

Determinación de parámetros de co-cultivo de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol"

Universidad Iberoamericana

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial
del 3 de Abril de 1981



"Determinación de parámetros de co-cultivo de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol"

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

Presenta

Ana Karina Castillo Plata

Director de Tesis: M.B. Lorena Leticia Pedraza Segura

Lector 1: Dr. Martín Rivera Toledo

Lector 2: Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall

México, D.F. 2013

RESUMEN

La demanda de energía en el planeta, las concentraciones de CO₂ en la atmósfera, así como la creciente disminución de las reservas de los combustibles fósiles, han incrementado el interés en el desarrollo de tecnologías para mitigar estos problemas y aprovechar distintas fuentes de energía renovables.

Una alternativa son los biocombustibles que pueden ser obtenidos de biomasa como los materiales lignocelulósicos (residuos agrícolas, residuos forestales, residuos de papel, residuos sólidos municipales, y cultivos energéticos); estos son de interés debido a que son recursos renovables, están disponibles en grandes cantidades y que los procesos de su transformación son amigables con el medio ambiente.

Se buscó producir etanol por la fermentación de azúcares presentes en los hidrolizados de residuos lignocelulósicos, principalmente hexosas y pentosas.

Se utilizaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis* para formar un co-cultivo capaz de fermentar glucosa y xilosa presente en los hidrolizados de olote e hidrolizados de residuos de la Central de Abastos de la ciudad de México (CEDA) para producir altos rendimientos de etanol.

Se utilizó el diseño de experimentos Plackett Burman (PB) para determinar los parámetros de co-cultivo, se obtuvo que para ambos tipos de hidrolizados es conveniente temperatura de 32 °C y una relación de 1:3 de la proporción de levadura de *S. cerevisiae* y *S. stipitis*, con agitación de 140 rpm y 100 rpm en hidrolizados de olote y CEDA respectivamente, se obtuvieron rendimientos teóricos de etanol entre el 71 y 19% de los hidrolizados de olote y CEDA respectivamente, de la fermentación en matraz. Estos experimentos bajo las mismas condiciones fueron escalados en biorreactor obteniendo rendimientos teóricos de etanol entre 68 y 78% de los hidrolizados de olote y CEDA respectivamente. Posteriormente se simuló en Matlab las condiciones de microaireación para evaluar su efecto en la productividad de etanol en los dos tipos de hidrolizados, se determinó que para ambos tipos de hidrolizados es conveniente tener 1.57 g/L de O₂ disuelto en el medio de fermentación con el que se podría incrementar la concentración de etanol entre 4 y 6 g/L.

INDICE GENERAL

ANTECEDENTES.....	5
1.1 Etanol a partir de materia lignocelulósica	7
1.2 Microorganismos Etanologénicos.....	7
1.3 Co-cultivo en procesos de fermentación.....	8
1.3.1 Fermentación de Co-cultivo	9
1.3.2 Co-cultivo para la Conversión de Biomasa en Etanol.....	13
1.4 Cinética de crecimiento celular.....	17
1.4.1 Ecuación de Monod	19
1.4.2 Cinética de producción.....	20
1.4.3 Balance de Materia	21
1.5 Fermentación en biorreactor.....	21
1.6 Consideraciones en la producción de biocombustibles.....	23
2 JUSTIFICACIÓN.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 General	26
3.2 Específicos.....	26
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 Microorganismos	27
4.2 Reactivos	28
4.3 Equipos	28
4.4 Técnicas Analíticas	29
4.4.1 Cinéticas de Crecimiento	29
4.4.2 Cuantificación de azúcares y etanol.....	31
4.4.3 Diseño de experimentos Plackett-Burman	32
4.4.4 Fermentación en biorreactor BIOFLO III	36
5 RESULTADOS Y ANALÍS DE RESULTADOS.....	36
5.1 Inoculo de co-cultivo.....	36
5.2 Diseño de Experimentos Plackett-Burman	37
5.2.1 Experimentos 3 y 5	42
5.2.2 Fermentación en biorreactor BIOFLO III	44
5.2.3 Simulación del proceso	50
6 CONCLUSIONES	56
7 PERSPECTIVAS	57
8 GLOSARIO	58
9 BIBLIOGRAFÍA.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura de la pared vegetal. Tomado de Toribio (2011).....	7
Figura 2.2 Ruta metabólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condiciones aerobias y anaeróbicas. Toribio (2011)	15
Figura 2.3 Ruta metabólica de <i>Pichia stipitis</i> . Jeffries (2006)	17
Figura 2.4 curva típica de crecimiento celular.	18
Figura 5.1 Morfología celular de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i>	28
Figura 5.2 Cámara de Neubauer mejorada y cuadrícula de conteo.....	31
Figura 6.1 Cinética de consumo de azúcares de la matriz de experimentos PB.	38
Figura 6.2 Cinética de producción de etanol de los experimentos de la matriz PB.....	38
Figura 6.3 Rendimientos teóricos de etanol de los experimentos de la matriz PB.....	39
Figura 6.4 Superficies de respuesta de la matriz de experimentos PB.....	42
Figura 6.5 Cinética de consumo de azúcar experimentos 3 y 5.	43
Figura 6.6 Cinética de producción de etanol experimentos 3 y 5.	43
Figura 6.7 Cinética de producción de xilitol experimento 3 y 5.....	44
Figura 6.8 Cinética de consumo de azúcares totales en biorreactor con agitación de 100 y 140 rpm.....	47
Figura 6.9 Cinética de consumo de azúcares en biorreactor.....	47
Figura 6.10 Cinética de producción de etanol en biorreactor.	48
Figura 6.11 Cinética de biomasa en biorreactor.....	49
Figura 6.12 Simulación de cinéticas de consumo de azúcar y crecimiento de biomasa en hidrolizados de olote.	51
Figura 6.13 Cinética de producción de etanol de cada una de las cepas en hidrolizados de olote.....	52
Figura 6.14 Simulación de cinéticas de consumo de azúcar y crecimiento de biomasa en hidrolizados de CEDA.....	53
Figura 6.15 Cinética de producción de etanol de cada una de las cepas en hidrolizados de CEDA.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Antecedentes de co-cultivos.	12
Tabla 2.2 Fases del crecimiento celular en un cultivo discontinuo (μ_{max} es la velocidad específica máxima de crecimiento).	18
Tabla 5.1 Cepas de levadura utilizadas en el co-cultivo.	27
Tabla 5.2 Matriz Experimental Plackett Burman para N=8 experimentos.	33
Tabla 5.3 Variables del proceso de fermentación.	34
Tabla 5.4 Límites superior e inferior del Diseño Experimental PB.	34
Tabla 5.5 Matriz Experimental PB para la determinación de parámetros del co-cultivo en procesos de fermentación de hidrolizados lignocelulósicos.	35
Tabla 6.1 Volúmenes de trabajo y determinación co-cultivo.	37
Tabla 6.2 Efecto de los parámetros de la matriz PB	40
Tabla 6.3 Resultados experimentales de la matriz PB.	40
Tabla 6.4 Comparación del modelo.	41
Tabla 6.5 Combinaciones de las superficies de respuesta.	41
Tabla 6.6 Dimensiones de matraz y biorreactor.	45
Tabla 6.7 Parámetros cinéticos de co-cultivo. Tomado de Arriaga (2000).	45
Tabla 6.8 Parámetros de transferencia de oxígeno en matraz.	46
Tabla 6.9 Parámetros de transferencia de oxígeno en biorreactor.	46
Tabla 6.10 Datos cinéticos de fermentación en biorreactor para cada hidrolizado.	51
Tabla 6.11 Valores de O_2 disueltos en el medio de fermentación para maximizar la producción de etanol.	55
Tabla 6.12 Concentraciones de etanol a partir de la concentración de O_2	55

1 ANTECEDENTES

Los biocombustible son combustibles líquidos o gaseosos para el sector de transporte, son producidos a partir biomasa (Demirbas, 2008). Se clasifican en biocombustibles de 1ra, 2da y 3ra generación, la principal distinción entre ellos es la materia prima utilizada y los avances tecnológicos necesarios para obtenerlos, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y Alimentación (FAO) (CGIAR & FAO, 2008).

Biocombustibles de 1ra generación: Son producidos de azúcar, almidón y aceites de plantas como caña de azúcar, trigo, maíz, palma aceitera y soya. Son producidos y comercializados en cantidades significativas por diversos países, respondiendo actualmente por 1.5% del total de combustibles de transporte en el mundo.

Biocombustibles de 2da generación, (biocombustibles celulósicos): Son producidos a partir de residuos agroindustriales y gramíneas forrajeras. Su producción es significativamente más compleja, comparados a los de 1ra generación y todavía no son comercializados. Las tecnologías para una conversión de materiales lignocelulósicos a biocombustibles son existentes, pero todavía no aplicadas en producción de gran escala.

Biocombustibles de 3ra generación: Son producidos a partir de la biomasa modificada genéticamente de modo que facilita los procesos subsecuentes. Los agentes de conversión (microorganismos, algas) también son modificados genéticamente para que el proceso sea más eficiente.

Actualmente se consideran otros tipos de materias primas alternativas en la producción de biocombustible, entre estas se encuentran diversas especies arbustivas o arbóreas perenes oleaginosas u otras con potencial de desarrollarse en zonas áridas o semiáridas de tierras marginales, como camelina y microalgas *Ganduglia* (2008).

Un concepto de gran importancia en el contexto de los biocombustibles es el de biorefinería. No hay una definición exacta para este término, pero el concepto se refiere a un uso más amplio de la biomasa, en sistemas que posibilitarían, además de la producción de biocombustibles, la producción de una variedad de otros productos valiosos como electricidad, sustancias químicas, plásticos, alimentos y fibras.

Actualmente el biocombustible más utilizado es el bioetanol, cuya producción por fermentación es una tecnología bastante antigua y conocida. En este campo, los esfuerzos en investigación han sido dedicados a mejorar el rendimiento de los procesos convencionales, el desarrollo de microorganismos y procesos para producción de bioetanol utilizando la biomasa lignocelulósica como materia prima.

La ventaja del bioetanol es que posee menos de un 0.1% de agua en su composición, siendo adecuado para la mezcla carburante con la gasolina. Brasil fue el primero país del mundo en eliminar totalmente el tetraetilo de plomo de su matriz de combustibles en 1992 al utilizar bioetanol, ya que al quemarse el tetraetilo de plomo, el plomo era liberado a la atmosfera generando un problema ambiental y de salud. En el 2007, la producción total mundial de este biocombustible fue de 49.6 billones de litros y en el año siguiente alcanzó 65.3 billones de litros (EIA, 2009).

Otra ventaja del uso de bioetanol es que puede ser obtenido por fermentación, que es un proceso económicamente viable, para que la obtención de bioetanol sea rentable es necesario considerar su volumen de producción, el rendimiento industrial y el costo de fabricación, de esta forma, los países producen etanol de diferentes materias primas, de ahí la importancia de la biomasa lignocelulósica como una posible materia prima en la producción de etanol.

Hacia esta meta se encaminan procesos biotecnológicos, como aquellos que utilizan el metabolismo fermentativo etanológico de algunos microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que son capaces de metabolizar de forma natural azúcares como la glucosa y la xilosa de residuos lignocelulósicos.

Un enfoque para aprovechar de forma simultánea los azúcares, presentes en olote de maíz y residuos de la Central de Abasto de la Ciudad de México (CEDA) es el de co-cultivo. El co-cultivo involucra dos microorganismos o más capaces de convivir y ser activos en un medio bajo las mismas condiciones de operación, la forma en que actúan estos sistemas es complejo porque en los procesos de fermentación las condiciones pueden estar cambiando.

1.1 Etanol a partir de materia lignocelulósica

La estructura básica de la biomasa lignocelulósica consiste en tres polímeros básicos: celulosa, hemicelulosa y lignina. De la celulosa y la hemicelulosa se pueden obtener principalmente dos tipos de monosacáridos: glucosa y xilosa, los cuales mediante el proceso de fermentación se puede obtener bioetanol. (Toribio, 2010). En la Figura 2.1 se muestra la estructura de la biomasa lignocelulósica.

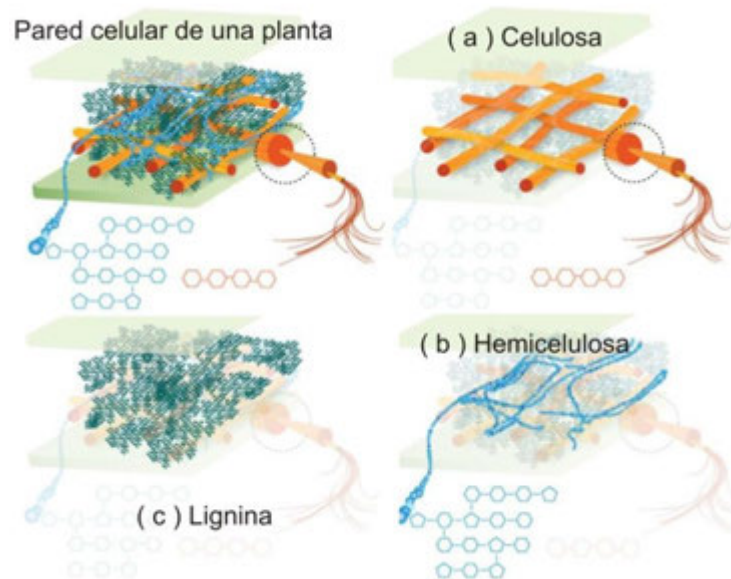


Figura 1.1 Estructura de la pared vegetal. Tomado de Toribio (2011)

Para producir bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos es necesario enfocarse en el desarrollo de ciertas operaciones como: hacer más eficiente la obtención de azúcares y eficientar la fermentación de pentosas y hexosas.

