Dr. Adolfo Gramajo
DIRECTOR
INGENIERIA QUIMICA



Guatemala, Febrero de 1,996

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERIA

Escuelas de Ingeniería Civil, Ingeniería
Mecánica Industrial, Ingeniería Química,
Ingeniería Mecánica Eléctrica, Técnica
y Regional de Post-grado de Ingeniería
Sanitaria.

Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Centroamérica

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la autorización por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, Dr. Adolfo Gramajo, al trabajo de tesis titulado **INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS Y FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS CONCENTRADOS DE MELAZA**, presentado por la estudiante universitaria **VERA VLASTA NOVOTNY PRIBIK**, procede a la autorización para la impresión de la misma.

IMPRIMASE

Ing. Julio Ismael González Podszueck
DECANO



Guatemala, febrero de 1,996

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES

VACLAV NOVOTNY PODANA
EDITH PRIBIK DE NOVOTNY

A MIS HIJOS

HERMANN ESTUARDO Y VERA TATIANA
con todo mi amor;
como un ejemplo para su futuro.

A MI ESPOSO

AUGUSTO ALBERTO DOMÍNGUEZ

A MIS HERMANOS

CARLOS FRANCISCO
HERMANN ROALD +
SABINE ANTONIA
ELFRIEDE MANUELA

A MIS SOBRINOS

EDITH JOHANNA ÁLVAREZ NOVOTNY
FRANZ VACLAV ÁLVAREZ NOVOTNY
KAREL THOMAS NOVOTNY CARRASCO
KARINA DESIREÉ NOVOTNY CARRASCO

AGRADECIMIENTO

A MIS PADRES, por su amor, su entusiasmo, su apoyo y por haber confiado en mi

A MIS HIJOS, por su amor, sus sonrisas, por su tiempo que usé para mis estudios.

A MI ESPOSO, por su amor, su colaboración y paciencia.

A MIS HERMANAS, SABINA, por cuidar y querer a mis hijos; FRIEDEL, por ser mi inspiración en los estudios y compañera inseparable.

A Sheril de Cabrera, por darme entusiasmo en mi carrera a través de sus enseñanzas, por su confianza y su ayuda en mis estudios y en la elaboración de ésta tesis.

Al Doctor Rodolfo Espinosa, por su valiosa colaboración en la elaboración de ésta tesis.

Al personal del Laboratorio de Microbiología del ICAITI, especialmente a mis compañeras de investigación Dyna de Sarmientos y Luisa Fernanda Barrientos.

A mis compañeros de estudios.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	1
GLOSARIO	4
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO 1	
Antecedentes	10
Introducción	10
Historia de las levaduras inmovilizadas	10
Definiciones y alcances	11
Tipos de inmovilización	11
Productividad	14
Algas como reactivos de inmovilización	14
Algin	15
Influencia de las propiedades del alginato en las características del medio	17
Ventajas del proceso de inmovilización	17
Desventajas del proceso de inmovilización	18
Reactor de levaduras inmovilizadas	18
Efectos de etanol	19
Inhibición por etanol	19
Inhibición por temperatura	22
Influencia de la composición del medio	22
Efecto de oxígeno	23
Suplementos	25
Necesidad de suplementar	25
Tasa máxima de crecimiento	26
Difusividad	27
Efectos de la concentración del alginato	30
Fermentación de medios concentrados	31
Efectos de la tasa de dilución	31
CAPÍTULO 2	
Justificaciones	32
CAPÍTULO 3	
Objetivos	33
CAPÍTULO 4	
Hipótesis	34

CAPÍTULO 5	
Metodología	
Materiales	35
Métodos	38
CAPÍTULO 6	
Resultados	41
CAPÍTULO 7	
Discusión de resultados	43
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS	49
ANEXOS	
Melaza	55
Tablas de resultados	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Coeficiente de difusión de algunos geles de alginato	28
Tabla 2	Efecto de la tasa de dilución	31
Tabla 3	Resultados; fermentación por tandas	42
Tabla 4	Resultados; fermentación continua	42
Tabla 5	Resultados; fermentación sin esterilizar / sin suplemento	59
Tabla 6	Resultados; fermentación estéril / sin suplemento	59
Tabla 7	Resultados; fermentación estéril / leche descremada	60
Tabla 8	Resultados; fermentación estéril / extracto de levadura	60
Tabla 9	Resultados; fermentación estéril / harina de soya	61
Tabla 10	Resultados; fermentación estéril / xylan	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de inmovilización	12
Figura 2	Inmovilización por entrapamiento en geles	13
Figura 3	Productividad de etanol	14
Figura 4	Comportamiento de levaduras inmovilizadas	15
Figura 5	Microfotografías de un corte de perla	16
Figura 6	Curso típico de fermentación con <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 7	Diagrama de la conversión original de inhibición de etanol, a una función no lineal	21
Figura 8	Efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la tasa de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 9	Efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la tasa de consumo de glucosa	24
Figura 10	Efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la tasa de producción de etanol	24
Figura 11	Efectos de la concentración alginato de calcio en los coeficientes de difusión de glucosa y etanol	30
Figura 12	Usos de la melaza	56
Figura 13	Constituyentes de la melaza	58
Figura 14	Gráfica correspondiente a tabla 5	59
Figura 15	Gráfica correspondiente a tabla 6	60
Figura 16	Gráfica correspondiente a tabla 7	61
Figura 17	Gráfica correspondiente a tabla 8	62
Figura 18	Gráfica correspondiente a tabla 9	63
Figura 19	Gráfica correspondiente a tabla 10	64

GLOSARIO

1. Acidez: medida de los iones hidrógeno que contiene una solución.
2. Aerobio: se dice de aquel microorganismo que requiere de la presencia de oxígeno.
3. Alcohol: es el nombre que se le da al grupo de compuestos químicos orgánicos, formados de carbono, hidrógeno y oxígeno. Son grupos de moléculas que varían en la longitud de sus cadenas y están compuestas de grupos hidrocarbano y grupos hidroxilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OH}$). Incluye entre otros al metanol, etanol e isopropilalcohol.
4. Alginato de Sodio: es un polisacárido que se gelatiniza y es extraído principalmente, del alga café gigante *Macrocystis pyrifera*. Es un polvo color crema, soluble en agua, forma soluciones coloidales viscosas. Insoluble en alcohol, cloroformo, éter y soluciones ácidas de pH menor que 3.
5. Alimentación: adición de substrato al reactor para el crecimiento de los microorganismos.
6. Anaerobio: Se dice de aquel microorganismo que vive sin la presencia de aire.
7. Biomasa: masa seca de microorganismos dado en términos de un área o volumen definido.
8. Brix: escala arbitraria basada en la concentración de sacarosa pura, en agua.
9. Centrífuga: es una máquina rotatoria diseñada para separar los sólidos suspendidos de los líquidos o líquidos de diferentes gravedades específicas, por medio de la fuerza centrífuga generada por el movimiento rotatorio.
10. Clarificación: separación de ceras, grasas, sólidos no solubles y partículas coloidales de una solución. Para fines del presente trabajo, la solución es melaza o miel de purga.

11. **Compuesto:** término químico que denota una combinación de dos o más distintos elementos.
12. **Concentración:** es el porcentaje de masa o volumen de un soluto presente en una solución.
13. **Co-productos:** son sustancias y materiales que acompañan a la producción de etanol en el proceso de fermentación.
14. **Dióxido de Carbono:** es un gas producido como un sub-producto de la fermentación. Su fórmula química es CO_2 .
15. **Etanol:** $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, es el alcohol producto de la fermentación. Es usado en las bebidas alcohólicas y para propósitos industriales. Este es el término con el cual se denomina al alcohol anhidro.
16. **Fermentación:** es un término usado desde el año 1600. Denota la transformación (descomposición) de materia orgánica, especialmente carbohidratos, generalmente con formación de gas.
17. **Fermentación continua:** Es un sistema de fermentación estable, que opera sin interrupción. Cada etapa de la fermentación se lleva a cabo en una sección diferente del fermentador. Los flujos de fluidos son establecidos de acuerdo a la tasa de dilución deseada.
18. **Fermentación por lotes ("Batch" o tandas):** es una fermentación en la cual los componentes presentes desde el inicio permanecen juntos.
19. **Flujo:** volumen de solución por unidad de tiempo.
20. **Hidróxido:** sal mineral soluble de baja densidad, bajo punto de fusión y altamente reactivo con metales. Característicamente básico en la naturaleza.
21. **Inmovilización:** confinamiento de microorganismos por atrapamiento en perlas de alginato de calcio, por ejemplo.

22. Inóculo: es una cierta cantidad de levadura u otro microorganismo producida a partir de un cultivo puro. Es usado para comenzar un nuevo cultivo.
23. Levaduras: grupo de hongos unicelulares carentes de micelio, que provocan la fermentación de sustratos orgánicos, por ejemplo, la conversión de azúcar en alcohol. Producen dióxido de carbono en condiciones anaeróbicas.
24. Medio de cultivo: es la solución que sirve como fuente de azúcares para la fermentación.
25. Melaza: subproducto de la producción de azúcar. Es la miel de purga después de remover la sacarosa en cristales.
26. Nutrientes: son compuestos suplementarios necesarios para el metabolismo de organismos vivos (Nitrógeno, Fósforo, Calcio, Sodio, Hierro, Zinc, Cobalto, Magnesio, Manganeso, Potasio, vitaminas, factores de crecimiento, etc.).
27. pH - potencial de Hidrógeno: es un término usado para describir la concentración de iones hidrógeno libres en un sistema. Una solución de pH menor que 7 (0-7) es ácida. pH igual a 7 es neutral y pH mayor de 7 y hasta 14 es alcalino.
28. Refractómetro: aparato usado para medir la cantidad de sólidos en solución, por medio de refracción de la luz.
29. *Saccharomyces*: género de levaduras altamente fermentadoras. Las células son usualmente esferoides, ovoides, elipsoidales o alargadas. Se propagan por gemación multilateral, producen de 1 a 4 esferas. La más conocida de este género es la *Saccharomyces cerevisiae*.
30. Substrato: fuente principal de carbono para el microorganismo.
31. Tasa de dilución: denota el tiempo inverso de residencia del substrato dentro del fermentador.

RESUMEN

La melaza es un producto abundante en Guatemala y que es, comercialmente, poco aprovechado. Por eso se propuso fermentarla para obtener etanol. Se implementó un método de inmovilización de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio y se usaron en fermentaciones de sustratos concentrados de melaza con y sin adición de suplementos nutricionales.

La inmovilización se efectuó dejando gotear una solución de alginato de sodio al 3% w/v, conteniendo levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en una solución refrigerada de cloruro de calcio 0.1 M y pH = 4. El alginato forma esferas o perlas en las que quedan atrapadas las levaduras.

Como sustrato se usó una solución de melaza conteniendo 35% de sólidos, aproximadamente. Dicho sustrato fué clarificado por acidificación, calentamiento y centrifugación, consecutivamente. La proporción de volumen sustrato : perlas de alginato, fué de 7 : 3 (v/v).

Se usaron como suplementos atrapados dentro de las perlas, leche descremada, xylan, extracto de levadura, harina de soya y quitina, todos estos al 2% w/v y ácido oléico al 0.04%. La quitina se descartó debido a la imposibilidad de atrapar dentro de las perlas, las hojuelas insolubles que conforman la quitina. La temperatura de las fermentaciones fluctuó entre 28 y 32°C, el pH entre 4.3 y 4.7, en condición anaeróbica. El flujo continuo tuvo una tasa de dilución de 0.1/h.

Se obtuvo en la fermentación del sustrato sin esterilizar y sin adición de suplementos, después de 21 horas de fermentación por lote, un máximo de etanol del 6.87% v/v fluctuando entre 6.66% y 5.93% en la fermentación continua.

En sustrato sin suplemento pero esterilizado, el máximo de etanol de 8.50% v/v, se obtuvo a las 18 horas de fermentación por lotes. En fermentación continua el porcentaje de etanol varió desde 7.22 hasta 3.72%v/v en un tiempo de dos a cinco días.

En la adición de suplementos a las perlas se obtuvieron los siguientes resultados: Leche descremada - fermentación por lotes - en 24 horas, 7.89%v/v; en fermentación continua - 5.40 a 2.73%v/v. Extracto de levadura -en 18 horas- 7.96%v/v, en fermentación continua - 2.26 a 1.65 %v/v. Harina de soya en 24

horas - 6.36%v/v; en fermentación continua - 6.21 a 3.10%v/v. Ácido oléico en 24 horas - 6.93%v/v. Las fermentaciones con xylan como suplemento alcanzaron el máximo de etanol del 5.94%v/v después de tres días de fermentación por lotes unas horas y continua en otras, variando los demás resultados entre 5.48 y 2.11%v/v.

De esto se pudo concluir que la suplementación en el interior de las perlas con los compuestos usados, no mejora la eficiencia en la producción de etanol y en algunos casos, como con la harina de soya y el ácido oléico, hasta entorpece la producción inicial de etanol, ya que de 8.50% v/v sin suplementos, baja a 6.21 y 6.93% v/v respectivamente.

INTRODUCCIÓN

El etanol es un solvente orgánico importante y materia prima para muchos otros compuestos orgánicos. Es una fuente alterna valiosa de energía que substituye compuestos provenientes del petróleo natural. Es producido por métodos sintéticos en países altamente desarrolladas y por el antiguo método de fermentación, en países en vías de desarrollo.

Las fermentaciones son, generalmente, llevadas a cabo por levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y especies afines. Estas levaduras tienen la habilidad de tomar y fermentar un amplio número de azúcares. Algunas bacterias como *Zymomonas mobilis* han demostrado tener una tasa específica de consumo de glucosa mayor, pero son menos tolerantes al etanol.

En Guatemala se han desarrollado métodos muy interesantes para producir etanol de los subproductos de la fabricación de azúcar a partir de caña. El método que en este trabajo se presenta, consiste en utilizar levaduras *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en perlas de alginato de calcio, incluyendo en la retención, suplementos para contrarrestar las deficiencias nutricionales del substrato usado. Dicho substrato es una solución concentrada de melaza que contiene de 35 a 38% de sólidos.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

ADVERTENCIA

El etanol es un compuesto orgánico importante producido, ya sea por químicos o por fermentación. Se usan, mayormente, almidones y melazas. Los países productores de caña de azúcar, utilizan la melaza de caña mientras que los europeos utilizan melaza de remolacha azucarera. (10) (39)

Las levaduras son, sin duda, el grupo de microorganismos más importante explotado comercialmente por el hombre. Su contribución en el progreso del hombre ha sido basada ampliamente en la capacidad de ciertas levaduras de efectuar una rápida y eficiente conversión de azúcares en etanol y dióxido de carbono y de conducir fermentaciones con jugo de uva, extractos de granos y leche o suero de leche. Actualmente, solo la *Saccharomyces cerevisiae* y especies afines son de importancia industrial. Esta levadura tiene la habilidad de tomar y fermentar un amplio rango de azúcares, por ejemplo: sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa y maltotriosa. En adición, especies íntimamente ligadas como *Saccharomyces uvaurum* y *Saccharomyces diastaticus*, son capaces de utilizar almidón o dextrina y melobiosa respectivamente. (17) (38) (44)

HISTORIA DE LEVADURAS INMOVILIZADAS

El estudio de microorganismos inmovilizados es un área de investigación que se está expandiendo rápidamente. Durante los últimos años, varios nuevos procesos de inmovilización han sido desarrollados buscando su utilidad comercial.

La conversión de vino en vinagre, se creía que era un reacción únicamente química, hasta que en 1864 Pasteur (43), aparte de sus otros numerosos talentos, es acreditado por reconocer y desarrollar el primer sistema racional de células inmovilizadas. En el proceso "Pasteur" u "Orleans", un tonel es, parcialmente, llenado con una mezcla de vino y vinagre y se deja desarrollar una película microbiana en la superficie. Esta película se desarrolla en una espesa capa gelatinosa que, eventualmente, se hunde y ya no permite más la acetificación. Pasteur sugirió que un soporte mecánico se usara para prevenir que esa capa se

hundiera. El soporte inmovilizaba los microorganismos y así extendía la fermentación ya que permitía recuperar, periódicamente, el vinagre y reponer el vino sin estorbar o destruir la capa.

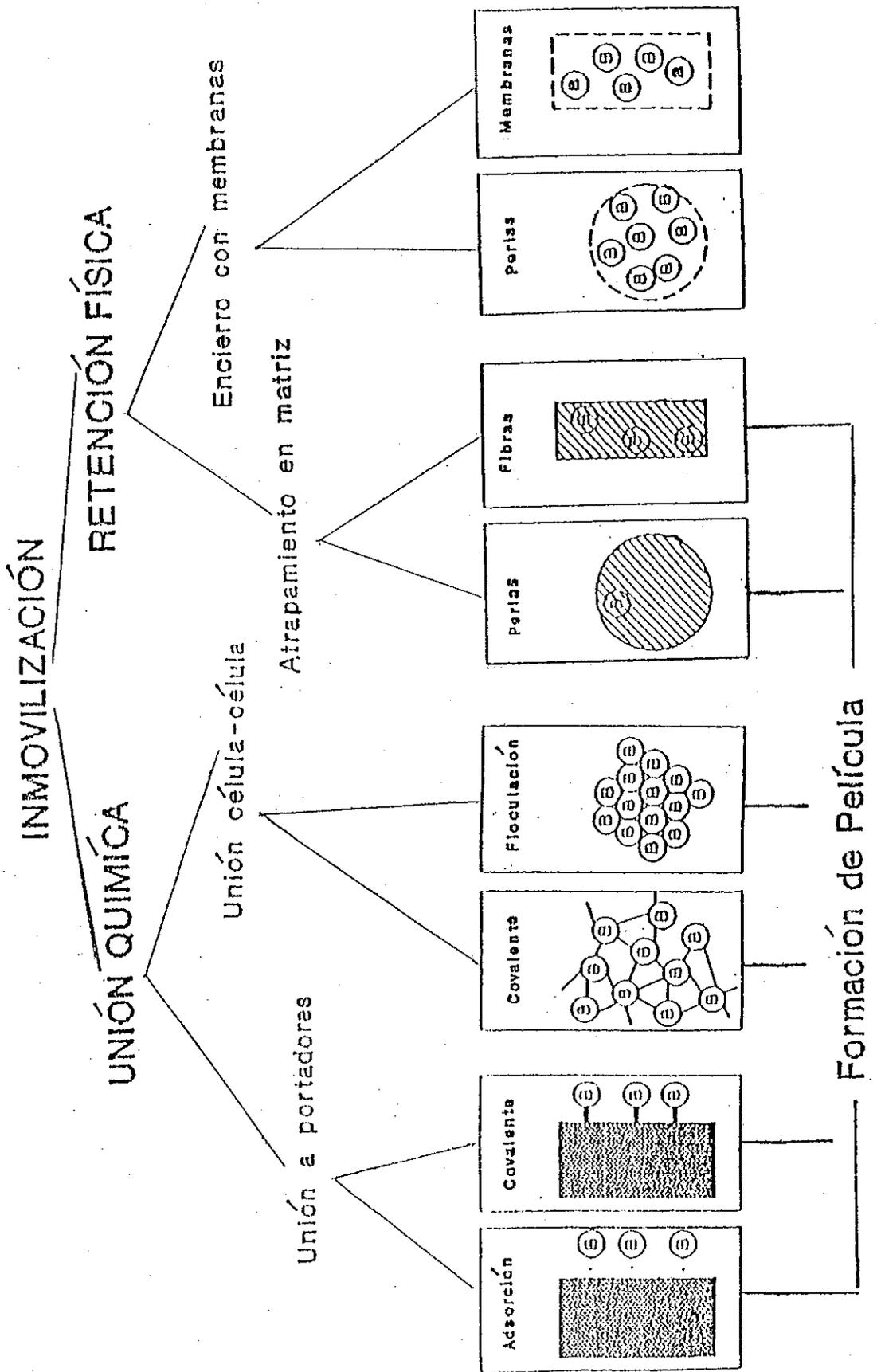
DEFINICIONES Y ALCANCES

El término, microorganismos inmovilizados, no debería ser restringido a superficies sólidas. Más bien, inmovilización debe ser considerado como la localización o confinamiento físico de un microorganismo que permita el reuso económico del mismo. Esta definición, operacionalmente aceptada, es un poco ambigua debido al uso del término 'económico'. Esto es porque el término quiere excluir procesos en los cuales las células son recuperadas y reusadas usando técnicas como la centrifugación o filtración. Estas técnicas pueden ser exitosamente empleadas, pero, para aplicaciones comerciales prácticas, no son económicamente factibles. En cambio, la formación de perlas o flóculos de biomasa, son métodos de inmovilización que sí están dentro del alcance de la definición. (1)

TIPOS DE INMOVILIZACIÓN

En la figura 1 se muestran diferentes tipos de inmovilización. (36)

FIGURA 1



La figura 2 muestra los tipos de inmovilización más comunes por atrapamiento en geles.

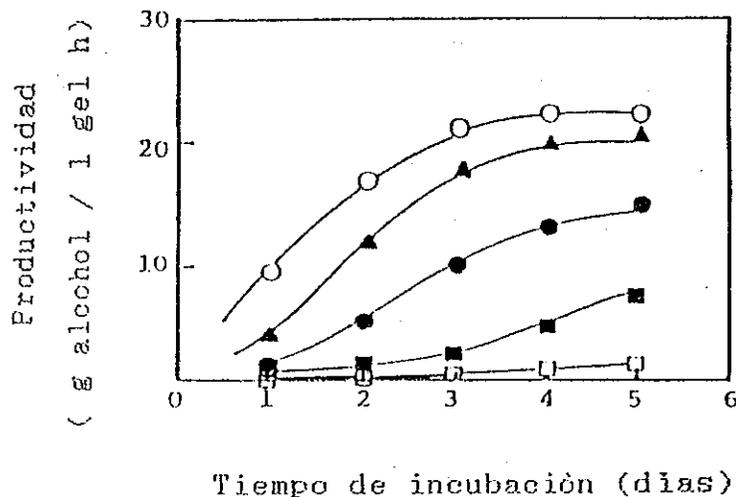
Figura 2

Tipo de inmovilización	Material	Problema de su uso
Polimerización	Poliacrilamida, alcohol polivinílico	Toxicidad del monómero
Policondensación	Poliuretano	Especial para conversión de compuestos hidrofóbicos
Gelación de polímero	Agarosa, gelatina	Baja resistencia mecánica y alta temperatura durante la formación
Precipitación del polímero	Celulosa, poliestireno	contacto con soluciones apolares durante la formación
Gelación ionotrópica de polímeros	alginato de calcio, carboximetilcelulosa (Ca), quitosan (PO ⁻), carageenan (K), técnicas más comunmente usadas	Formación de quelatos o precipitación de contenidos durante la fermentación

PRODUCTIVIDAD

Según el polímero en el cual hayan sido atrapados los microorganismos, cambiará la productividad de la fermentación llevada a cabo. La figura 1 muestra estas diferencias para algunos polímeros. (39)

Figura 3



Productividad de etanol con levaduras inmovilizadas atrapadas en diferentes polímeros: (○) alginato de calcio, gel; (▲) poliacrilamida, gel; (●) resina epoxiporosa; (■) poliestireno poroso; (□) microcápsulas de poliéster poroso.

ALGAS COMO REACTIVOS DE INMOVILIZACIÓN

Como productos comerciales, hay tres polisacáridos principales originarios de algas: agar, algin y carageenan. Como son sustancias naturales, no es de sorprenderse que cada uno exista en un número de formas relacionado con la fuente de alga marina, localización geográfica y fuente de cultivo. Cada uno de los tres tiene características propias: el agar forma geles, térmicamente, reversibles que no dependen de cationes, K-carageenan forma geles, térmicamente, reversibles que requieren iones de potasio y algin forma geles

irreversibles con iones calcio. (26) Estos geles son porosos y, dentro de ciertos límites, permiten la difusión de sustratos, productos y productos secundarios. En 1882, Koch fué el primero en reportar el uso de polisacáridos provenientes de algas para inmovilizar células; en Japón se usaba desde mucho antes para comidas gelatinizadas. (26)

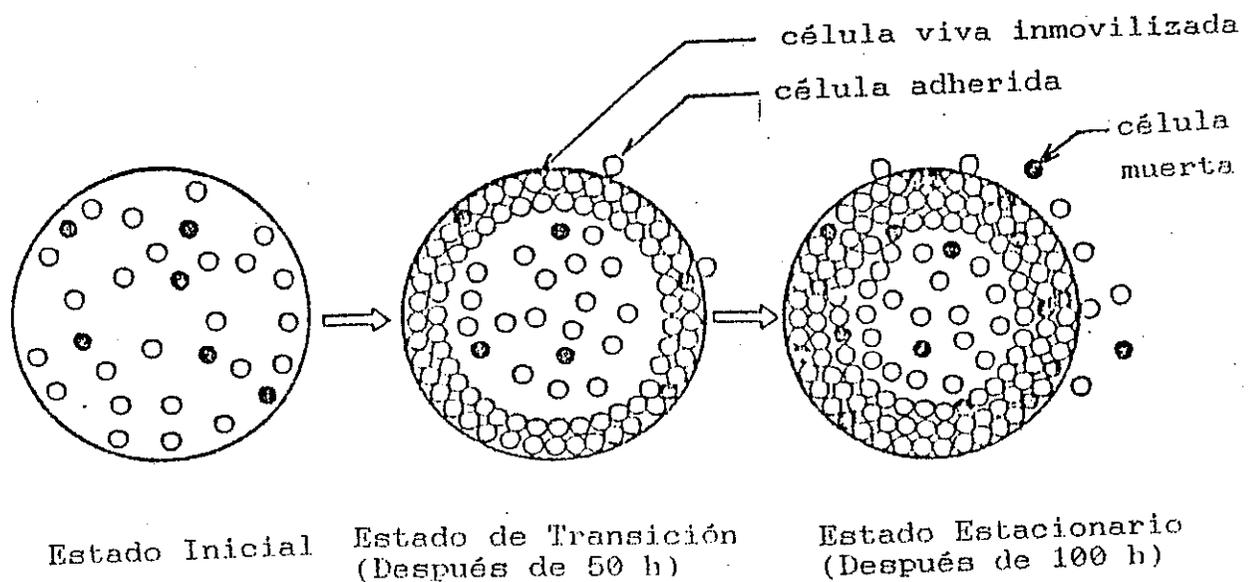
ALGIN

Este polisacárido se encuentra en algas de color café, aunque sólo algunas son comercialmente importantes. De éstas, la especie gigante de las costas de California, *Macrocystis pyrifera* es la fuente principal. Otras especies importantes crecen en aguas poco profundas y áreas rocosas como *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* y *Eklonia cava*. De menor importancia son *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* y *Pelvetia canaliculata*. (26)

Químicamente, los alginatos consisten en polímeros lineales de ácido β -D-Manurónico y ácido L-Gulurónico. (26)

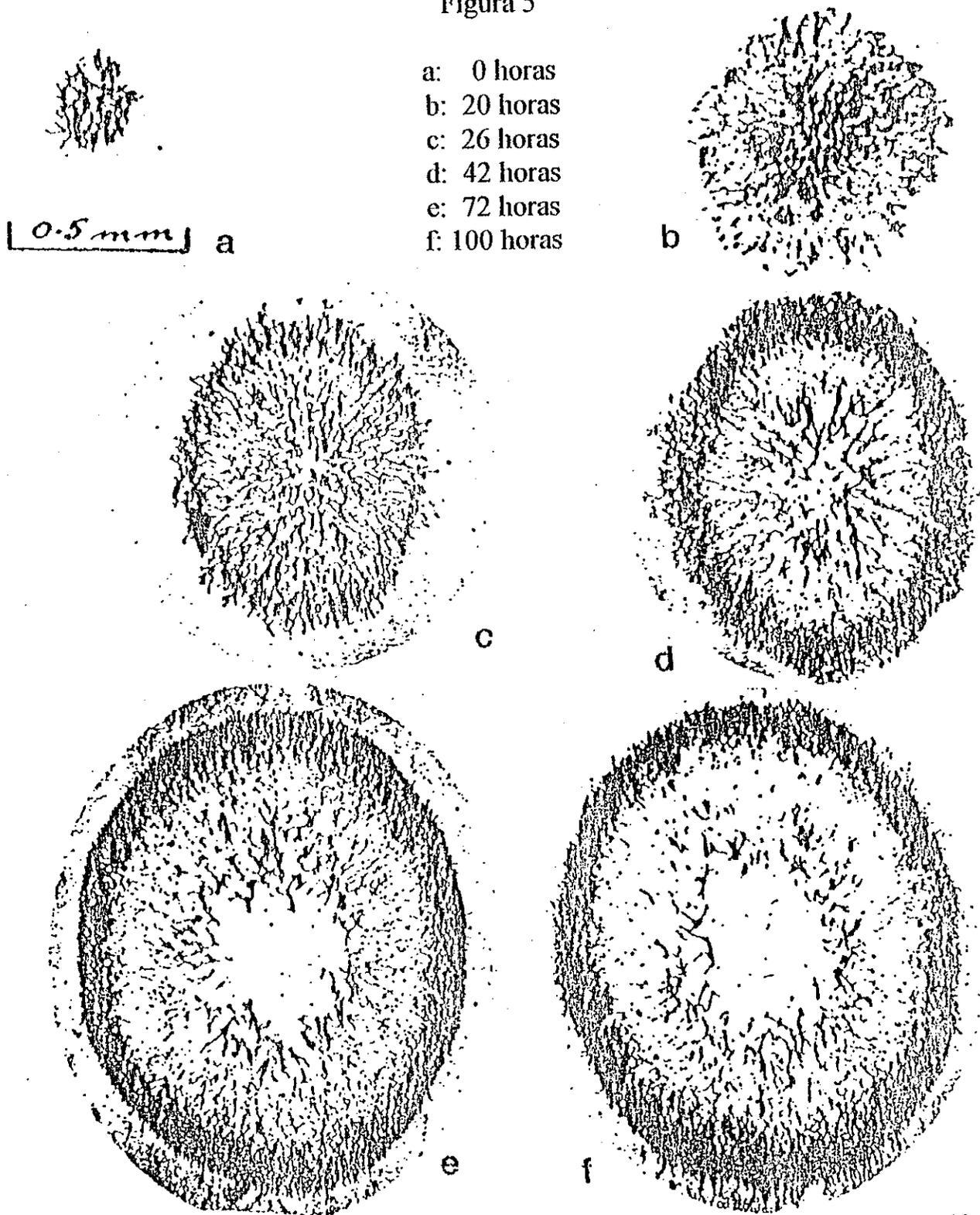
La figura 4 muestra modelos del comportamiento de levaduras inmovilizadas desde el inicio del cultivo hasta fermentación continua. (22)