1.2 Microorganismos Etanologénicos

La producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos requiere de microorganismos capaces de metabolizar las azúcares presentes eficientemente, aumentando el rendimiento, con la finalidad de escalar industrialmente este proceso con éxito.

Las levaduras son los microorganismos más adecuados para la producción de etanol, crecen preferiblemente en hexosas, pocas cepas son capaces de utilizar pentosas y metabolizarlas en etanol.

Uno de los microorganismos que se destaca por su capacidad de fermentar hexosas y su alto rendimiento de etanol es *S. cerevisiae*, que es ampliamente utilizada en la industria

Entre las levaduras que utilizan pentosas, están microorganismos tales como *Pichia tannophilus*, *Candida shehatae*, *Schefferomyces stipitis* y *Kluveromyces maxianus*. Otras levaduras investigadas por su capacidad de fermentación han sido *Brettanomyces*, *Clavispora*, *Schizosaccharomyces*, especies de *Candida viz*, *Candida tenuis*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida blankii*, *Candida friedrichii*, *Candida parapsilosis* y *Candida solani* y especies de *Debaromyces viz.*, *Debaromyces nepalensis* y *Debaromyces polimorfa* (Abbi, 1996). La producción de etanol por *Pichia tannophilus* y las especies que pertenecen a *Candida* y *Schefferomyces* es mejor en condiciones microaeróbicas.

1.3 Co-cultivo en procesos de fermentación

La glucosa y la xilosa son los dos azúcares dominantes en hidrolizados de residuos lignocelulósicos, ambos necesitan ser fermentados de forma eficiente, ya que un solo microorganismo no pueden convertir todos los azúcares en etanol para producir un alto rendimiento, se plantea el uso de dos o más microorganismos que puedan aprovechar todos los azúcares, a dicha combinación de microorganismo se denomina **co-cultivo**.

El enfoque de co-cultivo tiene ventajas sobre un solo cultivo, ya que hay potencial para la acción sinérgica de las vías metabólicas de todas las cepas implicadas. De acuerdo con el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE), la bioconversión de co-cultivo es conveniente para una mayor rentabilidad en la producción de etanol ya que de esta forma se reducen los costos de inversión.

La convivencia de los microorganismos utilizados en co-cultivo debe ser estable, y compatible para ser capaces de crecer y actuar juntos. Los parámetros que determinan el desempeño de la fermentación del co-cultivo son: las especies de microorganismos, especificación del sustrato (medio de fermentación), intervalo de

temperatura, pH, tolerancia al alcohol, velocidad de crecimiento y la tolerancia a inhibidores. Otro factor importante en co-cultivo es la aireación, ya que en la fermentación de xilosa levaduras como *S. stipitis* utilizan el oxígeno para su crecimiento y formación de producto.

El oxígeno tiene baja solubilidad en agua en comparación con el carbono, nitrógeno y fósforo, por lo tanto, en algunas fermentaciones es necesaria la transferencia de oxígeno al medio de fermentación. Dicha transferencia se puede realizar de diferentes maneras, entre ellas agitación mecánica y por dispersión de burbujas de aire.

1.3.1 Fermentación de Co-cultivo

En la década de los 80's se realizaron los primeros estudios para la conversión de celulosa a etanol utilizando co-cultivos; Leschine y colaboradores utilizaron un co-cultivo de *Clostridium* y *Zymomonas mobilis* en celulosa obteniendo 7 g etanol/L.

Abouzied y colaboradores utilizaron un co-cultivo de *Saccharomycopsis buligera* y *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar almidón al 10% p/v hasta una conversión mayor a 90% del máximo teórico, a un pH de 5 a 6.

He (2009) utilizó un co-cultivo de la bacteria *Paenibacillus sp* y diferentes cepas de *Z. mobilis* para fermentar almidón obtenido de papa dulce. En este co-cultivo la primera bacteria hidrolizó el almidón a glucosa que la segunda fermentó a etanol, la mejor concentración fue de 6.89 g/L.

Otros sustratos son los residuos de la industria láctea, Kamini (1987) compara la fermentación de lactosa (200 g/L) obtenida de suero lácteo residual a etanol utilizando un cultivo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 (36 g/L de etanol) y un co-cultivo de *K. fragilis* NRRL 665 y *Z. mobilis* (55 g/L de etanol), la tasa de producción de etanol y la tasa de consumo específico de sustrato incrementaron con el co-cultivo, sin embargo los azúcares residuales también aumentaron. Guo utilizó suero residual de queso para producir etanol, el estudio comparó el uso de mono-cultivos y co-cultivos de *K. marcianus* y *S. cerevisiae* de manera libre o inmovilizada. El mejor desempeño lo mostró el co-cultivo, "un factor a tomar en cuenta es la proporción de las levaduras en el co-cultivo para lograr altos rendimientos de etanol".

Murray (1984) utilizó un co-cultivo de una mutante *Clostridium saccharolyticum* y *Zymomonas mobilis* para fermentar un hidrolizado de hojuelas de álamo (mezcla de 70% hexosas y 30% pentosas) alcanzando un rendimiento máximo de 93.2% teórico, en tanto que Asther fermentó una mezcla sintética de celobiosa, glucosa y xilosa utilizando un co-cultivo de *Zymomonas anaerobia* y una mutante de *Clostridium saccharolyticum* tolerante al etanol (75 g/L), produciendo 50 g/L de etanol a partir de 130 g/L de azúcares totales.

Laplace (1993) desarrolló tres esquemas de fermentación posibles para mezclas de glucosa y xilosa utilizando las cepas *S. stipitis* Y7124, *C. shehatae* ATCC 22984, *S. cerevisiae* CBS1200 y *Z. mobilis* ATCC10988. Los esquemas de fermentación son:

Esquema 1: Utilizó *S. stipitis* que fermenta xilosa y *Z. mobilis* que fermenta glucosa, ambas cepas son tolerantes a bajas concentraciones de etanol.

Esquema 2: Apoya el concepto de co-cultivo, utilizó dos cepas, *C. shehatae* y *S. cerevisiae* determinó el efecto del grado de aireación en el medio de fermentación; en los parámetros cinéticos del co-cultivo.

Esquema 3: Consiste en llevar a cabo la fermentación de cada azúcar glucosa y xilosa por separado utilizando el microorganismo más adecuado. Gracias a este esquema se puede fermentar xilosa (50 g/L) que representa alrededor del 30% de los azúcares fermentables del material lignocelulósico y además fermentar la glucosa (100 g/L) evitando los problemas de la inhibición por el etanol producido; con estas concentraciones de azúcares es posible alcanzar una concentración suficientemente alta de etanol.

Los reportes mostrados anteriormente muestran que los co-cultivos son una opción viable para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico. En la Tabla 2.1 se presentan otros estudios de producción de etanol mediante el uso de co-cultivos en diferentes residuos lignocelulósicos.

La fermentación por co-cultivos provee la oportunidad de lograr una conversión simultánea de hexosas y pentosas, incrementar el rendimiento de etanol y la velocidad de producción. Se trata de una tecnología en progreso, prometedora, sin embargo se presentan algunas complicaciones como su escalamiento a la industria requiere nuevos campos de investigación.

SUSTRATO	MICROORGANISMO		FERMENTACIÓN			AUTOR	Año
	Nombre	T [°C]	Agitación [rpm]	pH	Observaciones		
Medio de glucosa y xilosa sintético Con relación 8:1 respectivamente	1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.- <i>Candida tropicalis</i>	30	0-200 en intervalos de 50	4.5-6	50 rpm es adecuado para la producción de etanol por el cocultivo a partir de los azúcares mixtos.	A. Rodmui y J. Kongkiattikajorn	2008
Mezcla de glucosa y xilosa sintético	1.- <i>Pichia stipitis</i> Y7124 2.- <i>Candida shehatae</i> ATCC 22984 3.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBSI200 4.- <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC10988	30	150	4.5		J.M. Laplace , J.P. Delgenes , R. Molleta y J.M. Navarro	1991
Medio de glucosa y xilosa	1.- <i>Zymomonas mobilis</i> 2.- <i>Clostridium saccharolyticum</i>	30	N/E	N/E		William II Murray Y M. Asther	1984
Almidón sin hidrolizar	1.- <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> 2.- <i>S. cerevisiae</i>	30	N/E	5 a 6		M. Abouzied y C. Reddy	1987
Medio de glucosa y xilosa	1.- <i>Kluyveromyces marxianus</i> , inmovilizada 2.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , libre	30	120	N/E		X. Guo, J. Zhou y D. Xiao	2010
Lactosa	1.- <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL 665 2.- <i>Zymomonas mobilis</i>	N/E	N/E	N/E	Concentraciones de 36 a 52 g/L	N. R. Kamini y P. Gunasekaran	1987

Hidrolizado de madera	1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2.535 2.- <i>Pachysolen tannophilis</i> ATCC 2.1662 3.- <i>Escherichia coli</i>	30	N/E	N/E	Co-cultivos: Las cepas 1 y 2 y las cepas 1 y 3. Producción de 0.45 g etanol/g de azúcares	M. Qian, S. Tian y colaboradores	2006
Materia lignocelulósica	1.- <i>Neocallimastix patriciarum</i> 2.- <i>Methanobacterium formicicum</i> 3.- <i>Methanosarcina barker</i> 4.- <i>Methanobrevibacter smithii</i>	39	N/E	N/E	Midieron la actividad celulolítica y xilanolítica.	M. Teunissen, E. Kets, H. y Op den Camp	1992
Licor de sacarosa de maíz	1.- <i>Bacteria Glucanobacter xylyus</i> (ST-60) 2.- <i>Bacteria Lactobacillus mali</i> (ST-20)	28	N/E	N/E	El cocultivo presenta un rendimiento 3 veces mayor al de un monocultivo.	Akira Seto	2006
Medio de 50.4 g/L de glusa estandar y 20.7 g/L de xilosa estandar con compuesto YPM	1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.- <i>Scheffersomyces stipitis</i>	30	300	6.5		Yuan Li, Jeung-yil Park, Riki Shiroma y Ken Tokuyasu	2011
Glucosa , xilosa y manosa	1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.- <i>Pichia stipitis</i> NCIM 3498 3.- <i>Candida shehatae</i> (NCIM3501)	30	150	5.5		L. Venkateswar Rao	2011

Tabla 1.1 Antecedentes de co-cultivos.

1.3.2 Co-cultivo para la Conversión de Biomasa en Etanol

El metabolismo es el conjunto de todas las reacciones que se dan en el interior de un ser vivo ya sea una célula o un individuo pluricelular, para obtener la energía necesaria para vivir. Básicamente un ser vivo se compone de moléculas complejas que se forman a partir de la unión de átomos de carbono entre sí, formando cadenas y uniones secundarias que se establecen entre las cadenas de carbono y otros elementos, como fósforo, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, estos enlaces contienen energía.

Para que una célula consiga liberar energía contenida en un nutriente como azúcar, proteína o grasa, necesita que este vaya rompiendo sus enlaces hasta transformarse en una molécula sencilla, la energía liberada debe de recogerse y almacenarse para que después la célula la utilice en aquellos procesos concretos que necesite realizar, para ello se utiliza el ATP, molécula que se forma cuando se rompe un enlace de alta energía y que almacena en sus enlaces la energía liberada.

La fermentación es una ruta metabólica que utilizan los seres vivos para conseguir energía a partir de reacciones químicas. Su oxidación se realiza a partir de la ausencia de oxígeno, conocida como ciclo de Krebs, que son las responsables de la oxidación última de glúcidos, proteínas y grasa, que se transforman en dióxido de carbono y una gran cantidad de ATP. Existen otras moléculas encargadas de almacenar el poder reductor, que es la capacidad de oxidar una molécula, entre ellas el NAD⁺, que gana un ión hidrógeno, pasando a ser NADH, cuando otra molécula se oxida.

En la obtención de etanol a partir de los azúcares presentes en los residuos lignocelulósicos se requiere de microorganismos que logren fermentar tanto glucosa como de xilosa.

Saccharomyces cerevisiae es un hongo eucariótico unicelular conocido como levadura, ha sido tradicionalmente usada en la producción de bebidas alcohólicas y alimentos, es la levadura más tolerante a etanol y fermenta azúcares bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El rendimiento con sustratos puros como glucosa y sacarosa, es del 95%, y con materiales sin procesar de grado industrial es 91%. Aunque el género *Saccharomyces* no es capaz de metabolizar xilosa aeróbica o anaeróticamente, existen otras bacterias como *Scheffersomyces stipitis* y *Candida shehatae* que son capaces de fermentar xilosa a etanol, o bien de usarla para crecer

aeróbicamente. Sin embargo, estas levaduras no llevan a cabo una fermentación alcohólica eficiente, y tienen una tolerancia a etanol relativamente baja.

Entre ellos, *S. stipitis* puede utilizar glucosa, manosa, galactosa, celulosa y xilosa para la producción de etanol. Es superior a otras especies de levadura para la producción de etanol a partir de xilosa, alcanza concentraciones de hasta 57 g/L sin formación de xilitol en condiciones microaeróbicas y no requiere vitaminas. Para alcanzar condiciones de microaerobiosis es necesaria la transferencia de oxígeno al medio durante el tiempo de la fermentación.

Dado que las vías metabólicas son activas solamente bajo ciertas condiciones específicas, en cada ambiente o condición de crecimiento opera una determinada distribución de flujos metabólicos que permite a la célula acoplar la generación de energía y el catabolismo de la fuente de carbono con los requerimientos anabólicos para alcanzar un crecimiento óptimo. Por este motivo, conocer, identificar, y manipular las distintas condiciones de crecimiento es un requerimiento esencial para el diseño de bioprocesos destinados a la obtención biotecnológica de productos derivados del metabolismo microbiano.

El análisis de flujos metabólicos (AFM) se tiene como principal objetivo la cuantificación detallada de todos los flujos metabólicos del metabolismo central en un organismo. El resultado final de un estudio de este tipo es un mapa de reacciones bioquímicas que muestra la distribución de flujos anabólicos y catabólicos en el contexto de una red de reacciones bioquímicas

La ruta metabólica de *S. cerevisiae* es de las más conocidas tiene como principal fuente de energía glucosa y la convierte a piruvato mediante la glicólisis, mientras que la producción de energía en forma de ATP está acoplada a la generación de intermediarios y la reducción de carga en la forma de NADH mediante rutas biosintéticas.

Las dos formas principales del uso del piruvato en la producción de energía son: la respiración y la fermentación (Figura 2.2). En presencia del oxígeno, el piruvato entra en la matriz mitocondrial en donde es decarboxilado oxidativamente a acetil-CoA por el complejo multienzimático piruvato dehidrogenasa. Esta reacción enlaza a la glucólisis con el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs), en la cual la acetil-CoA es completamente

oxidada para dar dos moléculas de CO_2 y las formas equivalentes reducidas en la forma de NADH y FADH_2 .

El reabastecimiento de los componentes necesarios para conducir el ciclo del ácido cítrico, como oxaloacetato y α -cetoglutarato, son: la fijación de CO_2 al piruvato por la acción de las enzimas piruvato carboxilasa (dependiente del ATP) y el fosfoenol piruvato carboxiquinasa y el ciclo del glioxilato (un acceso directo al ciclo del ácido cítrico), lo cual es importante cuando las levaduras están creciendo en presencia de dos fuentes de carbono, tales como acetato o etanol.

Durante la fermentación alcohólica de azúcares, las levaduras vuelven a oxidar al NADH a NAD en una reacción de dos pasos a partir del piruvato, el cual es primero descarboxilado por la piruvato descarboxilasa seguido de la reducción de acetaldehído, catalizado por la alcohol deshidrogenasa (ADH). Al mismo tiempo, el glicerol se genera a partir de la dihidroxiacetona fosfato para asegurar la producción de etanol.

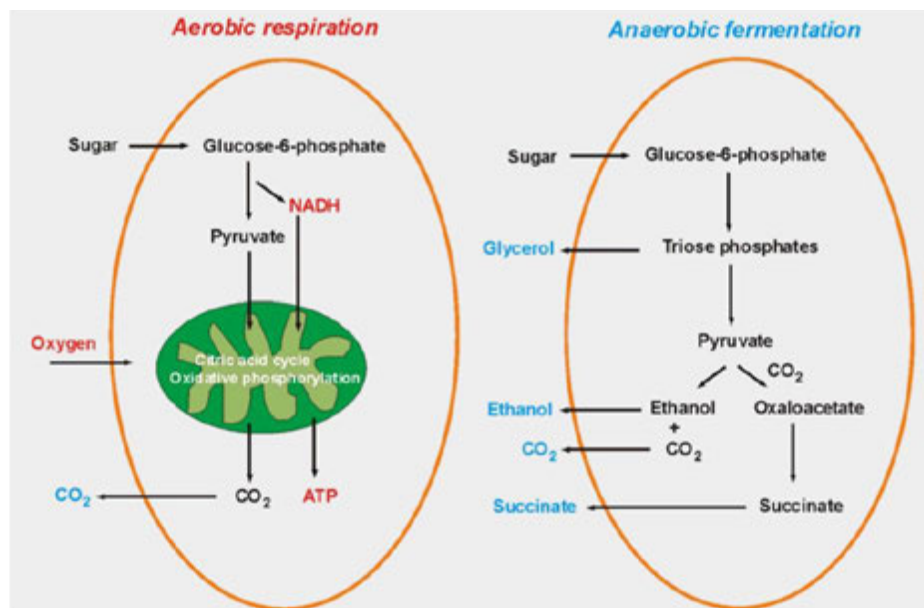


Figura 1.2 Ruta metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aerobias y anaeróbicas. Toribio (2011)

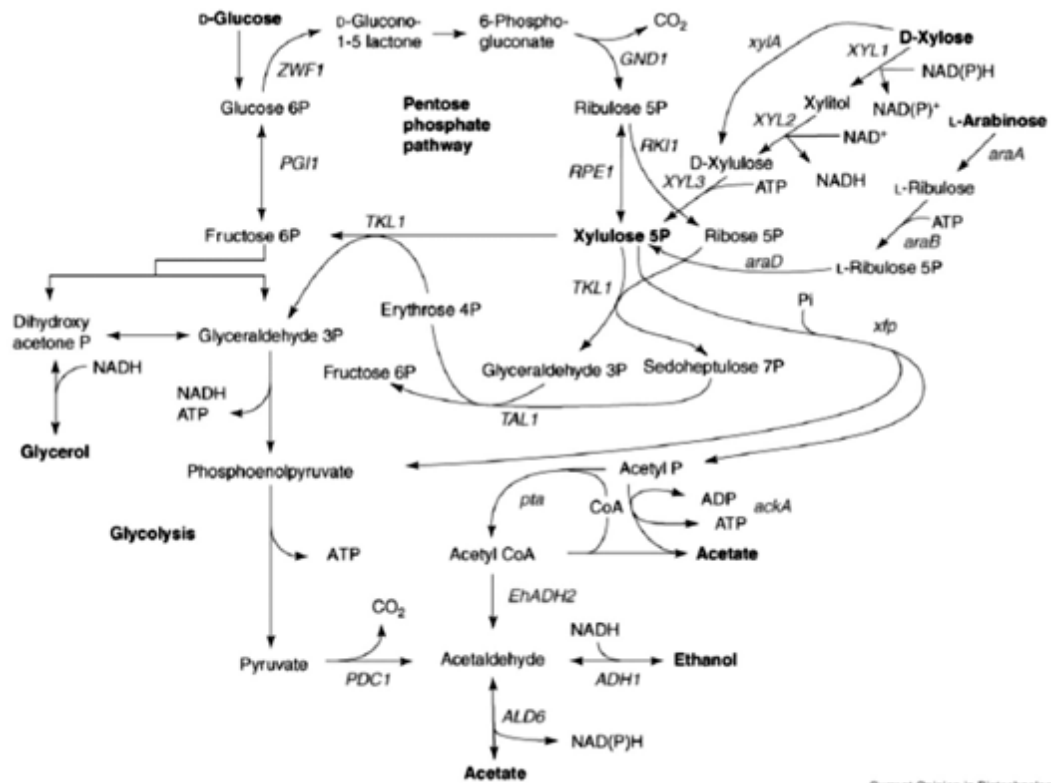
El conocimiento de la ruta metabólica de *S. stipitis* es de gran importancia para el uso de la hemicelulosa presente en el material lignocelulósico. En la revisión bibliográfica de Jeffries (2006) se presenta la ruta metabólica de *S. stipitis* (Figura 2.3).

La ruta de la pentosa fosfato (pentose phosphate pathway, PPP), es la ruta bioquímica para el metabolismo de la xilosa, se encuentra en prácticamente todos los organismos donde se proporciona D-ribosa para la biosíntesis de ácidos nucleicos, D-eritrosa-4-fosfato para la síntesis de aminoácidos aromáticos y NADPH para las reacciones anabólicas. La ruta PPP contiene dos fases, la fase oxidante convierte a la hexosa, D-glucosa-6P, en la pentosa, 5P-D-ribulosa, además de CO₂ y NADPH. La fase no oxidante convierte la D-ribulosa-5P en D-ribosa-5P, D-xilulosa-5P, D-sedoheptulosa-7P, D-eritrosa-4P, D-fructosa-6P y D-gliceraldehído-3P. La D-xilosa y la L-arabinosa entran en la ruta PPP a través de la D-xilulosa. En las bacterias la conversión de D-xilosa a D-xilulosa es a través de xilosa isomerasa (XYLa). En las levaduras, los hongos filamentosos y los eucariotas, esto se lleva a cabo a través de dos pasos una reducción y oxidación, realizados por xilosa reductasa (XYL1, Xyl1p) y xilitol deshidrogenasa (XYL2, Xyl2p), respectivamente. Jefries y colaboradores (2006) han secuenciado y ensamblado el genoma completo de *S. stipitis*.

La secuencia genómica provee la idea de cómo *S. stipitis* regula su balance redox, mientras que de manera muy eficiente fermenta xilosa en condiciones de micro aireación. (Toribio, 2011)

Las rutas metabólicas de los microorganismos permiten tener un panorama general de las condiciones que favorecen la fermentación de los sustratos así como conocer que variables del proceso pueden ser manipulables en la formación de los productos de interés.

En la fermentación de azúcares de residuos lignocelulósico utilizando el co-cultivo de *S. stipitis* y *S. cerevisiae* es importante controlar las condiciones de microaireación (fermentación aeróbica) ya que esta puede influir en la ruta metabólica para que haya un mayor crecimiento de biomasa o la generación de otros productos, como el caso de *S. stipitis* donde las condiciones de microaireación inducen la formación tanto de etanol como de xilitol.



Current Opinion in Biotechnology

Figura 1.3 Ruta metabólica de *Pichia stipitis*. Jeffries (2006)

1.4 Cinética de crecimiento celular

La cinética de muchas reacciones biológicas es de orden cero, de primer orden o de una combinación de ellas. La cinética de crecimiento celular se expresa mediante ecuaciones, desde el punto de vista matemático existe poca diferencia entre las ecuaciones cinéticas para enzimas y células, después de todo el metabolismo celular depende de la acción integrada de multitud de enzimas.

En un cultivo discontinuo se observan varias fases de crecimiento celular. Las diferentes fases se distinguen fácilmente cuando se representa el logaritmo neperiano de la concentración de células viables frente al tiempo, en la Figura 2.4 se muestra el crecimiento celular. La velocidad de crecimiento depende de la fase crecimiento.

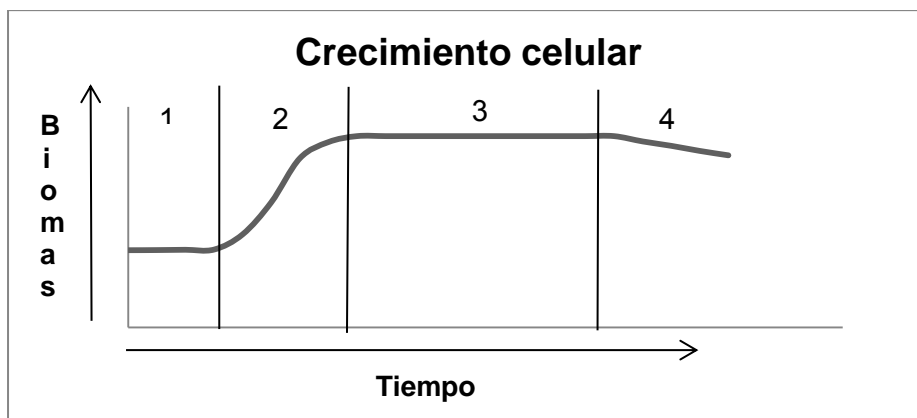


Figura 1.4 curva típica de crecimiento celular.

Durante la fase de crecimiento y desaceleración, la velocidad de crecimiento celular se describe mediante la ecuación:

$$r_x = \mu x \quad 1$$

Donde r_x es la velocidad volumétrica de producción de biomasa con unidades de: $\text{Kg/m}^3\text{s}$, x la concentración de células viables con unidades de: Kg/m^3 y μ la velocidad específica de crecimiento con unidades de tiempo. De acuerdo a la ecuación 1 el crecimiento celular se puede considerar como una reacción autocatalítica de primer orden. En la Tabla siguiente se explican las fases del crecimiento celular.

FASE	DESCRIPCIÓN	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO
1) Adaptación	Las células se adaptan al nuevo ambiente. No existe o existe muy poco crecimiento.	$\mu=0$
2) Aceleración de crecimiento	Comienza el crecimiento. El crecimiento alcanza su máxima velocidad.	$\mu < \mu_{\max}$ $\mu \approx \mu_{\max}$
3) Estacionaria	El crecimiento se hace más lento debido al agotamiento de los nutrientes o a la formación de productos inhibidores.	$\mu < \mu_{\max}$
4) Desaceleración o de muerte	Las células pierden su viabilidad y se rompen.	$\mu=0$ $\mu < 0$

Tabla 1.2 Fases del crecimiento celular en un cultivo discontinuo (μ_{\max} es la velocidad específica máxima de crecimiento).