Figura 4



La figura 5 muestra microfotografías de un corte de perla, mostrando los cambios en la morfología, según la edad de la fermentación. (36)

Figura 5



INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES DEL ALGINATO EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA FERMENTACIÓN

La técnica de inmovilización de células por atrapamiento en perlas de alginato, fué introducida por Hackel et. al. (27) en 1975 y, desde entonces, ha sido ampliamente descrita. En la mayoría de estudios llevados a cabo con este método, muy poca atención ha sido prestada a las propiedades del alginato y las concentraciones del gel. Incluso, las propiedades del alginato usado, no han sido reportadas. Como el mecanismo de gelificación depende de los bloques de ácido gulurónico, se debe saber la relación ácido gulurónico / ácido manurónico.

La propiedad principal que influirá en la fermentación será la viscosidad, ya que variará las características del transporte de masa. Esta viscosidad dependerá del peso molecular del alginato, la relación ácido gulurónico / ácido manurónico y la concentración del alginato usado. (33)

VENTAJAS DEL PROCESO CON LEVADURAS INMOVILIZADAS

1. La ventaja más obvia es la posibilidad de re-usar el microorganismo.
2. Permite mantener una población constante. Esta población puede ser alta, permitiendo tasas de dilución y flujos altos, reduciendo, así, el tiempo de fermentación; aún a tasas de dilución hidráulica que excedan la tasa específica de crecimiento máximo de los microorganismos.
3. En fermentaciones con levaduras libres, puede ocurrir que el inóculo sea lavado por el proceso continuo. Con los microorganismos inmovilizados, esto no ocurre.
4. La inmovilización también facilita el uso de poblaciones microbianas densas, alterando las propiedades reológicas del medio. Cuando los microorganismos están unidos a un soporte relativamente grande, la viscosidad del fluido es menor que la del fluido que contiene células libres suspendidas. Una viscosidad más baja contribuye a un mejor mezclado y mejores posibilidades de transferencia en el reactor.

5. Algunos autores suponen una acumulación de nutrientes en la interfase líquido - sólido del soporte, lo cual ayudaría a las células a tener alimento a su alcance y, por lo tanto, crecerían más rápidamente.
6. Otro mecanismo supone que es la inmovilización de masa, ya que la densidad de las levaduras libres suspendidas y la del medio, pueden ser bastante similares. Con esto, el diferencial de velocidad entre las células y el medio que las suspende, aún en un tanque de agitación perfecto, es relativamente pequeño. Esto redonda en tasas de difusión bajas. La matriz de soporte usada para inmovilización, generalmente, es más densa y, por lo tanto, el coeficiente difusional debido a la velocidad, será mayor. (33)

DESVENTAJAS DEL PROCESO CON LEVADURAS INMOVILIZADAS

La inmovilización de células no es una panacea, por lo que sus desventajas también deben ser consideradas.

1. Las células contienen un gran número de enzimas catalíticas. En algunos procesos, estas enzimas pueden catalizar productos indeseados.
2. La inmovilización también puede resultar en la pérdida de alguna actividad catalítica, ya sea durante la inmovilización o debido a barreras difusionales que limiten el acceso del substrato o la remoción de productos del microorganismo.
3. En flóculo y perlas, las capas interiores o internas de levaduras, sólo sirven como soporte para las capas superficiales y no participan en la reacción. (33)

REACTOR DE LEVADURAS INMOVILIZADAS

El reactor para la bioconversión de azúcar a etanol por levaduras inmovilizadas, es un sistema trifásico. La fase gaseosa, representada por el dióxido de carbono producido por la fermentación y actividades de mantenimiento de células de levaduras; la fase líquida es una solución de azúcares, oligosacáridos y etanol; y la fase sólida, es la representada por las levaduras y su soporte. La cantidad del volumen usado en la fase sólida depende, principalmente, del material de soporte utilizado y su geometría. (32)

EFFECTOS DEL ETANOL

Tolerancia al etanol

El etanol tiene tres efectos principales en la célula de levadura:

1. inhibe el crecimiento de la célula,
2. inhibe la viabilidad,
3. inhibe la fermentación.

En cada uno, el efecto es en diferente medida. Así, la definición "tolerancia al etanol", depende del parámetro al que se refiera.

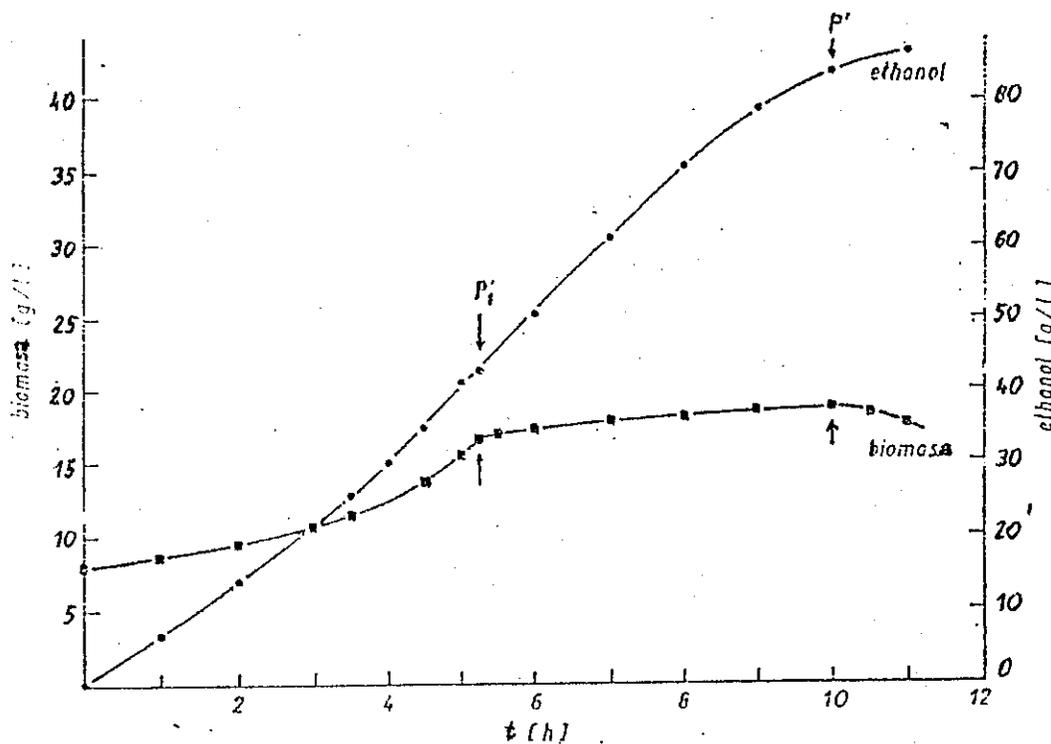
El mecanismo de la tolerancia al etanol no está muy claro. Esto puede ser por el mecanismo complejo de inhibición del etanol, la falta de una definición universal aceptada y el método para medir la tolerancia al etanol y su compleja característica poligénica. Recientes estudios muestran que los fosfolípidos de la membrana de plasma tienen un papel importante en la tolerancia al etanol. El aumento de ácidos grasos insaturados en la membrana, da como resultado, un aumento en la tolerancia de etanol. (17)

INHIBICIÓN POR ETANOL

En el punto P₁' de la gráfica, se puede interpretar que la concentración de etanol empieza a inhibir hasta que se tiene una concentración de 42.5 g/l de etanol, para la especie *Saccharomyces cerevisiae* utilizada. En el punto P', que corresponde a más de 84 g/l de etanol, la cantidad de biomasa empieza a decrecer significativamente. (45)

La figura 6 muestra el curso típico de una fermentación obtenida con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 6



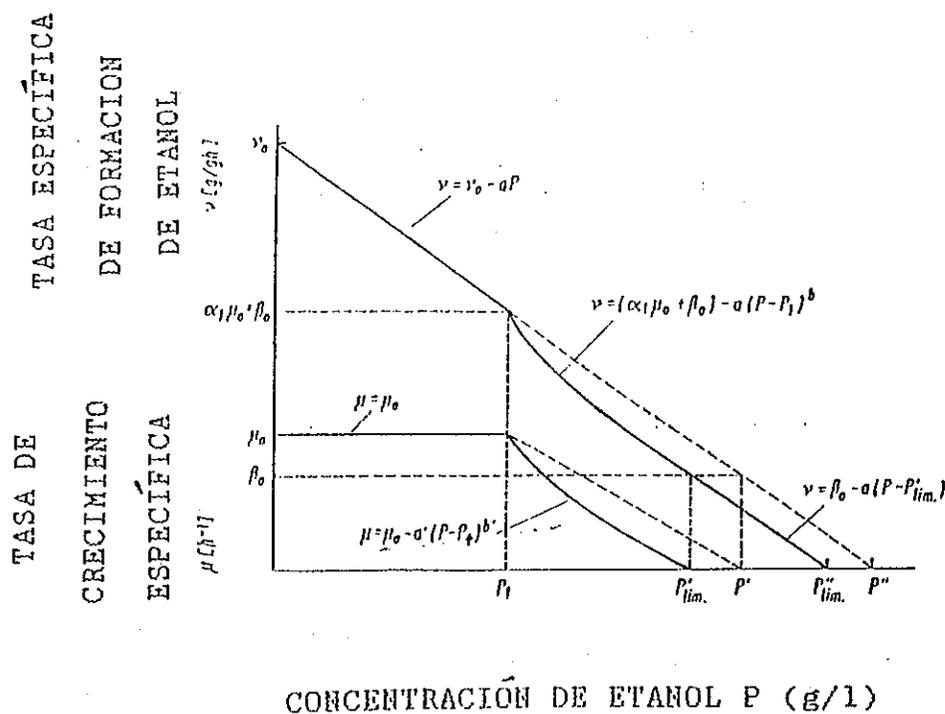
Un efecto inhibitorio en la célula atribuido al etanol, es que las desactiva; esto significa que las células crecen o, sea, que producen biomasa, pero, no son capaces de replicarse, por lo que la cantidad de microorganismos presentes, pronto decrece y las levaduras se vuelven no viables. (34)

El etanol formado durante la fermentación afecta a la célula, no sólo como un inhibidor, sino también, como un solvente. El proceso de extracción de ácidos grasos y las reacciones de intercambio pueden dar como consecuencia, la disminución del transporte de la masa a través de ella. En casos extremos, la membrana celular también es destruida. (46)

Al aumentar la concentración de etanol, la función de inhibición del crecimiento, que era lineal, se convierte en una ecuación no lineal para concentraciones de etanol superiores a la crítica P_1 , como se muestra a continuación. (47)

La figura 7 muestra el diagrama esquemático de la conversión original de inhibición por etanol, a una función no lineal.

Figura 7



El aumento en la concentración de etanol, dió como resultado una disminución en el crecimiento de la levadura y las actividades de fermentación. Además, Beaven (4) y Nagodawithana (40) dicen que el alcohol intracelular acumulado tiene efectos negativos muy grandes sobre el crecimiento y la fermentación de la *Saccharomyces cerevisiae*.

Nagodawithana y Steinkraus (40) reportan que cuando el etanol es agregado a los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, éste era menos tóxico para la levadura que el producido por ella misma. Van Uden (57) reporta que a bajas concentraciones, el etanol inhibe principalmente, el transporte de azúcares; mientras que en altas concentraciones, se inhibe mayormente, el transporte de amonio y aminoácidos. No solo el etanol causa inhibiciones de este tipo en las células; también lo hacen el isopropanol, propanol y butanol.

Además, Dasari (19) y D'Amore (18) reportan que la alta relación de alcohol intracelular a alcohol extracelular, es alta solo en los primeros estados de la fermentación. Se reporta que según las levaduras se van acostumbrando, mejoran su tolerancia al etanol, se obtiene una selección excelente de levaduras tolerantes al etanol durante las fermentaciones continuas.