En un sistema cerrado donde el crecimiento es el único proceso que afecta a la concentración celular, $r_x = dx/dt$, e integrado la ecuación 1 se tiene una expresión para x en función del tiempo. Si μ es constante puede integrarse directamente con la condición inicial $x=x_0$ a $t=0$, para obtener:

$$x = x_0 e^{-\mu t} \quad 2$$

Donde X_0 es la concentración de células viables a tiempo cero. La ecuación 2 representa un crecimiento exponencial. Tomando logaritmos neperianos se tiene:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad 3$$

De acuerdo a la ecuación 3 una representación de $\ln X$ frente al tiempo daría una línea recta de pendiente μ . La relación de la ecuación 3 es solamente válida si μ no varía, para determinar si la velocidad específica de crecimiento es constante se utiliza normalmente una representación de $\ln X$ frente al tiempo.

1.4.1 Ecuación de Monod

La velocidad específica de crecimiento de las células durante la fase de crecimiento y desaceleración en un cultivo discontinuo, depende de la concentración de nutrientes existente en el medio. A menudo un único sustrato ejerce un efecto dominante sobre la velocidad de crecimiento, denominado así sustrato limitante, es a menudo la fuente de carbono, nitrógeno o en algunos casos oxígeno. La velocidad específica de crecimiento está relacionada con la concentración de sustrato limitante del crecimiento mediante la ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \quad 4$$

S es la concentración de sustrato limitante. μ_{max} la velocidad específica máxima de crecimiento con dimensiones de uno entre tiempo y K_s la constante de sustrato.

La ecuación de Monod es la ecuación normalmente utilizada para relacionar la velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato, sin embargo existen algunas limitaciones, cuando el crecimiento se ve inhibido por concentraciones altas de sustrato o de producto deben añadirse otros términos a la ecuación para tener en cuenta estos efectos.

Ecuación de Monod con inhibición por sustrato:

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_{Is}}} \quad 5$$

Monod con inhibición:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S + K_s + \left(\frac{S}{K_{Is}}\right)^2} \quad 6$$

Monod con limitación por oxígeno:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \frac{Cl}{K_c + Cl} \quad 7$$

1.4.2 Cinética de producción

Para los productos formados en las rutas que generan ATP la velocidad de producción está, relacionada con la demanda de energía por parte de las células; si la producción está asociada al metabolismo energético, el producto se formará siempre que exista crecimiento, también se necesita ATP para el mantenimiento celular.

Las expresiones de cinética de formación de producto deben considerar la producción asociada al crecimiento y al mantenimiento:

$$r_p = Y_{pX}r_x + r_x + m_p x \quad 8$$

Donde Y_{pX} es el rendimiento teórico o verdadero de producto a partir de biomasa, m_p la velocidad específica de formación de producto debida al mantenimiento y X es la concentración de biomasa. La ecuación 8 establece que la velocidad de formación de producto depende de la velocidad de crecimiento y la concentración de células. De la ecuación 1 r_x igual a μx se tiene:

$$r_p = (Y_{pX}\mu + m_p)x \quad 9$$

Para productos asociados al metabolismo energético la velocidad específica de formación de producto (q_p) es igual a la combinación de términos asociados con el crecimiento y aquellos asociados a otros aspectos diferentes al crecimiento.

$$q_p = Y_{pX}\mu + m_p$$

10

1.4.3 Balance de Materia

Los balances de materia proporcionan una herramienta útil en el análisis de ingeniería. En los sistemas biológicos la materia se conserva en todo momento, sin olvidar que las células utilizan el sustrato para su crecimiento y generación de productos, así como recordar la demanda de oxígeno dependiendo si el proceso es aeróbico o anaeróbico, y algunos otros factores como la temperatura y el pH.

Se presentan las ecuaciones diferenciales ordinarias de balance de materia empleadas en bioprocesos discontinuos para:

Biomasa:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad 11$$

Sustrato:

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{\mu X}{Y_{x/s}} + m_s X + \frac{q_p X}{Y_{p/s}} \right) \quad 12$$

Producto:

$$\frac{dP}{dt} = q_p X - K_{dp} P \quad 13$$

Oxígeno:

$$\frac{dC_L}{dt} = - \left(\frac{\mu X}{Y_{x/o}} + m_o X + \frac{q_p X}{Y_{p/o}} \right) \quad 14$$

1.5 Fermentación en biorreactor

Los cultivos a pequeña escala se llevan a cabo en matraz de 250 mL o de menor capacidad a volúmenes de 1 litro. Para ello se mide la composición media, el pH, la temperatura y otras condiciones que permitan un óptimo crecimiento y producción.

Los parámetros utilizados para describir el funcionamiento del organismo son la velocidad de crecimiento de la célula, la producción específica y el rendimiento del producto. Una vez conocidas las condiciones óptimas del cultivo comienza un proceso de cambio de escala. La primera etapa debe ser un biorreactor de prueba de 2 a 3 litros de capacidad equipado con instrumentos para medir y ajustar la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, la velocidad de agitación y otras variables del proceso. Los cultivos deben estar mejor monitorizados permitiendo un mejor control del proceso, de esta manera se obtiene información sobre las necesidades de oxígeno de las células, las características espumantes y otros parámetros, lo que permite identificar las limitaciones impuestas por el reactor sobre la actividad del organismo.

Estos tipos de procesos requieren de métodos matemáticos y de la simulación de procesos para el análisis, la síntesis y la optimización del proceso, lo que ayuda proponer las diferentes alternativas para resolver estos retos modernos.

Elementos como la programación no lineal consiste en una función de varias variables que se encuentran sujetas a determinadas restricciones (expresadas en inecuaciones lineales) cada desigualdad del sistema de restricciones determina un semiplano. El conjunto de interacciones de todos los semiplanos determina un recinto acotado o no llamado "región de validez" o "solución factible". La ventaja que presenta la simulación de procesos es debido a que a partir de datos reales se pueden obtener información que permitirán el análisis, sin una gran cantidad de experimentos que incrementa el costo y desestabiliza la operación de cualquier planta de proceso ya que si el modelo utilizado es el adecuado, la reproducibilidad de resultados es excelente.

En el proceso de fermentación alcohólica, la concentración de biomasa, sustrato y producto son variables dependientes del tiempo de gran interés durante toda la fermentación. Su importancia radica en que a partir de ellas se puede evaluar el rendimiento de una fermentación. En la literatura aparecen recogidos distintos modos de fermentación, los cuales se pueden modelar matemáticamente mediante un sistema de ecuaciones diferenciales lineales de primer orden.

1.6 Consideraciones en la producción de biocombustibles

Independientemente de la materia prima o proceso utilizado, el principal objetivo del uso del biocombustible es la sustitución de derivados de petróleo, permitiendo disminuir la dependencia de recursos fósiles y mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero.

Las bondades asociadas al uso de un biocombustible dependen de la economía efectiva de energía no renovable que él proporciona, comparado a su equivalente fósil. Para el adecuado cómputo de las energías involucradas en el proceso de producción, deben ser consideradas las emisiones de CO₂ asociadas a su ciclo de vida, desde la producción de la materia prima hasta el uso final del combustible. También son considerados los consumos de energía y emisiones asociados a la producción de los insumos y equipos utilizados en la cadena productiva del biocombustible.

Es importante observar que en principio todo el CO₂ liberado en la quema de productos de la biomasa es reciclado a través de la fotosíntesis en el crecimiento de la biomasa en el próximo ciclo productivo, pero la parcela correspondiente a los combustibles fósiles significa un aumento líquido de la cantidad de esos gases en la atmósfera.

Las rutas avanzadas de producción de biocombustibles emplean celulosa y hemicelulosa de las fibras de plantas en vez de sacarosa o amida en la producción de biocombustibles. Naturalmente los procesos son bien más complejos. Cada abordaje de conversión, bioquímica o termoquímica, tiene sus ventajas, por ejemplo, alta selectividad y eficiencia de conversión son ventajas de la conversión bioquímica, mientras la robustez de la tecnología y capacidad de aceptar una amplia variedad de materias primas son ventajas comúnmente presentadas para conversión termoquímica.

Una vez que no hay ventaja económica o ambiental obvia, todos los factores deben ser analizados cuidadosamente, considerándose la realidad local desde donde será hecha la aplicación.

En México una importante iniciativa es el proyecto de investigación Babethanol, financiado por el FPO7 (*Seventh Framework Programme*), que cuenta con la participación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Centro

Mario Molina, el Consejo Regulador del Tequila A.C. y PROCAZUCAR, juntamente con instituciones de otros países latino-americanos y europeos. El proyecto propone estudiar nuevas materias primas para la producción de etanol como combustible, por ejemplo, el bagazo de agave azul, obtenido después de la extracción de los azúcares para la producción de tequila, que es producida en grandes cantidades en México (Babethanol, 2010).

En la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), en un proyecto integrando diversos grupos de investigación, también se está buscando el desarrollo de la ruta bioquímica para producción de etanol de 2ª generación (UAM, 2010). Ya en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) están siendo realizados estudios relacionados a la tecnología del hidrógeno, incluyendo su producción y uso en células de combustibles, así como también en el desarrollo de células de combustibles enzimáticas y microbianas (CICY, 2010).

2 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha habido un gran interés en fuentes de energía alterna, una de ellas es el bioetanol combustible que puede ser obtenido de fuentes renovables como la biomasa lignocelulósica ya que está disponible en grandes cantidades en la naturaleza y su procesos de producción así como su uso son más amables con el medio ambiente que los combustibles fósiles.

En la producción de bioetanol requiere de métodos eficientes en la fermentación de las hexosas y pentosas presentes en la materia lignocelulósica.

Un método viable es el co-cultivo, una mejor opción al monocultivo, ya que puede aprovechar mayor cantidad de azúcares, por lo que se ha planteado el uso y estudio de co-cultivo de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis* para el aprovechamiento de glucosa y xilosa de olote de maíz y residuos orgánicos de la Central de Abasto de la Ciudad de México (CEDA). La determinación de parámetros de fermentación de los azúcares es importante para poder lograr una mayor producción de etanol.

La fermentación de co-cultivos, maximiza la velocidad del uso del sustrato, incrementa el rendimiento de etanol y la velocidad de producción, y permite usar ambos tipos de azúcares.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar la producción de etanol mediante la fermentación simultánea de hexosas y pentosas de los hidrolizados de olote de maíz y CEDA por co-cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis*.

3.2 Específicos

- Conocer las cinéticas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en glucosa y de *Scheffersomyces stipitis* en xilosa.
- Establecer la proporción óptima de cada levadura en el inóculo de fermentación.
- Determinar las condiciones de temperatura y agitación de la fermentación con cada sustrato en matraz para tener mayores rendimientos de etanol.
- Escalar la fermentación de matraz a bio-reactor BIOFLO III de 3L.
- Conocer la cinética de producción de etanol en lote.
- Determinar las condiciones de microareación en bio-reactor.
- Emplear técnicas de simulación para mejorar la productividad.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se dividió en tres etapas, la primera fue determinar la cinética de crecimiento de cada una de las cepas en medio glucosa para *S. cerevisiae* y xilosa para *S. stipitis*, posteriormente determinar la proporción de cada cepa en el inóculo de fermentación en medio sintético de glucosa y xilosa.

La segunda etapa fue el diseño de experimentos para determinar las condiciones de fermentación del co cultivo como:

1. La proporción de cada cepa en el inóculo
2. La temperatura más adecuada
3. La velocidad de agitación
4. El tipo de sustrato (CEDA u olote de maíz)
5. Adición de elementos traza.

La tercera etapa consistió en escalar los mejores experimentos en biorreactor, mediante fórmulas de dimensionamiento considerando la velocidad de transferencia de oxígeno en el medio, velocidad de consumo de oxígeno, coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y velocidad de agitación, posteriormente se hizo la simulación en Matlab proponiendo un modelo matemático de acuerdo a las ecuaciones de Monod y literatura revisada para aumentar la producción de etanol a partir de las condiciones de microaireación.

4.1 Microorganismos

Se utilizaron dos tipos de levaduras, en la Tabla 5.1 se enlistan así como los medios en los que se conservaron.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO
<i>S. cerevisiae</i>	APD, YEPD y RB
<i>S. stipitis</i>	APD, YM y RB

Tabla 4.1 Cepas de levadura utilizadas en el co-cultivo.

Las cepas se mantuvieron en placas de los medios mencionados en la Tabla 5.1 a 4 °C.

Para el crecimiento y preparación de inóculos se utilizó medio YEP más fuente de carbono, compuesto con 20 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de fuente de carbono. Se utilizaron como fuente de carbono glucosa para *S. cerevisiae* y xilosa para *S. stipitis*, cada medio se hizo por separado; las condiciones de cultivo son: 30 °C y 130 rpm para ambas especies, los tiempos de incubación fueron de 16 a 24 horas.

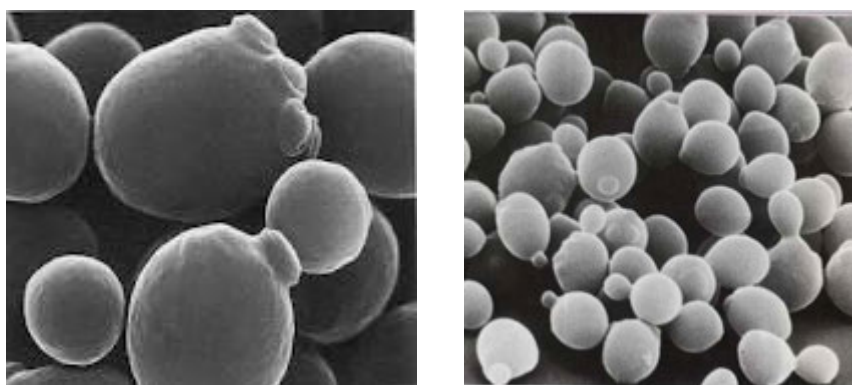


Figura 4.1 Morfología celular de las cepas de *S. cerevisiae* y *S. stipitis*.

4.2 Reactivos

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de magnesio ($MgSO_4$), tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) y urea ($(NH_2)_2CO$) de Reazol
- Medio APD, peptona de caseína, extracto de malta y el extracto de levadura de Bioxon.
- Medio RB de Difco.
- Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y xilosa ($C_5H_{10}O_5$) de JT Beaker.
- 3,5 ácido dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) de Sigma Aldrich.

4.3 Equipos

- Baño térmico con agitación modelo G76 New Brunswick Scientific.
- Biorreactor BIOFLO III Q 337700 New Brunswick Scientific.
- Cámara de Neubauer- improved MARIENFELD.
- Centrifuga BHG Hermle z 320 Labnet.
- Columna Aminex HP-87H BioRad, Hercules, CA.
- Cromatografo de gases Hewlett 5890 Packard Serie II.

- Cromatografo de líquidos de alta presión (HPLC) Agilent 1050 USA.
- Espectrofotómetro GENESYS 10S-UV-VIS Thermo Scientific.
- Microscopio óptico Leica GME modelo 1349521x.
- Potenciómetro Beckman 45 pH Meter.

4.4 Técnicas Analíticas

Las técnicas analíticas se dividen dos partes, las de cinética de crecimiento y de cuantificación de azúcares y producto.

4.4.1 Cinéticas de Crecimiento

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de los microorganismos, monitoreando en intervalos de 4 horas, se utilizaron las siguientes técnicas.

4.4.1.1 Densidad Óptica

Conocida como valoración turbidimétrica se basa en que un cultivo microbiológico actúa como una suspensión coloidal, bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él. Por tanto, al aplicar la turbidimetría, es decir la medida del porcentaje de absorción de luz, a una suspensión bacteriana, se puede estimar el número de células presentes. La turbidez es directamente proporcional a la concentración de células. El crecimiento del microorganismo se monitorea mediante la medición de densidad óptica, de acuerdo al siguiente protocolo:

- Se tomó 1 mL de la muestra de cultivo y se diluyó en solución salina (0.9% de NaCl p/v) en una proporción de 1:3.
- La muestra diluida se leyó a 660 nm en el espectrofotómetro.
- La densidad óptica se multiplica por el factor de dilución para obtener el valor real de la muestra.
- Si el valor de la densidad óptica excede a 0.6, se recomienda diluir más la muestra, a fin de tener datos confiables.

4.4.1.2 Peso Seco

Es una forma directa de medir la masa celular, tomando en cuenta un volumen fijo del cultivo, separando las células del medio, secarlas y pesarlas.

- Se tomaron 10 mililitros del caldo de fermentación, se colocaron en un tubo de centrifuga.
- La muestra se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se descartó.
- Se suspendió la biomasa celular en 5 ml de agua deionizada y se vació en una charola (que previamente se había llevado a peso constante).
- La charola se introdujo en el horno a 80 °C y se dejó secar hasta peso constante.

4.4.1.3 Cuantificación con cámara de Neubauer

La cuantificación de la concentración de células permite determinar el número de unidades por unidad de peso o volumen, existentes en un cultivo y sirve de base para establecer la dosificación de un producto o la concentración de una célula.

- Se tomó una alícuota de 1 mL del caldo de fermentación, se diluyó a una relación 1:40 con solución salina (0.9 % NaCl p/v).
- Con una micro pipeta se tomaron 10 micro litros de la muestra, se vaciaron en entre la cámara de Neubauer y un portaobjetos que la cubría.
- La cámara de Neubauer se colocó en el microscópico, se enfocó hasta que se pudieran ver nítidas las células mirando por el binocular.
- Se buscó el primer cuadro en donde se inició el conteo, existe una convención por la cual si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho. En la Figura 5.2 se ilustra la cuadrícula de la Cámara de Neubauer.
- Para el cálculo de la concentración de células por mililitro, se sumaron todas las células contadas en los cuadros y se dividió entre el volumen total de todos los cuadros (0.001 mL).

Las curvas de crecimiento de cada una de las cepas obtenidas con las técnicas mencionadas se muestran en el Anexo A.

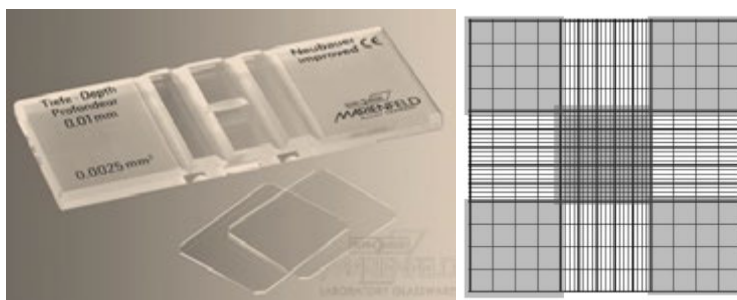


Figura 4.2 Cámara de Neubauer mejorada y cuadrícula de conteo.

4.4.2 Cuantificación de azúcares y etanol

Fue necesario obtener curvas estándar de cada uno de los azúcares y productos analizados en este estudio.

4.4.2.1 Método de Miller (DNS)

Conocida como determinación de azúcares reductores o prueba DNS, el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 640 nm.

- Preparación del blanco, a 1 mL de agua deionizada en un tubo de ensayo se adicionó 1.5 mL de reactivo DNS (3,5 ácido dinitrosalicílico).
- Preparación de la muestra, un alícuota del caldo de fermentación en tubo de ensayo se agregó 1.5 mL de reactivo DNS, se agitó perfectamente.
- Se hirvieron los tubos en baño María por 10 minutos posteriormente fueron enfriados con agua.
- Se leyó la absorbancia a 640 nm en el espectrofotómetro.
- Si la absorbancia es mayor a 1 se toma otra alícuota y se diluye según convenga.

La curva estándar para azúcares reductores con DNS se determinó utilizando una concentración de 4 g/L de azúcares, se diluyó 1 a 2 consecutivamente, a cada muestra se le hizo DNS de acuerdo a procedimiento descrito, se graficó concentración contra absorbancia y se realizó la regresión lineal. En el Anexo B se describe la preparación del reactivo DNS y la curva estándar de azúcares reductores.

4.4.2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Los estándares para las curvas y las muestras fueron analizados en el cromatógrafo de líquidos con la columna HP-87H, empleando ácido sulfúrico 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min, a 60 °C. Todos los compuestos aparecen en el cromatograma correspondiente al detector de índice de refracción (IR). Se inyectan 5 µL de muestra a la columna; los tiempos de retención (promedio) son de 9.44 minutos para la glucosa y 10.09 minutos para la xilosa.

Para las curva estándar se utilizó una concentración de 4g/L de cada azúcar que se diluyeron consecutivamente de 1:2, se graficó el área obtenida contra concentración y se realizó una regresión lineal, las gráficas empleadas se muestran en el Anexo C.

4.4.2.3 Cromatografía de Gases (HG)

Se utilizó el cromatógrafo de gases descrito en el apartado 5.1.3, se inyectan 1µL de la muestra con fase de nitrógeno a un flujo de 45 mL/min, con temperatura del inyector 150 °C y el detector 200 °C., los tiempos de retención (promedio) son de 1.9 minutos para etanol y 3.5 minutos para xilitol.

Las curvas estándar de etanol y xilitol se obtuvieron de graficar el área obtenida contra concentración y hacer una regresión lineal. En el Anexo D se muestran las curvas obtenidas.

4.4.3 Diseño de experimentos Plackett-Burman

El diseño experimental Plackett-Burman (PB) hecho por R. L. Plackett y J. P. Burman (1946), tiene la estructura de una matriz que relaciona los factores de un proceso, para el estudio de los efectos de los parámetros en las respuestas, esto permite al investigador tomar decisiones que mejoren la calidad de dicho proceso.

El diseño PB es el más sencillo para discriminar variables, es un paso para la optimización estadística una vez identificados los factores de mayor importancia. Esto se hace en la mejora de procesos para deducir mejor las interacciones y como pasar de modelos lineales a no lineales.

El Diseño de la Matriz incluye N número de experimentos, se relaciona el límite superior y el límite inferior del valor base de cada uno de los factores del proceso para determinar la influencia de cada factor y comparar la respuesta esperada del diseño experimental matemáticamente y la obtenida a través de la experimentación.

Para N experimentos se considera las secuencias de signos siguientes:

N=8 + + + - + - -

N=12 + + - + + + - - - + -

N=16 + + + + - + - + + - - + - - -

El diseño de N=8 experimentos permite probar hasta 7 factores o probar menos si es necesario, a continuación se presenta el Diseño de la Matriz para 8 experimentos:

EXP	FACTORES						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.2 Matriz Experimental Plackett Burman para N=8 experimentos.

Se empleó el diseño experimental Plackett Burman de N=8 para tener un valor de operación de cada uno de los factores, la respuesta deseada es producción de etanol en la fermentación de hidrolizados de olote y CEDA utilizando co-cultivo de *S. cerevisiae* y *S. stipitis*.

Los parámetros que se midieron en el diseño de la matriz PB, se especifican en la Tabla 5.3.

FACTOR	CONDICIÓN	UNIDADES
A	Temperatura	° C
B	Agitación	rpm
C	% de levadura	Corresponde a la fracción de 2×10^8 UFC
D	Sustrato	CEDA/OLOTE
E	Elementos traza	Adición o no de estos en el medio
F	-	-
G	-	-

Tabla 4.3 Variables del proceso de fermentación.

El porcentaje de levadura es la fracción del total 2×10^8 UFC del inoculo que corresponderán a la cantidad de *S. stipitis* en el co-cultivo.

En la Tabla 5.4 se muestran el nivel base de operación de los parámetros antes mencionados, definidos de acuerdo a la literatura y pruebas previas, así como el cambio de unidades consideradas obteniendo los límites superior e inferior.

PARAMETRO	NIVEL BASE	UNIDADES DE CAMBIO	UNIDADES DE MEDIDA	NIVEL SUPERIOR	NIVEL INFERIOR
A	30	2	°C	32	28
B	120	20	rpm	140	100
C	50	25	%	75	25
D	Sustrato (1)	CEDA/OLOTE (0.5)	-	CEDA (1.5)	OLOTE (0.5)
E	ET (1)	CON/SIN (0.5)	-	CON (1.5)	SIN (0.5)
F	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-

Tabla 4.4 Límites superior e inferior del Diseño Experimental PB.

El tipo de sustrato proporciona la fuente directa para la producción de etanol, por otra parte los elementos traza permiten que el microorganismo mantenga su función celular, al ser ambos una cualidad en el diseño de la matriz se toma como nivel base 1 y en la unidad de cambio la mitad (0.5), en el que el nivel superior e inferior el investigador declara que propiedad le corresponde a cada uno. Los factores D y E representan al tipo de sustrato y los elementos traza, se determinó que el valor de 1.5 corresponde a CEDA y el de 0.5 a olote mientras que en los elementos traza, el valor

de 1.5 indica la adición de estos y el nivel inferior con valor 0.5 que no deben de adicionarse al medio de fermentación.

Utilizando el programa SYMBIOSIS Versión 5.0 e introduciendo los datos de las variables de interés con los cambios de unidad mencionados se obtuvo la Matriz PB para 8 experimentos que se muestra en Tabla 5.5.

EXP	A °C	B rpm	C % Levadura	D Sustrato	E Elementos Traza	F N/A	G N/A
1	32	100	25	1.5 CEDA	0.5 SIN	0	0
2	32	140	25	0.5 OLOTE	1.5 CON	0	0
3	32	140	75	0.5 OLOTE	0.5 SIN	0	0
4	28	140	75	1.5 CEDA	0.5 SIN	0	0
5	32	100	75	1.5 CEDA	1.5 CON	0	0
6	28	140	25	1.5 CEDA	1.5 CON	0	0
7	28	100	75	0.5 OLOTE	1.5 CON	0	0
8	28	100	25	0.5 OLOTE	0.5 CON	0	0

Tabla 4.5 Matriz Experimental PB para la determinación de parámetros del co-cultivo en procesos de fermentación de hidrolizados lignocelulósicos.

Nota: N/A= no aplica.

Se midieron 50 mL de hidrolizado respectivamente (OLOTE / CEDA), puestos en matraces esteriles de 250 mL. Los elementos traza empleados en concentración por litro fueron: 1g de extracto de levadura, 1.5 g de sulfato de magnesio, 5 g de urea y 1g de Tween 80. En condiciones asépticas fueron inoculados con el co-cultivo de acuerdo a la proporción de levadura indicada, los matraces son colocados en el baño, previamente caliente a la temperatura correspondiente, se dejan por 36 horas con agitación.y se toman alicuotas cada 4 horas. Los volúmenes de los inoculos para cada volumen de fermentación se describen en el apartado 6.1.