INHIBICIÓN POR TEMPERATURA

La temperatura óptima para la fermentación alcohólica de levaduras es cerca de 30°C. En regiones tropicales y subtropicales la temperatura puede ascender hasta 40°C dando como resultado la desactivación de las levaduras y por lo tanto una fermentación ineficiente. Durante la fermentación, el contenido de alcohol se incrementa y, esto, más el incremento de temperatura, reduce la producción de etanol. En trabajos recientes, se encontró que la suplementación con ácidos grasos y aceites aumenta la tolerancia de las levaduras al alcohol y a la temperatura. (52)

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO

Frecuentemente, cuando se mide la tolerancia al etanol, se ignoran otros factores fisiológicos que pueden alterar la susceptibilidad de la célula al etanol, como nutrientes, concentración de substrato y pH. Casey et. al. (12) reportaron que el factor limitante de altos rendimientos de etanol en levaduras es, más por deficiencia nutricional que por toxicidad de etanol. Si se alcanzan los requerimientos nutricionales, hay una mejora en la fermentación y se puede esperar un aumento en la concentración final de etanol. Como prueba de esto, algunos grupos han reportado mejoras en la fermentación alcohólica y concentración final de etanol por suplementación con sustratos conteniendo aditivos, tales como: lípidos, proteínas y vitaminas. (17)

EFECTO DE OXÍGENO

Hay un fenómeno de las levaduras que consiste en que son capaces de dividir su metabolismo entre fermentación y respiración, es decir, entre su uso de oxígeno y compuestos orgánicos como receptor terminal de electrones. Pasteur describió el efecto de que la fermentación de la *Saccharomyces cerevisiae* disminuía con la presencia de oxígeno y, por esto, se le llamó "efecto Pasteur". (47)

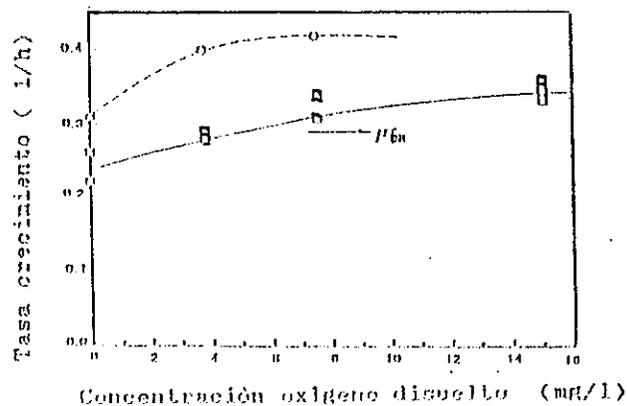
El efecto de trazas (0.5% de saturación) de oxígeno, aumenta la utilización del sustrato, ya que aumenta la tolerancia al etanol por la levadura, sin disminuir significativamente, el rendimiento de etanol por unidad de sustrato consumido. Esto, debido a que el oxígeno es utilizado por la levadura en su metabolismo. (7)

Así es que, la producción de etanol por las levaduras, se ve inhibida por la presencia de oxígeno, pero, una mínima cantidad (5-10 partes por millón) disuelta, es necesaria para mantener la viabilidad de las células. (10)

Las figuras 8, 9 y 10, muestran los distintos efectos del oxígeno sobre la tasa de crecimiento de las levaduras, consumo de sustrato y producción de etanol, respectivamente. (10)

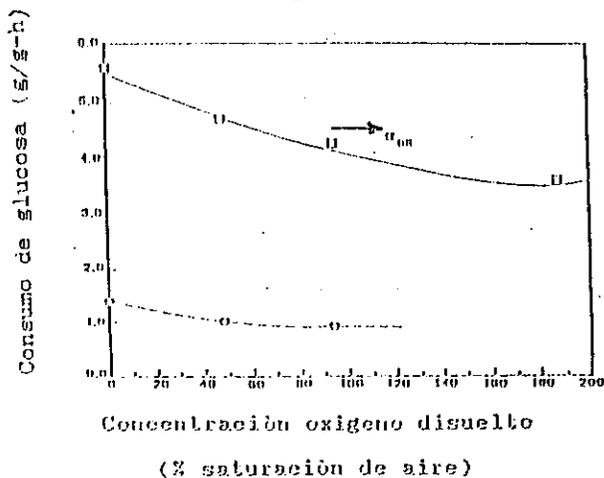
La figura 8 muestra el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae* (----) suspendidas é (—) inmovilizadas.

Figura 8



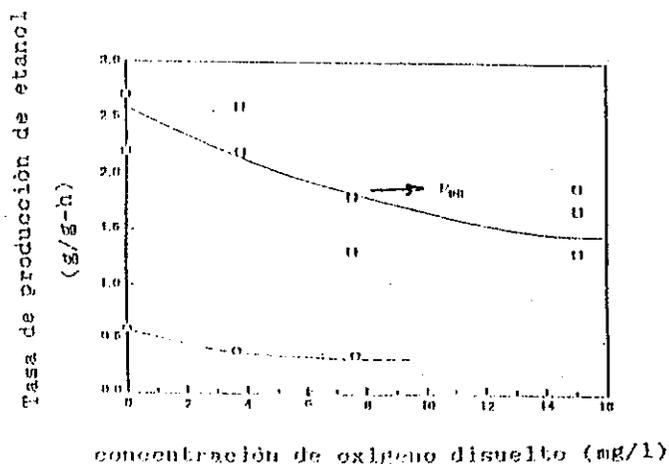
La figura 9 muestra el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la tasa de consumo de glucosa por *S. cerevisiae* (----) suspendidas é (—) inmovilizadas.

Figura 9



La figura 10 muestra el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la tasa de producción de etanol por *S. cerevisiae* (----) suspendidas é (—) inmovilizadas.

Figura 10



SUPLEMENTOS

Las levaduras dependen de una serie de sustancias auxiliares. Se sabe que las del género *Saccharomyces*, necesitan aminoácidos, vitaminas, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos insaturados, etc. para su crecimiento. En condiciones anaeróbicas, las células no son capaces de sintetizar estas sustancias de la membrana celular. Por eso, la ausencia de estas sustancias en el medio o la suplementación deficiente, tiene que repercutir en la baja del rendimiento metabólico de la levadura. (46)

NECESIDAD DE SUPLEMENTACIÓN

Richter experimentó en un fermentador con *Saccharomyces cerevisiae* a altas tasas de dilución. Encontró que, aparentemente, los microorganismos no podían usar su potencial de fermentación, si la concentración de etanol en el medio excedía el valor crítico de $P_1 = 42.0$ g/l. Posteriormente, determinó que la pérdida de actividad es función únicamente de la concentración de biomasa y de la tasa de dilución hidráulica. Es decir, que al aumentar la biomasa, la actividad específica disminuye. Esto no se atribuye a una limitación de sustrato o iones inorgánicos, sino que se asume a la deficiencia de factores esenciales para el crecimiento (vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos insaturados, etc.). Esta suposición se confirma por el hecho de que se obtuvo un aumento significativo de la actividad fermentativa específica de las células, después de adicionar dosis extra de extracto de levadura. (46)

Buscando mejorar el rendimiento de las fermentaciones, algunos investigadores probaron suplementar el medio de alimentación de las levaduras (58), así se determinó que al adicionar ergosterol (17) se aumenta la masa celular. La adición de ácidos grasos y aceites vegetales, aumenta la tasa de producción de etanol; también la leche descremada y el extracto de levadura, realzan la producción de etanol. Para acelerar la producción, se usaron carbohidratos, tales como quitina, xylan, pululan, celobiosa, dextrina, inulina, goma de acacia y agar. La adición de magnesio prolonga el crecimiento exponencial de la célula, dando como resultado el aumento de la masa celular y capacidad de fermentación. (10)

Esto resulta de que algunas enzimas glicolíticas involucradas en la fermentación alcohólica, tienen requerimientos de magnesio. (17) Viegas *et. al.* (58) demostró que la suplementación con 2 a 4% de harina de soya, aumenta la concentración de etanol debido a que la soya es una fuente abundante de proteínas (38%

mínimo) y lípidos (21%). Este aumento no es atribuido a un aumento en la tolerancia al etanol por la levadura, pero, sí a la corrección de las deficiencias nutricionales del medio. (13)

Saigal (52) reporta que el aumento en la producción de etanol se dá, debido a que hay un estímulo en el crecimiento de la población de levaduras.

Trabajos anteriores indican que los suplementos protegen las células de las levaduras contra inactivación térmica y aumentan la proporción de células vivas en la población a mayores temperaturas. Ácidos grasos suministrados externamente, son incorporados a la membrana de la levadura y, cuando su nivel es alto, la estabilidad de la levadura aumenta. El efecto protector de los ácidos grasos insaturados en la membrana de las levaduras, es más marcado a altas temperaturas. (52)

Casey *et. al.*, reportan que con el uso de 28% de sólidos en el medio de maltosa suplementado con extracto de levadura, ergosterol y ácido oléico, obtuvieron 15% (v/v) de etanol. Con este experimento quedaba demostrada la importancia de la suplementación nutricional y que la levadura de cerveza, sin necesidad de ninguna manipulación genética, tolera al menos, 15% (v/v) de etanol a una temperatura de 14°C. En condiciones nutricionales apropiadas y con una concentración de 28% de sólidos disueltos, se puede llevar a cabo una fermentación de una semana. Esto desmiente que las levaduras son de baja tolerancia al etanol. (11)

TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO

Monod en 1950 propuso la idea de cultivos continuos basado en dos suposiciones:

- Los microorganismos crecen en una forma exponencial con una tasa máxima de crecimiento específico μ_{max} , hasta que es limitado por alguna causa del ambiente, dando una tasa de específica de crecimiento μ .
- La tasa específica de crecimiento μ de cualquier cultivo microbiano, es proporcional a la concentración del sustrato limitante "S", pero, llega a un máximo de μ_{max} , cuando el sustrato ya no es limitante. (49)

La producción continua de etanol depende de la concentración de biomasa y de la tasa de dilución hidráulica. En general, la eficiencia de la producción específica de los microorganismos, decrece con el aumento de la concentración de la biomasa. En las células libres, este efecto puede ser explicado como una limitación en el factor de crecimiento. Esto es, tomando en cuenta que habrá una deficiencia de nutrientes en el medio. Entre más alta es la concentración de la biomasa en un medio deficiente, más crece el grado de limitación y más difiere la función inhibitoria de la linealidad. Es decir que la función normal de la tolerancia de etanol por las levaduras es una ecuación lineal. Es similar para células libres e inmovilizadas. (48)

DIFUSIVIDAD

Se sabe que las resistencias de difusión, pueden entorpecer el transporte de masa en los reactores de células inmovilizadas. Obstáculos a la difusión fueron encontrados en todo el reactor, en la superficie de las perlas y también en el interior de ellas. Considerando estos efectos, hay que tomar en cuenta la tasa reducida de fermentación para las células inmovilizadas y comparada con el potencial metabólico de las células libres cultivadas en condiciones análogas. (48)

A pesar de esto, el efecto contrario fué discutido también. Si no hay obstáculos en el transporte de masa y ocurre una estabilización adicional del proceso óptimo en la cercanía inmediata de las células, causada por el enriquecimiento de nutrientes en la perla, se puede esperar una producción de etanol mayor. (28)

Las células libres en un substrato, reciben nutrientes y dispersan productos y subproductos al medio directamente. Si están inmovilizadas en geles, el intercambio se vuelve más complicado, ya que ahora los nutrientes deben difundirse por el laberinto de pasajes creado por el polímero gelificado para alcanzar las células. (28) En qué extensión impide el gel esta migración? Qué tan poroso es el gel? Los geles de alginato comerciales tienen un poro de 6.8 a 16.6 nm y el coeficiente de difusión de algunos geles de alginato son mostrados en la tabla 1.

Tabla 1

	Conc. %	Difusor	T, °C	D x 10 ⁴ en gel	cm ² / min en agua
Alginato	2.27	Xylosa	30	3.84	-----
Alginato	4.57	Xylosa	30	3.84	-----
Alginato	2.8	Glucosa	35	4.63-2.98	5.4
Alginato	2	Glucosa	30	4.10	4.08
Alginato	2	Triptofano	30	4	4.02
Alginato	2	Lactalbúmina	30	0.61	0.61
Alginato	2	Globulina	30	0.12	0.27

Para moléculas pequeñas (cerca de 200 daltons) aparenta ser que la difusión hacia las células de alginato de hasta 4.5% de polisacárido, está totalmente desinhibido con respecto a la difusión relativa en agua.

Se comenta que el coeficiente de difusión en este tipo de geles es 30% menor que en soluciones acuosas y se ha reportado una reducción de 20 - 40% de difusividad. (28)

Tanaka (55) reportó que la albúmina no trasfunde hacia el interior de las perlas de alginato, pero sí hacia el exterior, lo cual es descrito por una modificación en la estructura de la célula debido a la estructura de las moléculas grandes.

Se reportan evidencias de que los problemas de difusividad son mayores para gases disueltos que para otras sustancias y afectan al sistema inmobilizado, porque aumentan la densidad de la perla. El transporte de oxígeno es el factor más importante en este caso.

Una forma de disminuir sustancialmente los problemas difusionales, es la fabricación de perlas no mayores de 1 mm de diámetro. Las más grandes pueden guardar subproductos tóxicos o inhibitorios en su interior. Además, las perlas pequeñas están menos propensas a romperse. (26) (29)

Richter en cambio, reporta que hizo un estudio comparativo entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* libres y las mismas levaduras inmobilizadas en alginato de calcio. Las levaduras libres son retenidas en el medio por el uso de

membranas en la salida. Los parámetros bajo los cuales fueron hechas las determinaciones son:

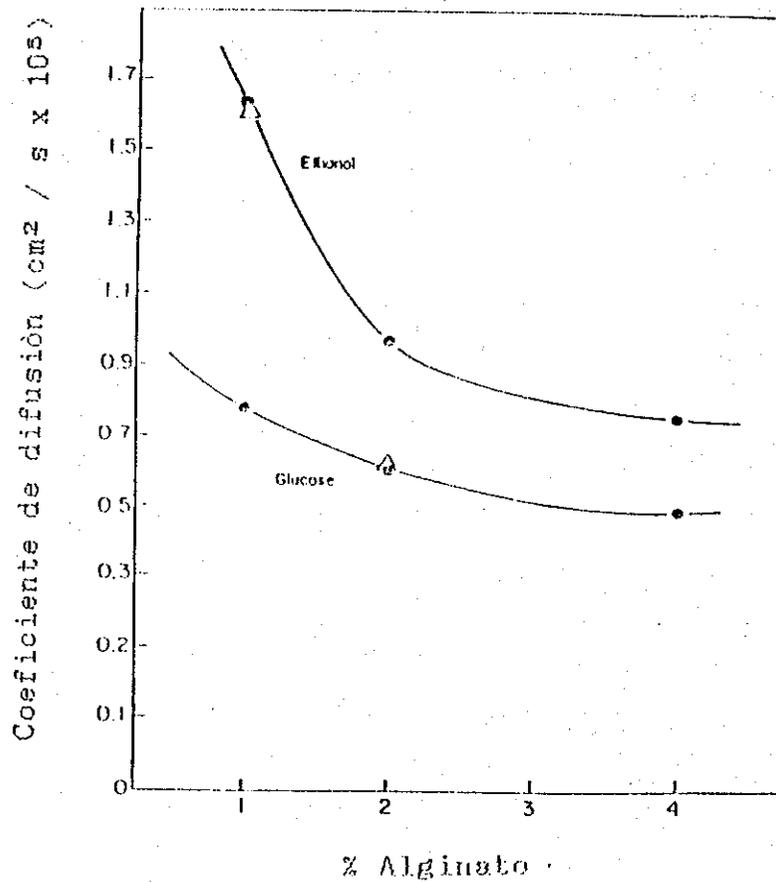
Temperatura	33°C
pH	4.5
Concentración de biomasa	71-74 g/l
Tasa de dilución (dependiendo del volumen de trabajo del reactor usado)	0.1-3.9 h ⁻¹
Concentración de etanol	20-70 g/l
Concentración de de biomasa en el gel	95-125 g/l
Concentración de gel en el medio	270-470 g/l

Se determinó que no hay restricciones difusionales ni disminución en el rendimiento debido a la matriz de alginato de calcio o, sea que, bajo condiciones análogas, los resultados de levaduras libres con sistemas de membrana en la salida y de levaduras inmovilizadas son idénticas. (48)

EFFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN DEL ALGINATO

En la figura 11 se muestran los efectos de la concentración de alginato de calcio en los coeficientes de difusión de glucosa y etanol. (24)

Figura 11



La figura 11 muestra el efecto de la concentración del alginato en los coeficientes de difusión de glucosa y etanol. (●) membranas sin células, (△) membrana con células.