4.4.4 Fermentación en biorreactor BIOFLO III

Los estudios en biorreactores permiten la evaluación de los parámetros de fermentación que no se pueden controlar bien en incubadoras rotatorias y promover condiciones más similares a los empleados a escala industrial. Entre estos factores, la aireación se considera que es uno de los más importantes en la fermentación de xilosa por levaduras, ya que determina su crecimiento y la formación de producto.

Es conocido que *S. stipitis* es una levadura que produce etanol a partir de xilosa con un rendimiento elevado sin formación de xilitol en condiciones microaeróbicas y no requiere vitaminas. Para alcanzar condiciones de microaerobiosis es necesaria la transferencia de oxígeno al medio de fermentación durante el tiempo de proceso.

Del diseño de experimentos se consideraron los experimentos 3 y 5 que presentan el mayor rendimiento de etanol para ser escalados al biorreactor de 3L.

Se emplearon las ecuaciones de escalamiento y transferencia de oxígeno que se muestran en el Anexo E, para escalar las condiciones de aireación y agitación considerando un volumen de trabajo (V_t) de 2.75 L.

Con los datos obtenidos del biorreactor se hizo la simulación utilizando la programación no lineal para evaluar las condiciones de microaireación en el medio de fermentación y evaluar su efecto en el rendimiento de etanol.

5 RESULTADOS Y ANALÍS DE RESULTADOS

Los resultados se presentan conforme a la estrategia experimental descrita en el apartado 5.

5.1 Inoculo de co-cultivo

La primera etapa fue el mantenimiento de las especies y posteriormente el crecimiento.

Se emplearon 2×10^8 UFC como células totales entre *S. cerevisiae* y *S. stipitis*. De los resultados de la matriz PB se determinó la composición de co-cultivo, 25% *S.*

cerevisiae y un 75%. Para el cálculo del volumen del inóculo para cada cepa se hizo lo siguiente:

1. Se multiplicando 2×10^8 UFC por el volumen de fermentación (ml) para saber la cantidad total de células necesarias para co-cultivo.
2. La cantidad obtenida se multiplico por los porcentajes correspondiente a cada cepa.
3. Del total de células se dividió entra cada dato correspondiente al número de células de cada cepa y se obtuvo el volumen necesario del inóculo.

El volumen del sustrato de fermentación es igual a la diferencia del volumen de fermentación (volumen de trabajo) menos la suma de los volúmenes de cada cepa, en la Tabla 6.1 se presentan los inóculos de co-cultivo preparados para los diferentes volúmenes de trabajo utilizados.

Vol. Fermentación. (ml)	<i>S. cerevisiae</i> 25% UFC	Vol. inóculo ml	<i>P. stipitis</i> 75% UFC	Vol. inóculo ml	Vol. Cocultivo ml	Vol. Sustrato Fermentación ml
50	2.5×10^9	4	7.50×10^9	8	12	38
70	3.5×10^9	5	1.05×10^{10}	10	15	55
100	5.5×10^9	7	1.50×10^{10}	15	22	78
2750	1.13×10^9	161	3.38×10^{11}	338	499	2250

Tabla 5.1 Volúmenes de trabajo y determinación co-cultivo.

5.2 Diseño de Experimentos Plackett-Burman

De acuerdo a la Tabla 5.5 se realizó el diseño de experimentos, la concentración inicial de azúcares totales (glucosa y xilosa) de los hidrolizados de olote fue 69 g/L y de los hidrolizados de CEDA de 63 g/L. Se observó el consumo de azúcar y la producción de etanol durante 36 horas.

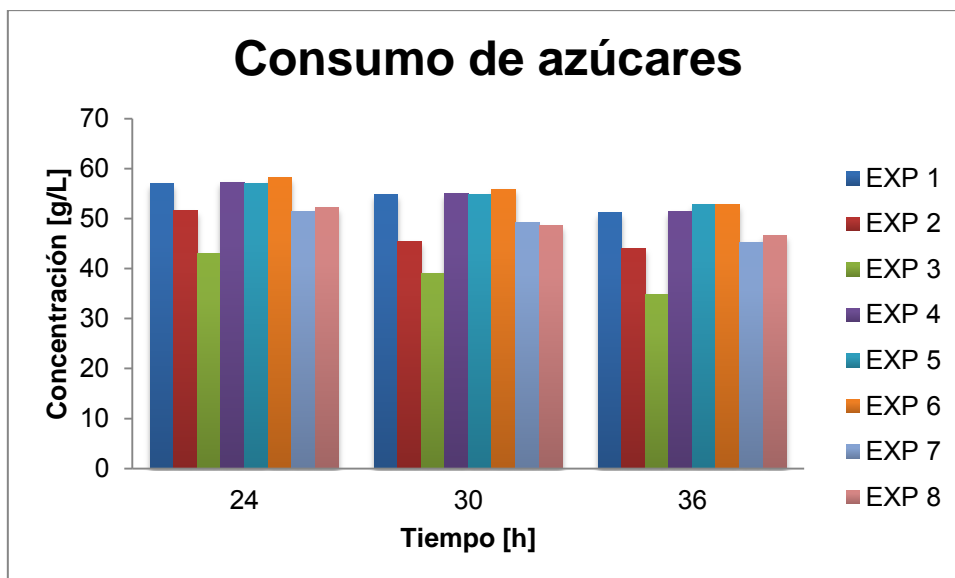


Figura 5.1 Cinética de consumo de azúcares de la matriz de experimentos PB.

Los experimentos 1, 4, 5 y 6 corresponden al hidrolizado de CEDA y los experimentos 2, 3, 7 y 8 hidrolizados de OLOTE. Todos los experimentos presentaron una velocidad de consumo de sustrato baja, en promedio los sustratos de CEDA tienen un consumo de 19% y los de olote del 38%.

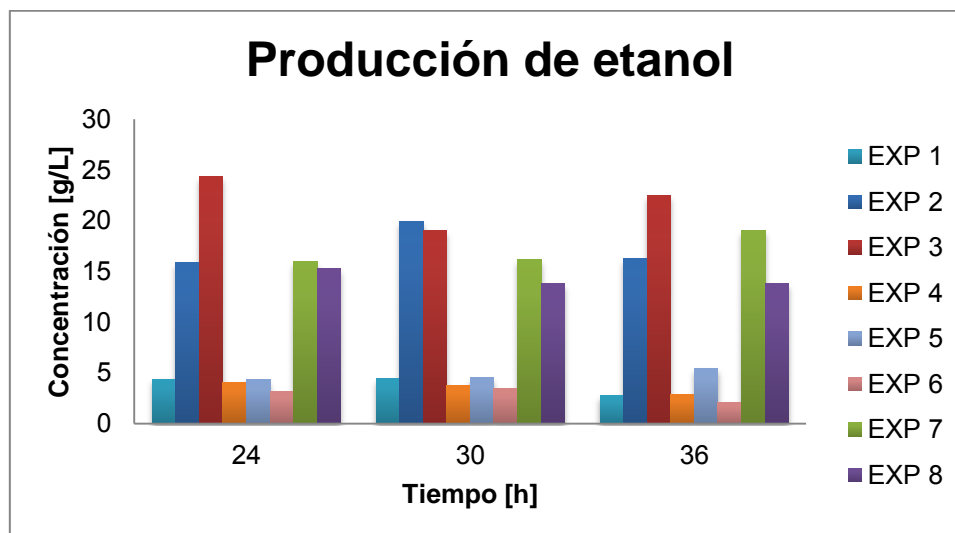


Figura 5.2 Cinética de producción de etanol de los experimentos de la matriz PB.

De acuerdo a la Figura 6.2 se observa que el sustrato de olote tiene mayores concentraciones de etanol, entre 16.26 y 22.45 g/L, mientras que el sustrato de CEDA tiene concentraciones de 2.13 y 5.45 g/L menores a las del sustrato de olote.

Para conocer la eficiencia de la fermentación con co-cultivo se calcularon los porcentajes de rendimientos teóricos de etanol de cada experimento. El cálculo del rendimiento teórico de una fermentación es el producto de la cantidad de azúcares fermentados por 0.46 cantidad de etanol que se obtiene de 1g de azúcar, la cantidad de etanol observada se divide entre el rendimiento teórico calculado y se multiplica por cien. Los rendimientos se presentan en la Figura 6.3.



Figura 5.3 Rendimientos teóricos de etanol de los experimentos de la matriz PB.

El mayor rendimiento de etanol utilizando el sustrato de olote es de las experimento 3 con el 71% donde las condiciones fueron: 32 °C a 140 rpm y sin la adición de elementos traza, mientras en el sustrato de CEDA fue el experimento 5 con el 19% de rendimiento con temperatura de 32 °C a 100 rpm y con adición de elementos traza.

Para evaluar el efecto unitario de los factores considerados se calculó la suma algebraica de las respuestas siguiendo los signos de la columna que corresponden a cada factor de acuerdo a la matriz PB (ver Tabla 5.2) y se dividió entre el número de experimentos.

En la Tabla 6.2 se muestra el efecto de cada factor, se observa que los factores con mayor efecto son la temperatura (1.123) y porcentaje de levadura en el co-cultivo (1.867).

	FACTOR	EFEECTO
A	Temperatura	1.123
B	Agitación	0.333
C	% de levadura	1.867
D	Sustrato	-7.293
E	Elementos traza	0.122
F	-	0.997
G	-	-0.353

Tabla 5.2 Efecto de los parámetros de la matriz PB

Del efecto de los factores F y G, debió ser valor igual a cero, esto no es así debido al error experimental igual a 0.748 obtenido del mismo programa; los factores mencionados al no tener un valor de interés en el diseño son despreciados.

Los resultados anteriores se resumen en forma de un modelo predictor que se obtuvo a partir del programa SYMBIOSIS versión, el modelo obtenido fue:

$$Y_{\text{calc.}} = 10.608 + (1.123)A + (0.333)B + (1.867)C - (7.293)D + (0.122)E$$

El término constante 10.608, es el promedio de las 8 respuestas (rendimientos de los experimentos), que se presentan en la siguiente tabla.

EXPERIMENTO	RENDIMIENTO (g/L)
1	2.76
2	16.26
3	22.45
4	2.92
5	5.45
6	2.13
7	19.08
8	13.81

Tabla 5.3 Resultados experimentales de la matriz PB.

Con los resultados experimentales se calculó el pronóstico con la ecuación del modelo obtenido y se obtuvo la diferencia, en la tabla siguiente se muestran los resultados obtenidos.

RESULTADO EXPERIMENTAL	PRONÓSTICO	DIFERENCIA
2.76	2.115	-0.645
16.26	17.61	1.35
22.45	21.2	-1.35
2.92	4.27	1.35
5.45	6.095	0.645
2.13	0.780	-1.35
19.08	18.435	-0.645
13.81	14.455	0.645

Tabla 5.4 Comparación del modelo.

Con el modelo obtenido y el pronóstico calculado con el programa SYMBIOSIS 5 se graficaron las superficies de respuesta presentadas en la Figura 6.4.

Para graficar las superficies de respuesta se hicieron 4 combinaciones que permitieran hacer un análisis del efecto de los factores en la producción de etanol, se hicieron las combinaciones de tal forma que coincidieran el tipo de sustrato y el porcentaje de levadura. En la Tabla 6.5 se muestran las combinaciones.

COMBINACIÓN	EXP	Temperatura °C	Agitación rpm	% Levadura	Tipo de sustrato	Els. traza	PRONÓSTICO
1	1	32	100	25	CEDA	-	2.115
	6	28	140	25	CEDA	+	0.780
2	2	32	240	25	OLOTE	+	17.61
	8	28	100	25	OLOTE	-	14.455
3	3	32	140	75	OLOTE	-	21.2
	7	28	100	75	OLOTE	+	18.436
4	4	28	140	75	CEDA	-	4.23
	5	32	100	75	CEDA	+	6.095

Tabla 5.5 Combinaciones de las superficies de respuesta.

En la Tabla 6.5 el signo positivo indica la adición de elementos traza a los experimentos y el signo negativo que no se les adicionaron.