FERMENTACIONES EN MEDIOS CONCENTRADOS

Se ha reportado el uso de levaduras capaces de crecer en medios, conteniendo 50% de sacarosa.

Bertolini reporta que a partir de soluciones conteniendo 30% de sacarosa, obtuvo una eficiencia de conversión de azúcares de 89-92%, con una producción de etanol de 15.6-19.7% (v/v) usando para esto levaduras escogidas como termotolerantes en una fermentación de 28 horas. (5)

EFFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN

A una menor tasa de dilución se produce más etanol y se consume más azúcar, pero, a una mayor tasa de dilución, la productividad es mayor aunque el consumo de azúcar y la producción de etanol son menores. Esto se muestra en la tabla 2. (19)

Tabla 2

Tasa de dilución, h^{-1}	Etanol, g/l		Productividad, g etanol/h		% consumo de azúcar	rendimiento etanol, ($\frac{g_{etanol}}{g_{azúcar}}$)
	1.etapa	2.etapa	1.etapa	2.etapa		
0.1	70.6	103.3	14.1	10.3	98.1	0.523
0.125	61.8	98.0	17.0	12.3	95.8	0.512
0.167	60.1	90.0	22.1	15.0	89.8	0.501
0.25	52.2	82.4	28.1	20.6	82.2	0.501

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIONES

1. El uso del método de inmovilización de levaduras para fermentaciones, reduce gastos de instalación y operación, además de que permite obtener productos en menos tiempo.
2. Los suplementos son reactivos relativamente baratos que aumentan el rendimiento de etanol, haciendo la industria fermentadora más rentable.
3. Mediante suplementación dentro de las perlas se logran mantener los suplementos en contacto continuo con los microorganismos.
4. La fermentación de sustratos concentrados implica menor volumen de operación y, al mismo tiempo, menor volumen descartado, disminuyendo así, el problema de contaminación del medio ambiente por residuos del proceso tradicional.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

3.1. Generales

1. Implementar el método para la formación de perlas de alginato de calcio conteniendo levaduras *Saccharomyces cerevisiae* viables.
2. Producir etanol en un proceso continuo por medio del uso de levaduras inmovilizadas.
3. Producir etanol a partir de soluciones concentradas de melaza (con 35-38% sólidos).
4. Comparar rendimientos de fermentaciones con levaduras inmovilizadas usando melaza con y sin clarificación; con y sin esterilización.

3.2 Específicos

1. Obtener un rendimiento mínimo de 12% (v/v) de etanol en un proceso continuo.
2. Determinar qué suplemento adicionado promueve una mejor fermentación del sustrato.
3. Determinar el máximo de etanol que puede ser producido por un proceso continuo con levaduras inmovilizadas, con y sin adición de suplementos.
4. Establecer el tiempo de vida útil de las levaduras en estado de inmovilización, por medio de fermentación continua por tiempo prolongado con y sin adición de suplementos.

CAPÍTULO 5

HIPÓTESIS

1. A menor tasa de dilución, mayor rendimiento de etanol.
2. Hay una mayor cantidad de células viables en el proceso continuo que en fermentación por tandas prolongado.
3. El uso de suplementos aumenta el rendimiento de etanol.
4. El uso de substratos concentrados de 35-38% de sólidos es factible para una producción de etanol rentable.
5. El rendimiento de producción de etanol y consumo de glucosa es mayor, usando células inmovilizadas que usando células libres suspendidas.
6. Con el uso de substratos concentrados y la adición de suplementos, se obtendrá un 12% (v/v) de etanol en proceso continuo.

CAPÍTULO 6

METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES

Universo de trabajo

Es constituido por la cepa del género *Saccharomyces cerevisiae* L-170, cepario del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), procedente de S. Burrows, The Distillers Company Limited, Yeast Food Division, Menstrie, Clackmannshire, Scotland.

Recursos humanos

El trabajo fué llevado a cabo por la bachiller Vera Vlasta Novotny Pribik, estudiante de la carrera de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con la asesoría de la MSC Sheryl de Cabrera, jefe del Laboratorio de Microbiología del ICAITI. Contando con la colaboración del cuerpo profesional y técnico de dicho Instituto.

Recursos materiales

Financiamiento: el presente trabajo fué financiado por la Agencia Internacional para el Desarrollo, AID, conjuntamente con el Programa de Ciencia de los Estados Unidos e Israel, a través del programa Cooperativo de Desarrollo e Investigación, CDR. Esta investigación es parte del proyecto: "Inhibición de Levaduras por el Substrato y Etanol en Substratos Concentrados", llevado a cabo con la colaboración del ICAITI. El costo aproximado del proyecto será de US\$2500.00.

Instalaciones

Laboratorio de Microbiología y biblioteca del ICAITI.

Equipo

Tanto el material como el equipo a utilizar en la investigación, serán proporcionados por el laboratorio de microbiología del ICAITI:

- Fermentador marca Applicon, equipado para operación y control como Quimiostato.
- Balanza Sartotius 3716 MP, con un ámbito de 120.00 a 1200.00 gramos
- Balanza Ohaus model E 120

- Balanza analítica
- Centrífuga, International Refrigerated Centrifuge. High velocity. Modelo IEC B-20 de 0 a 20,000 RPM y -30 a 30°C. International Equipment Co.
- Baño de María con temperatura ajustable. modelo 220. National Appliance Company
- Incubadora Thelco, Precision Scientific, modelo 4
- Incubadora con agitación, New Brunswick Scientific, US Patent No. 3,002895
- Bombas peristálticas Gallenkamp y Watson Marlow 502.S
- Horno de microondas Sharp Carrusel 11
- Autoclave Barnstead Sterilizer de 20 psi
- Autoclave Castle, eléctrica de 115 volt, 1 amp, 60 ciclos, 1 fase, tipo 1624
- Potenciómetro Corning pH-meter, modelo 10. Intervalo 0-14, temperatura 0-100°C, electrodo de combinación de calomel trizima con conector BNC standard
- Estufa con agitación magnética y calentamiento, Thermoline Subsidiary of Sybron, Type 1000, stir plate
- Magnetos
- Microscopio, Wild Herbrugg M-10 Suiza
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con detector de ionización de llama, fase carbowax 20 en columna de 2 metros de largo y 3 milímetros de diámetro interno
- Refrigerador
- Mecheros de Bunsen y Mecker
- Refractómetros de 0 a 50 °Brix y de 50 a 100 °Brix, Baush & Lomb
- Jeringas
- Mangueras esterilizables
- Asas bacteriológicas
- Pinzas
- Septas
- Bafles - frascos erlenmeyer de 250 ml provistos de tabiques internos
- Filtros de aire
- Parafilm* (papel parafinado elástico)
- Cristalería en general

Reactivos

- fenol
- sacarosa
- ácido sulfúrico concentrado
- hidróxido de sodio
- solución buffer pH 4
- alcohol
- gas nitrógeno

Suplementos

- xylan
- leche descremada
- extracto de levadura
- harina de soya
- ácido oléico
- quitina

MEDIOS

Medio de cultivo para preservación de levaduras agar YM (54)

- extracto de levadura 0.3%
- extracto de malta 0.3%
- peptona bacteriológica 0.5%
- glucosa 1.0%
- agar 2.0%
- agua destilada

Medio líquido para crecimiento de levaduras

Medio de Van Uden (3)

- extracto de levadura 0.5%
- peptona 1.0%
- glucosa 2.0%
- agua destilada

Soluciones de suplemento

- harina de soya 2.0%
- agua destilada

Todos los demás suplementos fueron adicionados an 0.2% en agua destilada.

Solución precipitante

- Cloruro de calcio 0.1M

Medio de cultivo como sustrato

Solución concentrada de melaza clarificada conteniendo de 35 a 38% de sólidos.

6.2. MÉTODOS

Esterilización

El equipo de fermentación y los medios de cultivo (excluyendo el medio de cultivo como sustrato) son esterilizados a 121°C por 15 min. (11) El sustrato se esteriliza por 20 min, a la misma temperatura. (22)

Preparación de agar YM

Se mezclan los reactivos y el agua en un erlenmeyer. Se calienta y se agita hasta que hierve y está totalmente disuelto. Se colocan 10 ml de esta solución en sendos tubos de vidrio con tapa de rosca. Se esterilizan. Se dejan enfriar en forma inclinada. (3)

Preparación de medio líquido para crecimiento de levaduras según van Uden

Se mezclan los reactivos y el agua en un erlenmeyer. Se agita hasta que está totalmente disuelto. Se colocan 100 ml de esta solución en erlenmeyers provistos de tabiques internos. Se cierran con tapones filtrantes de aire. Esterilizar. (3)

Preparación de alginato de sodio

Se mezclan el reactivo y el agua, sin disolverlo, en frascos con cierre de rosca. Al esterilizarse se disuelve.

Preparación de solución precipitante

Se mezcla el reactivo con el agua. Se coloca en frascos donde sólo se llena el 50% de la capacidad. Se provee de un agitador en el interior del frasco. La

tapadera debe tener una septa y un filtro de aire. Se refrigera después de haber sido esterilizado.

Preparación del sustrato

Se disuelve melaza en agua destilada en la proporción que dé como resultado final una solución conteniendo, de 36 a 38% de sólidos (35-38°Brix). Esta solución se clarifica: por medio de la adición de ácido sulfúrico concentrado se baja el pH de la solución hasta 2.8. Se calienta hasta ebullición. Se deja enfriar. Se centrifuga. El precipitado se descarta. El sobrenadante obtenido se ajusta a pH 4.3 por medio de la adición de hidróxido de sodio 10N. Se coloca la solución en frascos de alimentación provistos de manguera para salida de alimentación al fermentador y filtro de aire. (22)

Inóculo

En tubos de vidrio conteniendo agar YM, se deja crecer el microorganismo tomado del cepario asignado, incubado a 32°C por no más de 24 horas. Se agregan 2 ml de medio líquido para crecimiento de levaduras para suspender las levaduras que han crecido en los tubos y se traspasan a los respectivos erlenmeyer con tabiques, con el mismo medio. Se colocan en una incubadora.

Formación de perlas

El inóculo constituye la biomasa a utilizar. Esta es suspendida con 10 ml de solución de alginato de sodio en los tubos de centrifuga y vertido posteriormente en el frasco conteniendo el resto de alginato de sodio. Esta solución se recoge en una jeringa y de allí se deja gotear, a través de una membrana, hacia la solución refrigerada de cloruro de calcio, la cual está siendo agitada. Finalizado el goteo, se decanta la solución precipitante y por medio de un embudo se deja fluir al fermentador.

Todos los procedimientos se deben llevar a cabo en forma aséptica.

Adición de suplementos

Los suplementos, excluyendo la leche descremada, son mezclados con agua y esterilizados. Esta solución se adiciona a las levaduras del alginato de sodio, de manera que queda atrapada en la perla al igual que las levaduras. La leche descremada en polvo se esteriliza en el horno de microondas y, posteriormente, se solubiliza con agua destilada estéril.

Fermentación y toma de muestras

Se deja el fermentador en un baño de María con temperatura entre 28 y 32°C con 150 rpm de agitación, en condición anaeróbica. El pH deberá estar entre 4.3 y 4.7, mantenido así, por medio de una solución de NaOH 10N. Se coloca una toma de muestra a la manguera que lleva el medio ya utilizado al frasco de descartados. Tanto la entrada de la alimentación como la salida del medio, son reguladas por medio de bombas peristálticas. La muestra asépticamente obtenida, se sella con papel parafinado elástico (parafilm*). Se rotula y refrigera para su posterior análisis de azúcares y alcohol. (14)

Análisis de alcoholes

Se prepara una curva patrón inyectando consecutivamente patrones de etanol absoluto en porcentajes de 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% y 1.0%. Se inyecta un microlitro de muestra en el cromatógrafo de gases y se compara el resultado con la curva patrón. Si la muestra analizada presenta resultados fuera de la curva patrón, se realizan las diluciones que sean necesarias. (14)

Análisis de azúcares

Se hace por medio del método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico. Se colocan 2 ml de glucosa en un tubo de ensayo de 20 x 150 mm y 2 ml de agua destilada en otro tubo igual para que sirva de blanco. A cada tubo se le agrega 1 ml de fenol al 5%. Se agregan 2 ml de ácido sulfúrico concentrado con pipeta de boca ancha y se ponen en un vortex para que la mezcla se vuelva homogénea. Se colocan los tubos en un baño de María hirviendo por dos minutos para asegurar el color desarrollado. Se enfría la solución. Se lee en el espectrofotómetro a una longitud de 465 nm. Se comparan los resultados a los obtenidos por la curva patrón hecha con diluciones de sacarosa (50g/l, 100g/l, 200g/l, 300g/l y 400g/l). (6)

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

Como se especifica en la parte de metodología, el trabajo fué dividido en dos partes, fundamentalmente: 2.1.- inmovilización de levaduras,
2.2.- fermentación

2.1.- INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS

Las principales finalidades de la inmovilización fueron las de mantener una población constante de microorganismos en una fermentación y la de evitar que el inóculo sea lavado por el proceso continuo (wash-out). Para este propósito se escogió la inmovilización por retención física, la cual fué llevada a cabo por medio del confinamiento de levaduras en perlas de alginato de calcio.

Para determinar la concentración de alginato de sodio que debía ser usado, se hicieron perlas con diferentes concentraciones. Estas llevaban levaduras atrapadas y fueron usadas en fermentaciones por tanda durante 24 horas. Las perlas fabricadas con alginato de sodio al 2% w/w se rompían rápidamente o no forman perlas sino pequeños flóculos de alginato de calcio disperso. Aquellas conteniendo 2.5% w/w, fueron muy poco resistentes a la agitación en el fermentador y al cabo de algunas horas, se rompen dejando las levaduras dispersas en el sustrato. Para concentraciones de 3.5 y 4 % w/w no hubo fermentación perceptible, por lo que su uso se descartó. Las perlas con 3% w/w de alginato de sodio fueron suficientemente resistentes mecánicamente en el fermentador y, a la vez, permitieron la fermentación.

La adición de suplementos nutricionales se efectuó dentro de las perlas; es decir, que fueron atrapadas junto con las levaduras dentro de ellas, por considerar que de esta manera tendrían más posibilidad de interactuar.

Los suplementos que se pudieron usar con el sistema implementado fueron: leche descremada, extracto de levadura, harina de soya, xylan y ácido oléico. El uso de quitina no fué posible debido a que su presentación es en forma de escamas, algunas de las cuales son más grandes que las perlas de alginato elaboradas.

2.2.- FERMENTACIONES

La finalidad de la segunda etapa fué la de diseñar un sistema de fermentación continuo con una producción de 12% v/v de etanol. Para esto se efectuó una serie de fermentaciones cuyos resultados se detallan en las tablas 5 a 10. Los datos más importantes se muestran a continuación.

Condiciones de los procesos:

Temperatura, °C	28-32
pH	4.3-4.7
agitación, rpm	150
anaerobio	
Proporción sustrato:perlas	7:3 (v/v)

Tabla 3
Fermentación por tandas

Medio	Suplemento	Tiempo,h	Etanol,% v/v
Sin clarificar,estéril	Sin suplemento	24	0.00
Clarificado,sin esterilizar	Sin suplemento	21	6.87
Clarificado, estéril	Sin suplemento	18	8.50
Clarificado, estéril	Leche descremada	24	7.89
Clarificado, estéril	Extracto de levadura	18	7.96
Clarificado, estéril	Harina de soya	24	3.36
Clarificado, estéril	Xylan	24	3.70
Clarificado, estéril	Ácido oléico	24	6.93

Tabla 4
Fermentación continua, tasa de dilución $D = 0.1/h$

Medio	Suplemento	Tiempo,h	Etanol, % v/v
sin esterilizar	sin suplemento	53 -125	6.66 - 5.93
estéril	sin suplemento	49 - 135	7.22 - 3.78
estéril	leche descremada	57 - 121	5.45 - 2.73
estéril	extracto de levadura	48 - 121	2.26 - 1.65
estéril	harina de soya	48 - 120	6.21 - 3.10
estéril	xylan	48 - 114	5.76 - 2.11

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1.- La elaboración de perlas de alginato de calcio propuesta es efectiva, pero, lenta, por ser un proceso manual. Para pequeñas cantidades necesarias en experimentos de laboratorio, puede ser un método práctico, pero, a gran escala deberá diseñarse un proceso mecanizado basándose en el mismo principio que el proceso manual.

Al usar una mayor cantidad de alginato de sodio para preparar las perlas, la malla de las esferitas es más compacta. Esto hace, naturalmente, que el poro por el cual han de difundirse nutrientes y productos, sea más pequeño. Debido a que el sustrato usado en las fermentaciones fué melaza y en una concentración mayor a la reportada en anteriores experimentos, la cantidad de sólidos suspendidos en el medio es alta a pesar de haber sido previamente clarificada. Estos sólidos obstruyen los poros de las perlas si éstos son muy pequeños, evitando así el proceso deseado. Galazzo y Bailey (24) también reportan que, a menor concentración de alginato de sodio usado en la fabricación de las perlas, mayor es el coeficiente de difusión.

3.2.- En los resultados de la tabla 3 y tabla 4, se puede notar que el primer día de fermentación tiene un mayor porcentaje de etanol que en los días subsiguientes. Las primeras 24 horas fueron de fermentación por tanda, por lo que es natural que la producción allí sea alta. La fermentación a la cual le fué adicionada xylan como suplemento, es la única cuyo comportamiento varía de las demás, notándose que el porcentaje mayor de etanol se alcanzó después de un día de proceso continuo. Este comportamiento es el que según Barrientos (3) se debía esperar en todas las fermentaciones, ya que el crecimiento de las levaduras se ve propiciado debido a la entrada de medio fresco simultáneamente con la remoción del mosto del fermentador (dilución del etanol) la renovación de nutrientes y, a que limita la acumulación de compuestos tóxicos en el fermentador.

En las perlas, las capas interiores no participan en la reacción de fermentación, porque, no hay difusión de nutrientes hacia esta parte; pues son consumidos por las células que están en las capas más cercanas a la superficie. (31) (33) Lo anterior hace que la población de levaduras, a pesar de obtener condiciones del medio, favorables para su reproducción, vea limitado su espacio de crecimiento,

puesto que las capas a las que llega el substrato, se llenan rápidamente con células.

Aiba, et.al. (2) ya en 1,965 comprobaron que en las fermentaciones, la formación de producto no depende solamente de la concentración de la masa celular, sino que, también, guarda una relación lineal con la tasa de crecimiento de la masa celular. Este comportamiento es descrito por el siguiente modelo (23):

$$dP/dt = bX + a dX/dt$$

donde P es la concentración del producto
X es la concentración de la masa celular
t es el tiempo
a y b son constantes

Cuando la población óptima de levaduras es sobrepasada, la tasa de mortalidad celular aumenta, causando una disminución gradual en el ciclo de fermentación. (23) Al adicionar suplementos nutricionales a las perlas, se promueve la formación de masa celular.(10)(47) Esto puede llevar a consecuencias no deseadas; al alcanzar la población óptima, las células comienzan a morir. Estas células muertas permanecerán dentro de las perlas, debido a que el poro de la perla no permite la salida de las levaduras. Queda, entonces, ocupado el espacio necesario para el crecimiento de masa celular. Al terminar la vida útil de las levaduras, morirán y no habrá otras que continúen la fermentación. Aún cuando las levaduras encerradas todavía son viables, la producción decrece. Esto sucede porque el 80% del rendimiento, se debe a la masa celular presente y el 20%, al crecimiento de la misma. (23) Por falta de espacio, el crecimiento de la masa celular se ve suspendido. Como la concentración del producto es directamente proporcional a la tasa de crecimiento de la masa celular, si esta última disminuye, la concentración del producto, lo hace también.

Si las perlas no son suplementadas, ocurre lo mismo. La diferencia es que el ciclo es más largo. En la tabla 4, se puede apreciar este comportamiento. Las dos fermentaciones sin adición de nutrientes, tienen un decrecimiento más lento.

En la tabla 4 se nota que, según pasa el tiempo, el porcentaje de etanol producido, disminuye en todas las fermentaciones. Hay que notar, sin embargo, que la disminución en la producción de etanol de la fermentación que se llevó a cabo sin esterilizar el medio y sin adicionar suplementos, fué mucho menor que el resto de las fermentaciones. El medio contenía células salvajes que poseen enzimas catalíticas, pero, que no necesariamente producen etanol. En algunos

procesos, estas enzimas pueden catalizar productos deseados y en otros, productos no deseados. (28) La esterilización puede desactivar estas células salvajes, sus enzimas o algunas de ellas. Si el medio no ha sido esterilizado, seguramente están presentes en el proceso, mejorando así el nivel de etanol de la fermentación que se llevó a cabo sin esterilizar el medio. Si bien esta no fue la mejor fermentación llevada a cabo, si fue la más estable.

Teóricamente, la fermentación debe tender al equilibrio después de cerca de cuatro cambios de volumen en el fermentador (aproximadamente 72 horas) y los parámetros deberían quedar más o menos constantes. Estudios indican que existe cierta fluctuación en el llamado estado estable de las fermentaciones. (8) En el presente trabajo, dicho estado estable, no se alcanzó. Algunos autores suponen una acumulación de nutrientes en la interfase, líquido - sólido del soporte. (33) En este caso, la acumulación de nutrientes en esta posición, puede haber limitado la difusión a través de los poros de la perla, limitando el acceso del sustrato y/o la remoción de productos del microorganismo. Algunos de estos productos pueden ser tóxicos para las levaduras, si se acumulan. Esto lleva a una disminución de la población que, en lugar de tender al equilibrio, se va eliminando hasta acabar totalmente con el proceso.

Es interesante notar que, la fermentación con medio estéril y sin adición de suplementos, fue la que mostró una mayor producción de etanol, tanto en la fermentación por tandas, como a los dos días de fermentación continua; aunque igualmente decreció su producción con el tiempo. Dombek e Ingram (20) proponen que la disminución de la actividad de las levaduras durante la fermentación, no se debe a la presencia de alcohol en el medio. La limitación de nutrientes es en la mayoría de los casos el factor responsable de esta disminución de actividad. Para quitar esta limitante se adicionaron suplementos nutricionales, pero se obtuvieron las consecuencias anteriormente discutidas por crecimiento acelerado de masa celular. Aún cuando la adición de los suplementos hubiera mostrado una mejora en la producción de etanol, esta no podría ser sostenida debido a que la suplementación se efectuó dentro de las perlas. De esta manera las levaduras tienen acceso a los nutrientes proporcionados por el suplemento, solamente por un tiempo limitado. Al terminarse la cantidad inicial, las levaduras han de nutrirse únicamente con la solución de melaza que no fue suplementada.

La fermentación con melaza no clarificada como sustrato, no tuvo producción alguna de etanol. Esto fue debido seguramente, a que los poros de las perlas

fueron obstruidos por las partículas sólidas suspendidas contenidas en la melaza. En los análisis de melaza presentados en el anexo, se puede ver que la composición de la melaza es muy variada. Altos contenidos de cenizas, ceras, proteínas y otros componentes, pueden causar el taponamiento de los poros de las perlas. Al no haber contacto de las levaduras con el medio, no hay fermentación.

CONCLUSIONES

1. El método implementado para la inmovilización de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio, es práctico para experimentos de laboratorio.
2. El uso de perlas de alginato de calcio conteniendo atrapadas levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, en fermentación de soluciones concentradas de melaza para producción de etanol, todavía requiere de más experimentación.
3. La melaza contiene muchas partículas sólidas que pueden obstruir los poros de las perlas de alginato de calcio, imposibilitando el contacto entre microorganismos y nutrientes. Entre más concentrada está la solución de melaza, hay más posibilidad de obstrucción y menos posibilidad de difusión desde y hacia las perlas.
4. Es indispensable la clarificación de la melaza para ser utilizada como sustrato en fermentaciones con levaduras atrapadas en perlas de alginato de calcio; la eliminación por precipitación y centrifugación de muchos sólidos insolubles, ceras, grasas y partículas coloidales, sólo permite una difusión limitada a través de la pared de la perla.
5. La suplementación en el interior de las perlas con los compuestos usados, no mejora la eficiencia en la producción de etanol y promueve un crecimiento de masa celular acelerado, según la literatura citada. Esto lleva a un decrecimiento más rápido de la fermentación, ya que por falta de espacio, la tasa de crecimiento celular tiende a cero.
6. La melaza como sustrato en fermentaciones con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en alginato de calcio, no tiene que ser esterilizada. El proceso de clarificación funciona como pasteurización del medio.
7. Para que haya una mayor área de contacto, se deben hacer perlas del menor tamaño que el sistema permita.
8. El sistema de inmovilización desarrollado no parece tener aplicación, como tal, en fermentaciones industriales.

RECOMENDACIONES

1. La inmovilización puede tener varias ventajas, pero, se recomienda no usar el método de la inmovilización para microorganismos del tipo de las levaduras. Este método puede ser muy efectivo utilizado con catalizadores, como por ejemplo enzimas ya que su efectividad está dada por su sola presencia; aquí la formación de producto no depende del crecimiento de una masa celular, ya que no se da. Aún con el uso de enzimas, no debe eliminarse la clarificación, ya que el factor limitante en el rendimiento, sería la difusión.
2. Ya que el área de contacto entre el interior de las perlas y el medio de cultivo, se ve afectado por el tamaño de las perlas, se propone diseñar un sistema por medio del cual se obtengan perlas de menor diámetro, de preferencia mecanizado y que pueda ser redimensionado para su uso en la industria.
3. En el presente trabajo no se logró el rendimiento deseado. Para tratar de alcanzarlo se propone llevar a cabo fermentaciones en las cuales las levaduras sean retenidas por otro tipo de inmovilización. Estos podrían ser floculación, enlaces covalentes o unión externa a portadores. Se propone trabajar con un fermentador tipo torre empacada, en la cual las levaduras retenidas no se mueven, sino solamente el medio que estará circulando a través de ellas. Esto permitirá usar soportes más frágiles (menos compactos) sin que se rompan, debido a la agitación.

REFERENCIAS

1. ABBOT, B.J., Immobilized cells, Annual Reports on Fermentation Processes, Vol.1, 1977, 205-233
2. AIBA, SH., Humphrey, A.E., Millis, N., Biochemical Engineering, Kinetics, Academic Press, New York, 1965, 101-104
3. BARRIENTOS, L.F., Tesis: Efecto de la adición de ácidos grasos y otros suplementos en la tolerancia al etanol de *Saccharomyces cerevisiae*, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1992, 45
4. BEAVEN, M.J., Charpentier, C., Rose, A.J., Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty acryl composition in *Saccharomyces cerevisiae*, NCYC 431, Journal of General Microbiology 128, 1982, 1447-1655
5. BERTOLINI, M.L., Hernandez, J.E., Laluce, C., New yeast stains for alcoholic fermentation at higher sugar concentrations, Biotechnology Letters, Vol.13, No.3, Marzo 1991, 197-202
6. BECKER, A.I., Tesis: Efecto del etanol, pH y temperatura en la producción de dextran a partir de microorganismos contaminantes de la industria azucarera, Universidad Rafael Landivar de Guatemala, 1989, 30-33
7. BLAKEBROUGH, N., Industrial fermentations, Biological Engineering Science, Londres, Academic Press, Vol.1, 1967, 25-46
8. BORZANI, W. et.al., The experimental characterisation of a steady state in a continuous fermentation test, Biotechnology and Bioengineering, Vol.13, No.6, 1976, 54-57
9. CABRERA, S.de, Arriola, M.C. de, Rolz, C., Effect of sugar-cane chip pretreatments on their conversion to ethanol using the ex-ferm process: particle size, storage, drying or ensilage, Enzyme and Microbial Tecnology, Vol.8, No.1, 1991, 24-27