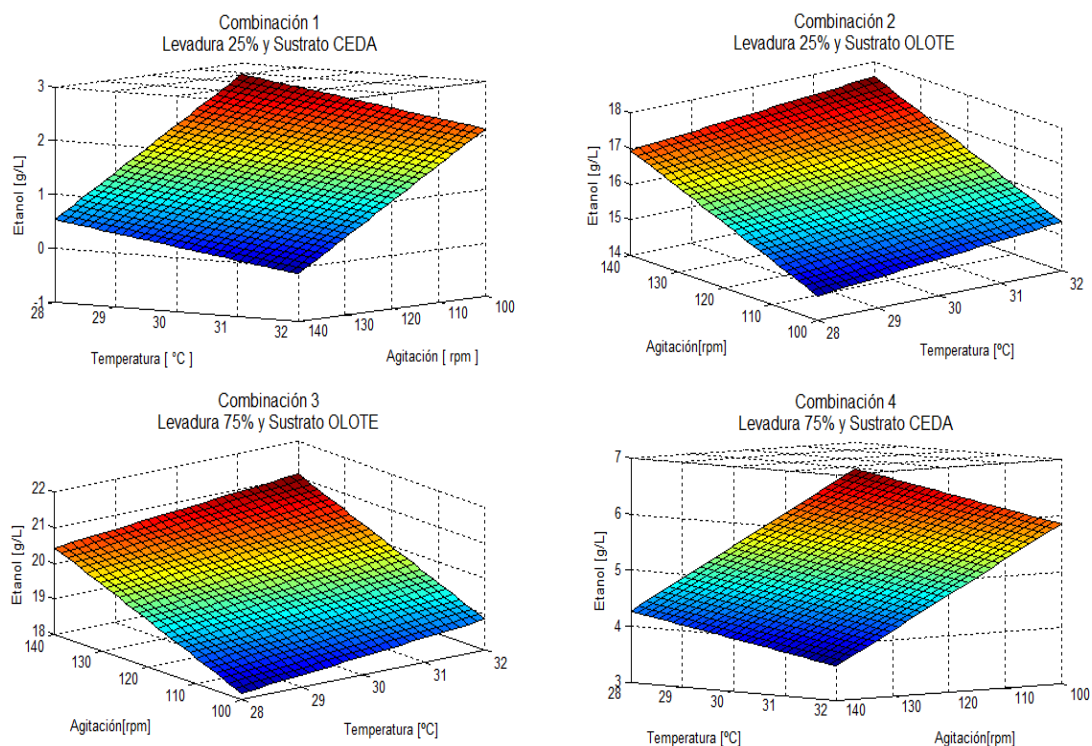


Figura 5.4 Superficies de respuesta de la matriz de experimentos PB

En la Figura 6.4 los puntos color rojo indican las concentraciones más altas de etanol, por lo que se ha logrado identificar tres factores importantes: temperatura, agitación y porcentaje de cada cepa en el co-cultivo.

Las condiciones del experimento que favorecieron la producción de etanol utilizando el sustrato de olote con la combinación de co-cultivo es 75% *S. stipitis* y 25% *S. cerevisiae* a 32 °C y 140 rpm, de igual manera para los hidrolizados de CEDA sin embargo la agitación fue de 100 rpm en vez de 140 rpm.

5.2.1 Experimentos 3 y 5

Los experimentos 3 y 5 fueron probados volúmenes de 70 ml de fermentación en matraces de 250 ml con mayores concentraciones de azúcar; 124 g/L en hidrolizados de olote y 113.4 g/L en hidrolizados de CEDA, bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y porcentaje de levadura, el volumen del sustrato de trabajo fue de 55 ml y el volumen de co-cultivo de 15 ml. En la Figuras 6.5 se muestran las cinéticas de consumo de azúcar y producción de etanol.

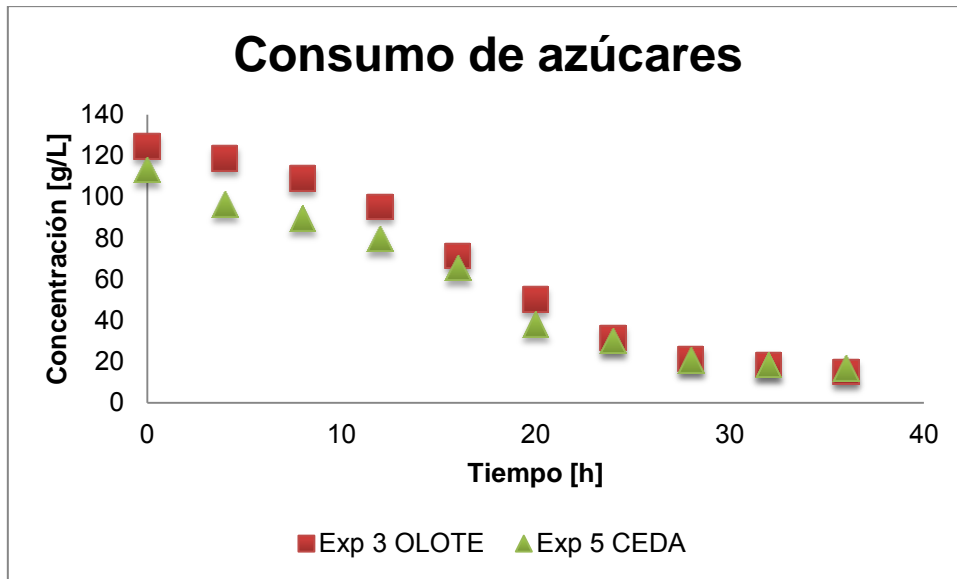


Figura 5.5 Cinética de consumo de azúcar experimentos 3 y 5.

En la Figura 6.5 se observa que los experimentos presentan una cinética semejante, ambos con un mayor consumo de azúcares en comparación con los primeros de la matriz PB. El consumo final de azucares oscila entre 14 y 16 g/L que representa un consumo de azucares del 87% en hidrolizados de olote y el 85% en hidrolizados de CEDA.

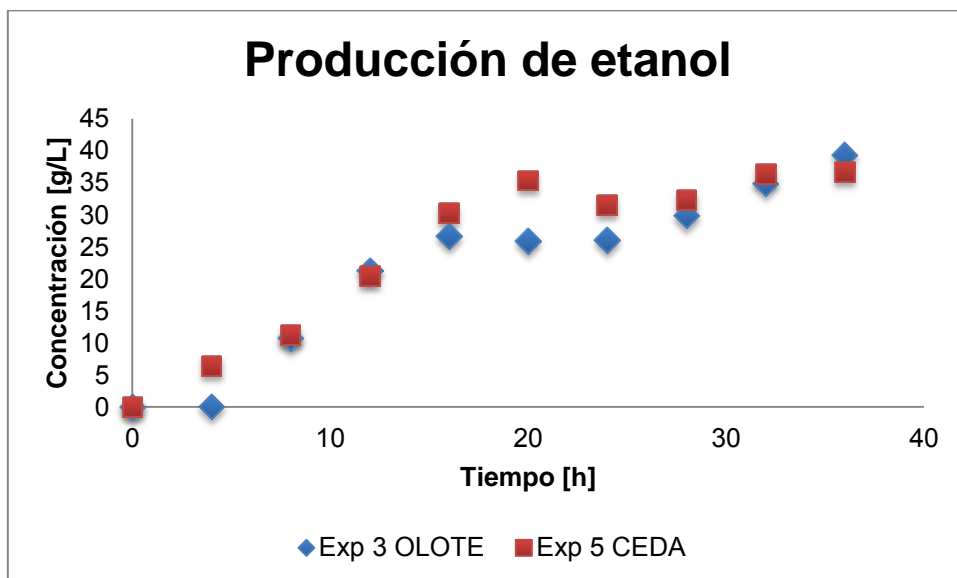


Figura 5.6 Cinética de producción de etanol experimentos 3 y 5.

En la Figura 6.6 se observa que con el consumo de azúcares se obtuvieron concentraciones de etanol de 39.4 y 36.74 g/L a partir de sustrato de olote y CEDA respectivamente, con rendimientos respecto al teórico de entre 68 y 70 %.

En la fermentación se generó como subproducto xilitol, es un alcohol azúcar de cinco carbonos, se obtiene por la reducción de xilosa.

El xilitol es un producto de valor agregado que se utiliza como sustituto de la sacarosa en los alimentos para diabéticos.

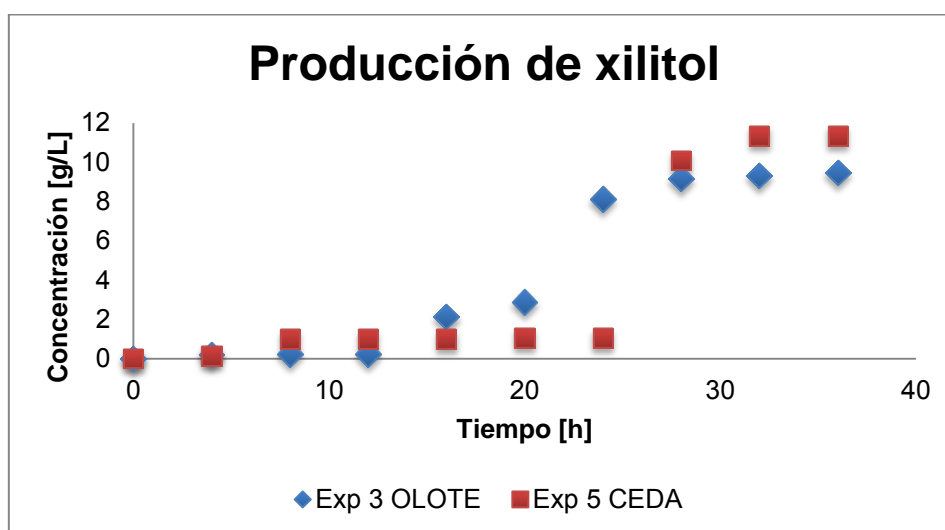


Figura 5.7 Cinética de producción de xilitol experimento 3 y 5.

En la Figura 6.7 se observa que las concentraciones de xilitol fueron de 9.46 y 11.34 g/L del sustrato de olote y CEDA respectivamente, ya que la xilosa está siendo utilizada en la producción de xilitol, debido a las condiciones de agitación en el medio.

Las concentraciones de etanol son menores al esperado de 51 y 57 g/L de acuerdo al teórico, debido a la formación de xilitol.

5.2.2 Fermentación en biorreactor BIOFLO III

Se empleó un biorreactor de tres litros con un volumen de trabajo de 2.75 litros, el volumen del sustrato fue de 2.25 L y de co-cultivo 0.25 L.

Para escalar las condiciones de matraz a biorreactor se consideraron las dimensiones del matraz, las condiciones de cada experimento y los parámetros cinéticos de cada

cepa, así como las dimensiones de biorreactor. En la Tabla 6.6 se muestran los datos del matraz y del biorreactor.

DATOS	UNIDADES	MATRAZ	BIORREACTOR
Diámetro del tanque	Dt m	0.067	0.21
Altura del tanque	Ht m	0.01	0.26
Potencia del motor	Pg $\text{Kg m}^2/\text{s}^3$	0.1238	6.82
Volumen del reactor	Vl m^3	7×10^{-5}	2.5×10^{-3}

Tabla 5.6 Dimensiones de matraz y biorreactor.

El volumen de trabajo de biorreactor es aproximadamente 39 veces más que el volumen del matraz.

PARAMETRO	UNIDADES	DATO
Biomasa final	Xf g/L	4.22
Concentración crítica	C* mmolO ₂ /L	0.228
Concentración en la fase líquida	Cl mmolO ₂ /L	0.03
Velocidad de crecimiento	μ h ⁻¹	0.29
Rendimiento biomasa/oxígeno	Y _{X/O} g-cel/mmolO ₂	0.0064

Tabla 5.7 Parámetros cinéticos de co-cultivo. Tomado de Arriaga (2000)

Los datos de la Tabla 6.7 corresponden a datos de la cepa de *S. cerevisiae* para el dimensionamiento ya que es una levadura frecuentemente utilizada y estudiada en los procesos de fermentación por sus altos rendimientos, por otra parte en presencia de azúcares asimilables superiores a 0.16 g/L produce invariablemente alcohol y aún en presencia de oxígeno.

Con los datos mencionados y las ecuaciones del Anexo E, se calcularon:

1. Tasa de consumo de oxígeno (OUR)
2. Tasa de demanda de oxígeno (OTR)
3. Coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{la} , en el matraz).

En la tabla siguiente se muestran los resultados obtenidos para la agitación de 100 y 140 rpm correspondientes a los experimentos 5 y 3.

AGITACIÓN EN MATRAZ (rpm)		100	140
Flujo volumétrico máximo de aire	$Q_{a \max}$ m ³ /s	0.040	0.079
Velocidad seccional	V_s m/s	11.369	22.283
Coefficiente de transferencia de oxígeno	K_{La} h ⁻¹	6282.962	8796.147
Tasa de consumo de oxígeno	OUR mmolO ₂ /g*h	191.219	191.219
Tasa de transferencia de oxígeno	OTR mmolO ₂ /g*h	294.793	412.710

Tabla 5.8 Parámetros de transferencia de oxígeno en matraz.

En la Tabla 6.8 se observa que en ambos casos OTR es mayor a OUR lo cual indica que a esas agitaciones se cubre la demanda de oxígeno del co-cultivo, y que no habría limitación por oxígeno.

Con los valores de K_{La} en matraz se hicieron los despejes de las ecuaciones del apartado 2.6 para calcular la agitación de acuerdo a las dimensiones del reactor y así escalar las condiciones de transferencia de oxígeno. En la Tabla 6.9 se muestran los resultados obtenidos para el biorreactor.

K_{La}		6282.962	8796.147
		Para	Para
		100 rpm	140 rpm
Velocidad seccional	V_s m/s	8.67393	17.0009
Flujo volumétrico máximo de aire	$Q_{a \max}$ m ³ /s	0.08243	0.16157
Velocidad de agitación	$N_{a \max}$ rpm	221.2407	309.7369

Tabla 5.9 Parámetros de transferencia de oxígeno en biorreactor.

Los valores de la velocidad de agitación fueron redondeados a 221 y 310 rpm. Los experimentos 3 y 5 se probaron en el biorreactor con las nuevas condiciones de agitación en fermentación por lotes.

Las concentraciones iniciales de azúcar de los hidrolizados de olote y CEDA fueron de 92 y 75 g/L respectivamente.