10. CACHOT, T., Pons, M-N., Improvement of alcoholic fermentation on cane and beet molasses by supplementation, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.71, No.1, 1991, 24-27
11. CASEY, G.P., Magnus, C.A., Ingeldew, W.M., High-gravity brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production, Applied and Environmental Microbiology, Vol.48, No.3, 1984, 639-646
12. CASEY, G.P., Ingeldew, W.M., Continuous ethanol production by yeast at high sugar concentrations, Journal American Society Brew. Chemistry, Vol.41, 1983, 148-152
13. CHING, C.B., Teo, W.K., Chu, K.H., Performance analysis of an immobilized yeast packed-bed reactor for ethanol fermentation, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol.47, No.4, 1990, 345-356
14. CORDERO, E.A., Tesis: Cinética de la fermentación alcohólica de jugo de caña por la cepa *Saccharomyces cerevisiae* L-180 a dos temperaturas, Universidad Rafael Landívar de Guatemala, 1985, 26-28
15. D'AMORE, T., Panchal, Ch.J., Russell, I., Stewart, G.G., A study of ethanol tolerance in yeast, Critical Reviews in Biotechnology, Vol 9, No.4, 1990, 287-304
16. D'AMORE, T., Russell, I., Stewart, G.G., Sugar utilization by yeast during fermentation, Journal of Industrial Microbiology, Vol.4, 1989, 315-324
17. D'AMORE, T., Stewart, G.G., Ethanol tolerance of yeast, Enzyme and Microbial Technology, Vol.9, No.6, 1987, 322-330
18. D'AMORE, T., Panchal, C.J., Stewart, G.G., Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation, Applied and Environmental Microbiology, No.54, 1988, 110-114
19. DASARI, G., Roddick, F., Connor, M.A., Pamment, N.B., Factors affecting the estimation of intracellular ethanol concentration, Biotechnology Letters, No.5, 1983, 715-720

20. DOMBECK, K.M., Ingram, L.O., Nutrient limitation as a basis for the apparent toxicity of low levels of ethanol during fermentation, Journal of Industrial Microbiology, Vol.1, 1986, 219-225
21. ENFORS, S.O., Hedenberg, J., Olson, K., Simulation of dynamic in the Baker's yeast process, Bioprocess Engineering, Vol.5, No.5, 1990, 191-198
22. ESPINOZA, R., Disertation: The alcoholic fermentation of molasses - practical aspects, Century University, California, 1984
23. ESPINOZA, R., Cojulún, V., Marroquín, F., Alternatives for energy savings at plant level for the production of alcohol for use as automotive fuel, Biotechnology in Energy Production and Conservation, Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 8, Tennessee, USA, Mayo 1978, 69-74
24. GALAZZO, J.L., Bailey, J.E., Fermentation pathway kinetics and metabolics flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, Enzyme and Microbial Technology, Vol.12, No.3, 1990, 162-172
25. GILL, G.H., Jones, W.J., Tornabene, T.G., Continuous ethanol production in a two-stage immobilized/suspended cell bioreactor, Enzyme and Microbial Technology, Vol.13, No.5, 1991, 390-399
26. GUISELEY, K.B., Chemical and physical properties of algal polisaccharides used for cell immobilization, Enzyme and Microbial Technology, Vol.11, No.11, 1989, 706-716
27. HACKEL, U., Klein, J., Magnet, R., Wagner, F., Immobilization technique, European Journal of Applied Microbiology Biotechnology, No.1, 1975, 191-293
28. HANNOUN, B.J., Stephanopoulous, G., Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes, Biotechnology and Bioengineering, Vol.28, No.6, 1986, 829-835
29. HANNOUN, B.J., Stephanopoulous, G., Intrinsic growth and fermentation rates of alginate entrapped *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Progress, Vol.6, No.5, 1990, 341-348

30. HOPPE, G.H., Hansford, G.S., The effect of micro-aerobic conditions of continuous ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, Vol.6, No.10, 1984, 681-686
31. JIN, C.K., Wang, S.S., Continuous production of ethanol in a two-stage fermentation process using a protein-phospholipid complex as a protective agent, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.4, 1982, 256-264
32. JINESCU, G., Lavaric, V., Bragarla, S.T., Podescu, M., Mathematical modeling of immobilized living yeast cell reactor for sugar biocconversion to ethanol, *Acta Biotechnologica*, Vol.9, No.4, 1989, 325-332
33. JOHANSEN, A., Flink, J.M., Influence of alginate properties and gel reinforcement on fermentation characteristics of immobilized yeast cells, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.8, No.12, 1986, 737-748
34. JONES, R., Roles of replicative deactivation in yeast-ethanol fermentations, *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol.10, No.3, 1990, 205-222
35. KIDA, K., Asano, Sh., Yamabaki, M., Iwasaki, K., Yamaguchi, T., Sonoda, T., Continuous high-ethanol fermentation from cane molasses by a flocculating yeast, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol.69, No.1, 1990, 35-45
36. LUYBEN, K., Comunicación personal, mayo 1991
37. MELGAR, D., Tesis: Aplicación de las curvas de acidificación extracelular para la evaluación de la tolerancia al etanol de 107 cepas de levadura, *Universidad de San Carlos de Guatemala*, 1990, 24-25
38. MOULIN, G., Boze, H., Galazy, P., Inhibition of alcoholic fermentation, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, Vol.2, 1984, 365-382
39. NAGASHIMA, M., Azuma, M., Noguchi, S., Inzuka, K., Samejama, H., Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.26, No.4, 1983, 992-997

40. NAGODAWITHANA, T.W., Steinkraus, K.H., Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation", Applied and Environmental Microbiology, Vol.31, 1976, 158-162
41. OKOLO, B.N., Johnston, J.R., Berry, D.R., Kinetics of alcohol tolerance of distilling yeast, Enzyme and Microbial Technology, Vol.12, No.10, 1990, 783-787
42. PAREKH, S.R., Wayman, M., Performance of a novel continuous dynamic immobilized yeast cell bioreactor in ethanolic fermentation, Enzyme and Microbial Technology, Vol.9, No.7, 406-410
43. PASTEUR, L., Memories sur la fermentation acetique, Paris 1968
44. PATIL, S.G., Patil, B.G., Chitin supplement speeds up the ethanol production in cane molasses fermentations, Enzyme and Microbial Technology, Vol.11, No.1, 1989, 38-43
45. RICHTER, K., Inhibitory effects of ethanol in alcoholic fermentation, Acta Biotecnológica, Vol.6, No.3, 1986, 239-243
46. RICHTER, K., Reduced specific ethanol-forming performance of yeast at high biomass concentrations as a result of a change ethanol-tolerance behavior of the cells under condition of limitation. 1.Theoretical treatment, Acta Biotecnológica, Vol.9, No.1, 1989, 17-24
47. RICHTER, K., Becker, U., Meyer, D., A reduced specific ethanol-forming performance of yeast at high biomass concentration as a result of a change ethanol-tolerance behavior cells on condition of limitation. 2.Proving the effect of high-flow rate fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, Acta Biotecnológica, Vol.9, No.1, 1989, 25-34
48. RICHTER, K., Ruhlemann, I., Becker, U., Berger, R., A comparison between the fermentation activities of free and Ca-alginate entrapped cells of *Saccharomyces cerevisiae*, Acta Biotecnológica, Vol.9, No.2, 1989, 123-129

49. ROKEM, S., A continuous culture technique, Primary metabolites, International Course: Bioengineering of Biological Reactions and Processes, ICAITI, Guatemala, Lecture 23, May 1991
50. ROKEM, S., Product formation in continuous culture. Primary metabolites, International Course: Bioengineering of Biological Reactions and Processes, ICAITI, Guatemala, Lecture 29, May 1991
51. RUHLEMANN, I., Richter, K., Berger, R., Ethanolic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in pectate gel, Acta Biotecnológica, Vol.10, No.1, 1990, 55-61
52. SAIGAL, D., Viswanthan, L., Effects of oils and fatty acids on molasses Fermentation by distiller's yeast, Enzyme and Microbial Technology, Vol.6, No.2, 1984, 78-80
53. SHINDO, S., Kamimura, M., Immobilization of yeast with hollow PVA-gel beads, Vol.70, No.4, 1990, 232-234
54. SPECK, M., Compendium of methods for the microbiological examination of foods, USA, 1976, 52-59
55. TANAKA, H., Irie, S., Diffusion coefficients on calcium alginate membranes, Biotechnology Technics, No.2, 1988, 115-120
56. van UDEN, N., Effects of alcohol on membrane transport in yeast (alcohol toxicity in yeast and bacteria), CRC Press, USA, 5, 1989, 135-141
57. van Uden, N., Toxicity of ethanol and other alkanols for yeasts: underlying mechanisms, Memorias del Tercer Simposio Panamericano de Combustibles y Productos Químicos via Fermentación: "Avances en la Producción de Etanol", ICAITI, Guatemala, 1984, 153 - 169
58. VIEGAS, C., Correia, I., Novais, J.M., Rapid production of high concentration of ethanol by *Saccharomyces bayanus*: Mechanism of action of soy flour supplementation, Biotechnology Letters, Vol.7, No.7, 1985, 515-520

ANEXO 1

MELAZA

La melaza es el efluente final obtenido en la preparación de azúcar por cristalizaciones repetidas. Es el jarabe residual del cual ya no es cristizable azúcar por los métodos convencionales.

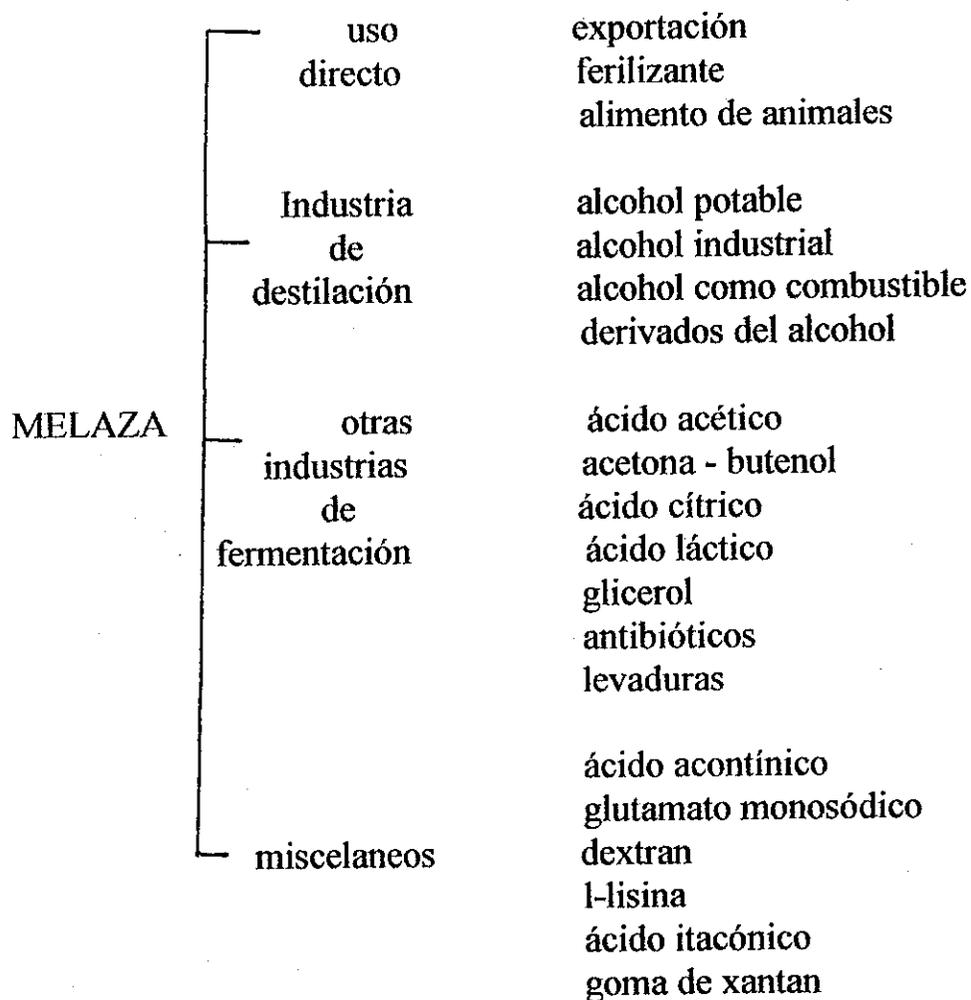
La palabra proviene del latín "mel", que significa miel, y la posible evolución por el español: melaza, que quiere decir, sustancia similar a la miel cruda.

Generalmente, es descrita como; no comestible, porque en algunos países no es usada para consumo humano a pesar de que puede ser comida sin riesgo alguno.

Debido a que la melaza es rica en azúcares, es usada de materia prima como nutriente de microorganismos para producir biomasa de ellos mismos o compuestos orgánicos como subproducto de funciones. Tal es el caso del etanol, ácido acético, butanol, ácido cítrico, ácido glutámico, etc.

En la Figura 12, se muestran los usos de la melaza:

Figura 12



La melaza no es solamente obtenida de la caña de azúcar, sino también de la remolacha azucarera y de cítricos.

COMPOSICIÓN Y ANÁLISIS

Las melazas contienen la porción más grande de sólidos del jugo del cual derivan, por eso la composición varía, de acuerdo a la variedad de caña y su madurez, condiciones de suelo, clima, forma de cosechar y proceso de clarificación, junto con otros factores menores. Un análisis general no puede ser formulado, pero, sí una aproximación.

El intervalo aproximado de las melazas al salir de las centrífugas está entre los 85 y 92 °Brix, lo cual representa de 77 a 84 % de sólidos al secarla. Caña inmadura, como es encontrada en países subtropicales rinde melazas con menos sacarosa y más azúcares reductores, que otras de países tropicales completamente maduras. (22)

La figura 13 muestra los intervalos y promedios de los constituyentes usuales de la melaza de caña de azúcar. (22)

Figura 13

Componente	% en peso	
	Intervalo	Promedio
Agua	17 - 25	21
Azúcares		
sacarosa	30 - 40	35
glucosa	4 - 9	7
fructosa	5 - 12	8
Otras sustancias reductoras	1 - 4	3
Otros carbohidratos	2 - 5	4
gomas, xylosa		0.72
arabinosa, almidón y l-inositol		0.20
d-manitol		0.50
ácido urónico		1.80
metoxil		0.60
Ceniza	7 - 15	12
K ₂ O		4.8
CaO		1.2
MgO		0.98
Na ₂ O		0.10
Fe ₂ O ₃ /Al ₂		0.12
SO ₃		1.8
Cl		1.8
P ₂ O ₅		0.6
SiO ₂ e insolubles		0.6
Ácidos sin nitrógeno	2 - 8	5
acotínico		3.0
cítrico, mesacónico, succínico		
málico		2.0
Compuestos nitrogenados		
proteína cruda	0.3 - 0.5	0.5
alanina		0.02
aminobutírico		0.007
ácido aspártico		0.12
ácido glutámico		0.01
glisina		0.006
leusina		0.004
lisina		0.006
scrina		0.06
treonina		0.05
valina		0.015
Ácidos nucleicos		
guanina, hipoxantina, 5-metilcistocina, xantina		
Vitaminas		
biotina (H)		1 - 3
colina (B ₄)		880
ácido fólico (complejo B)		0.3 - 0.4
niacina (complejo B)		17 - 30
ácido pantoténico (complejo B)		20 - 60
riboflavina (B ₂)		2 - 3
piridoxina (B ₆)		1 - 7
tiamina (B ₁)		0.6 - 1.0
Ceras y esteroides (l-triacontanol, fitoesteroides)		
Pigmentos (clorofila, taninos, antocianinas)		

ANEXO 2

TABLAS DE RESULTADOS

Para todas las fermentaciones: V, ml 1200
 Flujo continuo D, h⁻¹ 0.1
 anaeróbico / clarificado

Tabla 5
 sin esterilizar / sin suplemento

Tiempo, h	pH	T, °C	Etanol, % v/v	Azúcar, g/ml
0	4.34	29.5	0	222.6
21	4.24	30.4	6.87	67.7 <small>por lote</small>
53	4.21	30.5	6.66	87.9 <small>continuo</small>
77	3.94	30.4	5.21	123.3
101	3.87	30.7	4.91	182.3
125	3.87	31.0	5.93	152.4

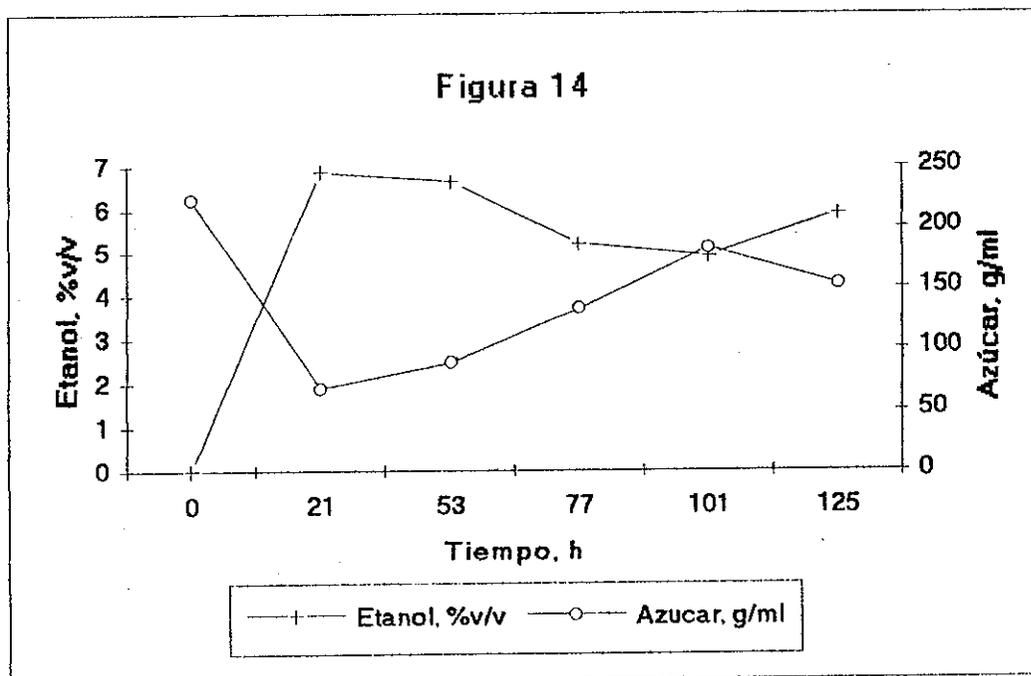


Tabla 6
estéril / sin suplemento

Tiempo,h	pH	T,°C	Etanol, % v/v	Azúcar,g/ml
0	4.54	31.3	0	250.1
18	4.50	32.1	8.54	95.9 <small>por lote</small>
49	4.60	32.1	7.22	108.8 <small>continuo</small>
73	4.62	31.8	5.90	150.3
93	4.62	31.6	6.07	198.4
114	4.63	30.9	3.79	229.7
135	4.63	30.8	3.78	242.1

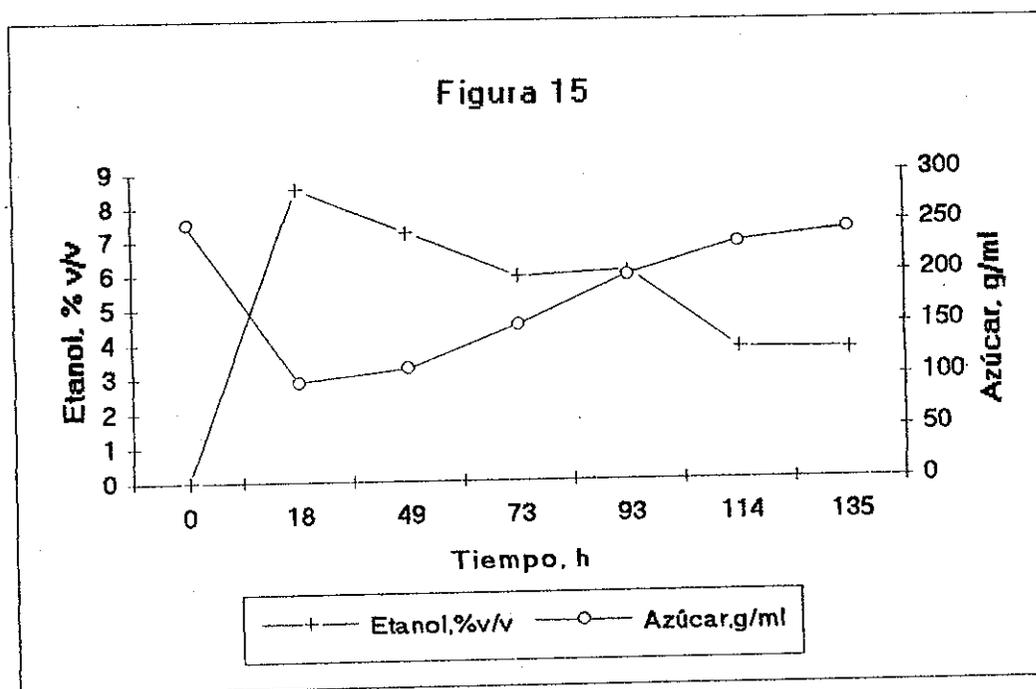


Tabla 7
estéril / suplemento: leche descremada

Tiempo,h	pH	T,°C	Etanol, % v/v	Azúcar,g/ml
0	4.70	28.3	0	240.1
24	4.61	32.0	7.89	51.9 _{por lote}
57	4.63	29.8	5.40	129.8 _{continuo}
80	4.64	31.1	4.85	141.1
101	4.65	31.7	2.86	181.3
121	4.66	31.4	2.73	200.8

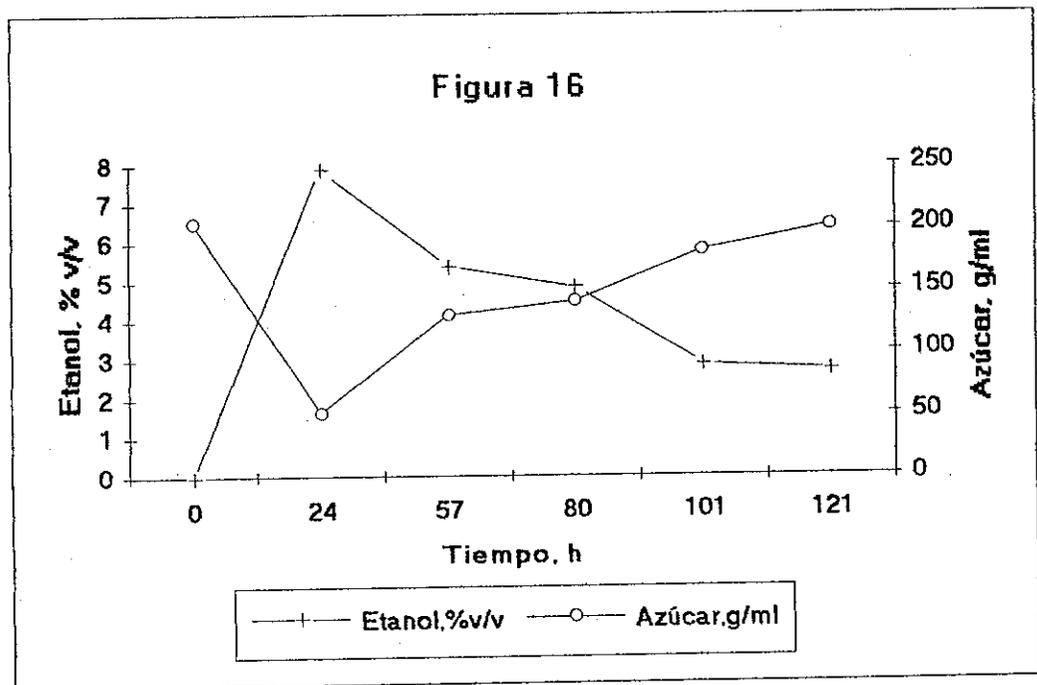


Tabla 8
estéril / suplemento: extracto de levadura

Tiempo,h	pH	T,°C	Etanol, % v/v	Azúcar,g/ml
0	4.33	30.9	0	240.1
18	4.43	31.4	7.96	51.9 <small>por lote</small>
48	4.44	31.4	2.26	152.1 <small>continuo</small>
72	4.51	31.5	2.21	175.2
98	4.53	32.0	1.79	195.7
121	4.51	31.5	1.65	204.8

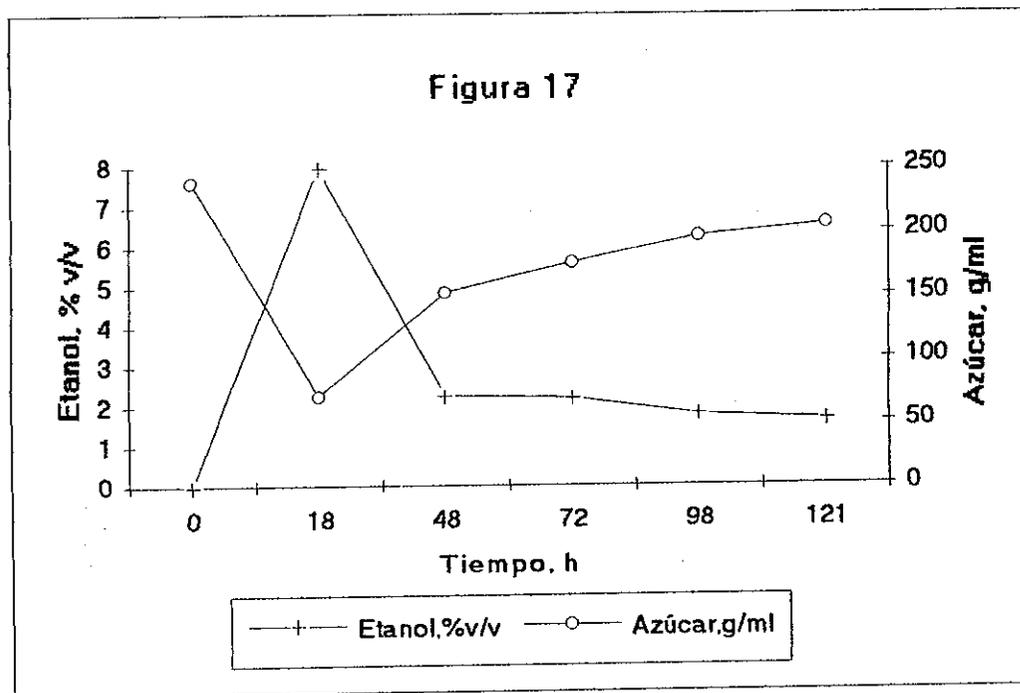


Tabla 9
estéril / suplemento: harina de soya

Tiempo,h	pH	T,°C	Etanol, %(v/v)	Azúcar,g/ml
0	4.56	31.8	0	241.7
24	4.55	32.8	6.36	74.2 por lote
48	4.60	31.9	6.21	82.3 continuo
70	4.61	30.8	4.69	156.6
94	4.59	30.5	3.98	189.7
120	4.58	30.7	3.10	212.0

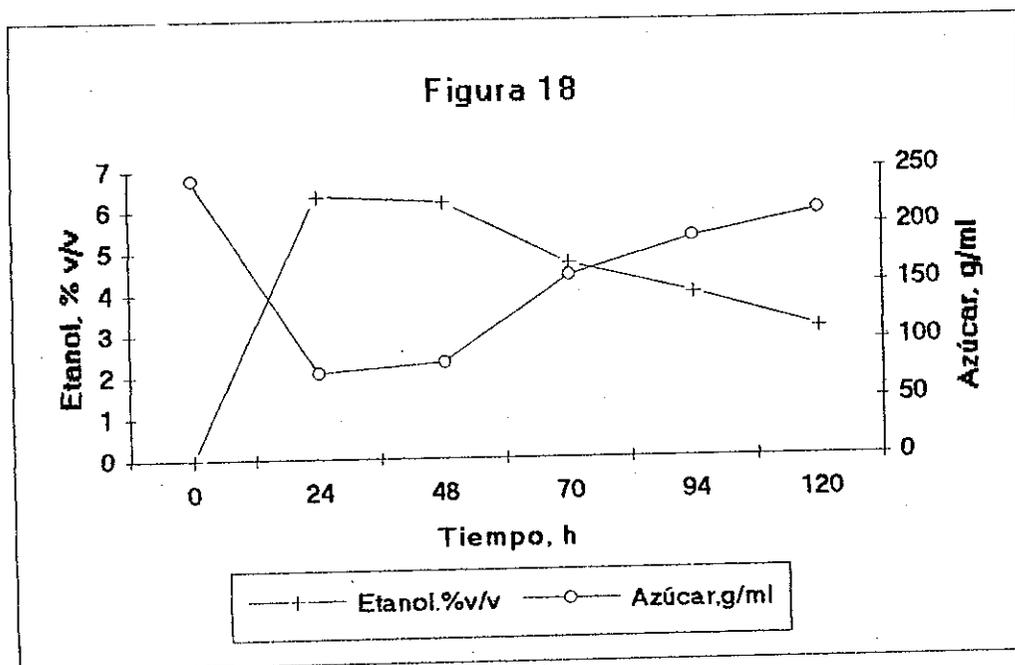


Tabla 10
estéril / suplemento: xylan

Tiempo,h	pH	T,°C	Etanol, %(v/v)	Azúcar,g/ml
0	4.45	32.1	0	229.9
24	4.43	31.6	3.70	178.2
48	4.43	30.9	5.74	102.4
76	4.48	31.7	5.48	116.3
103	4.51	29.7	3.36	188.0
114	4.52	31.8	2.11	220.0