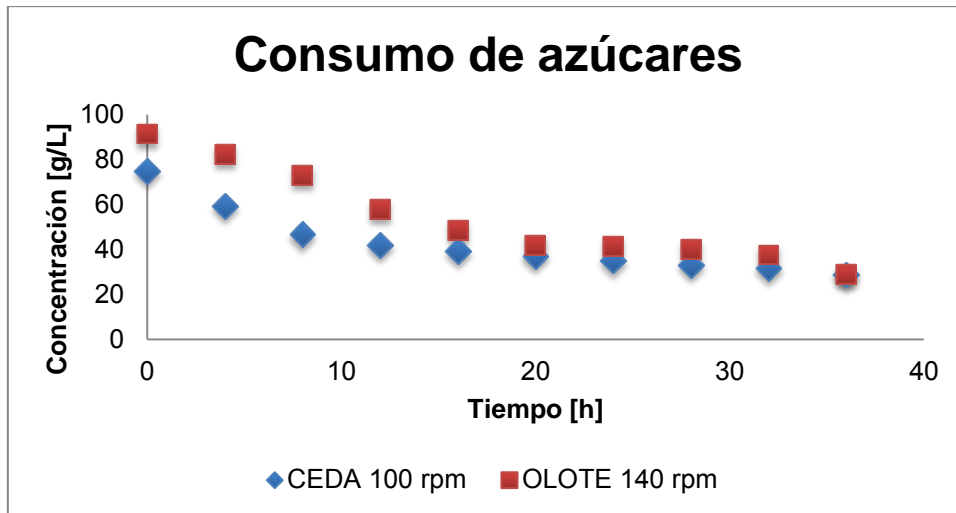


Figura 5.8 Cinética de consumo de azúcares totales en biorreactor con agitación de 100 y 140 rpm.

En la Figura 6.8 se observa que a la hora 16 ambos sustratos se consumieron entre 47 y 48% de azúcares, de la hora 20 a la 32 la velocidad de consumo se mantuvo constante y de la hora 32 a la 36 se presentó un ligero aumento de consumo de azucares teniendo un rendimiento final entre 63 y 70 %.

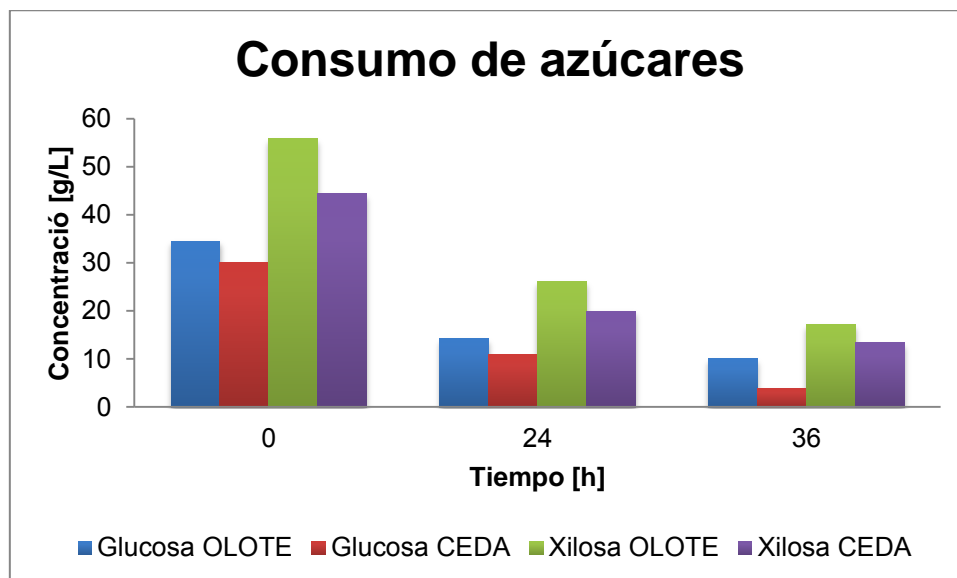


Figura 5.9 Cinética de consumo de azúcares en biorreactor.

Los hidrolizados de olote y CEDA tienen una mayor proporción de xilosa que de glucosa, en la Figura 6.9 se observa que en ambos sustrato hay un mayor consumo de glucosa que de xilosa, debido a que ambas cepas consumen glucosa, sin embargo S.

stipitis es la única que puede consumir xilosa por ello que su consumo es lento y en menor cantidad y tenemos una cantidad de azúcar residual mayor a la de glucosa.

En la Figura 6.10 se observa que de la hora 32 a la 36 la concentración de etanol aumenta entre 2 y 4 g/L en sustratos de olote y CEDA respectivamente, por lo que sería necesario más tiempo de fermentación, sin embargo no sería rentable en el proceso de fermentación ya que no hay un aumento significativo en los rendimientos de etanol.

Por otra parte los bajos rendimientos de etanol que se producen son debido a que la xilosa está siendo utilizada en la producción de xilitol por *S. stipitis*, subproducto que se obtuvo de la fermentación como se muestra en la Figura 6.10.

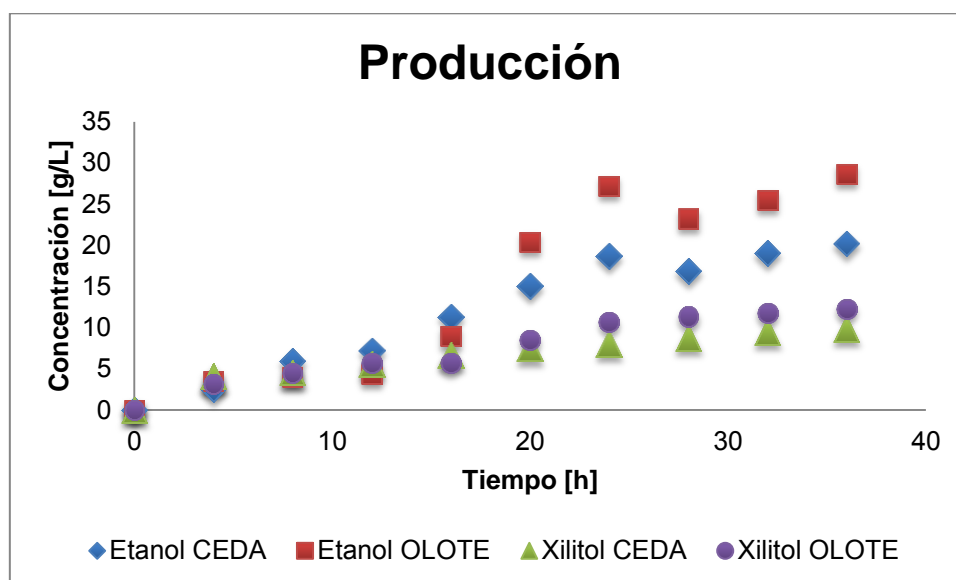


Figura 5.10 Cinética de producción de etanol en biorreactor.

En la Figura 6.10 se aprecian variaciones en la velocidad de producción de etanol de olote y CEDA, ambos a las 24 horas alcanzan concentraciones de 27.24 y 18.65 g/L de etanol, de la hora 24 a la 32 se observa una disminución en el etanol.

La bibliografía coincide en afirmar que el etanol en altas concentraciones inhibe el crecimiento y la fermentación en *S. cerevisiae* de forma no competitiva, es decir, el etanol no afecta la afinidad por el sustrato.

Aunque *S. cerevisiae* es capaz de consumir etanol, no representa un efecto contrario; como se observa en la Figura 6.10 las concentraciones finales de etanol son de 28.67

y 20.19 g/L de hidrolizados de olote y CEDA con una eficiencia del 68 y 78 % respectivamente.

Se observó que la fermentación en reactor mejoro los rendimientos de etanol en un 8% en los hidrolizados de CEDA con las mismas condiciones de operación que las de matraz, mientras que con los hidrolizados de olote se mantuvieron semejantes los rendimiento de etanol en biorreactor y matraz con las mismas condiciones del proceso de fermentación.

El aumento de los rendimientos de etanol en biorreactor se debe a que hay mejor interacción de la levadura con el hidrolizado por la agitación y mejor transferencia de oxígeno en el medio de fermentación.

Por otra parte las condiciones de aireación favorecieron la producción de xilitol, esto es una desventaja en el proceso de producción de etanol. También se observó que la concentración final de xilitol en el biorreactor fue de 12.25 y 9.78 g/L de hidrolizados de olote y CEDA respectivamente.

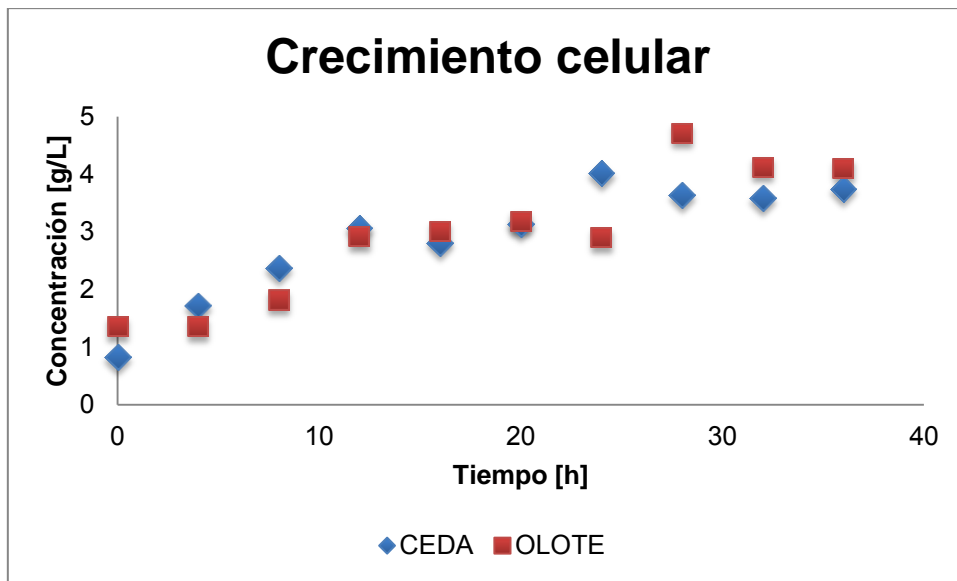


Figura 5.11 Cinética de biomasa en biorreactor.

Con las condiciones de fermentación en biorreactor se observó que la biomasa final tuvo concentraciones de 4.11 y 3.75 g/L de sustrato de olote y CEDA respectivamente que están cercanas al valor de 4.22 g/L considerado como dato para los cálculos de K_{La} al escalar las condiciones de aireación de matraz al biorreactor.

A estas condiciones de microaireación la levadura esta utilizando la mayor cantidad de azucares en la producción de etanol y xilitol y no para su crecimiento.

5.2.3 Simulación del proceso

Para evaluar el efecto de la microaireación en el proceso de fermentación se desarrolló el modelo matemático que describe el proceso (apartado 2.4.3), se utilizarán las ecuaciones de balance para sustrato, biomasa, producción de etanol y consumo de oxígeno, la simulación se realizó en el programa MatLab Versión 7.5.

Los criterios que se consideraron para desarrollar del modelo matemático que describa en forma sencilla el proceso fueron los siguientes:

- Las dos cepas conviven en las mismas condiciones, no hay variaciones de temperatura.
- Los dos microorganismo no interaccionan entre sí.
- Cada especie es altamente especifica en cuanto a la fuente de carbono a utilizar por lo que no hay competencia por los sustratos (Para hacer sencillo el modelo matemático se consideró que *S. stipitis* fermenta solo una azúcar).
- La ruta metabólica de *S. cerevisiae* es glucosa a etanol.
- *S. stipitis* metaboliza xilosa a etanol en condiciones de O_2 por lo que requiere aireación (No se considera el efecto de la formación de xilitol ya que es de interés la producción de etanol).
- Hay influencia en la producción de etanol por la concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación.
- Cada especie maximiza su tasa de crecimiento de forma individual en los sustratos disponibles.
- La cantidad de producto total es la suma de las tasas individuales de crecimiento de cada especie.

Los datos cinéticos utilizados en la simulación corresponden a los resultados de la fermentación en el biorreactor de cada uno de los hidrolizados, en la Tabla 6.10 se muestran los parámetros cinéticos.

PARAMETRO			OLOTE		CEDA	
			S. <i>cerevisiae</i>	S. <i>stipitis</i>	S. <i>cerevisiae</i>	S. <i>stipitis</i>
μ_x	Velocidad máxima de crecimiento	h^{-1}	0.137	0.301	0.14	0.31
μ_p	Velocidad máxima de producción	g/Lh	12.97	10.8	13.813	11.691
μ_o	Velocidad máxima de consumo de oxígeno	g/Lh	0.29	0.29	0.28	0.28
k_s	Coefficiente de afinidad al sustrato	g/L	16.14	0.05	12.093	0.994
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa a partir de sustrato	g-biomasa/g-sustrato	0.11	0.07	0.051	0.076
$Y_{p/x}$	Rendimiento de producto a partir de biomasa	g-producto/g-biomasa	10.619	10.61	8.59	12.20
$Y_{p/s}$	Rendimiento de producto a partir de sustrato	g-producto/g-sustrato	0.643	0.741	0.438	0.923
$Y_{p/o}$	Rendimiento de producto a partir del consumo de O_2	g-producto/g-oxígeno consumido	1.194	1.19	0.841	0.841

Tabla 5.10 Datos cinéticos de fermentación en biorreactor para cada hidrolizado.

En las siguientes figuras se observa el comportamiento de la fermentación de cada uno de los sustratos de acuerdo al modelo matemático.

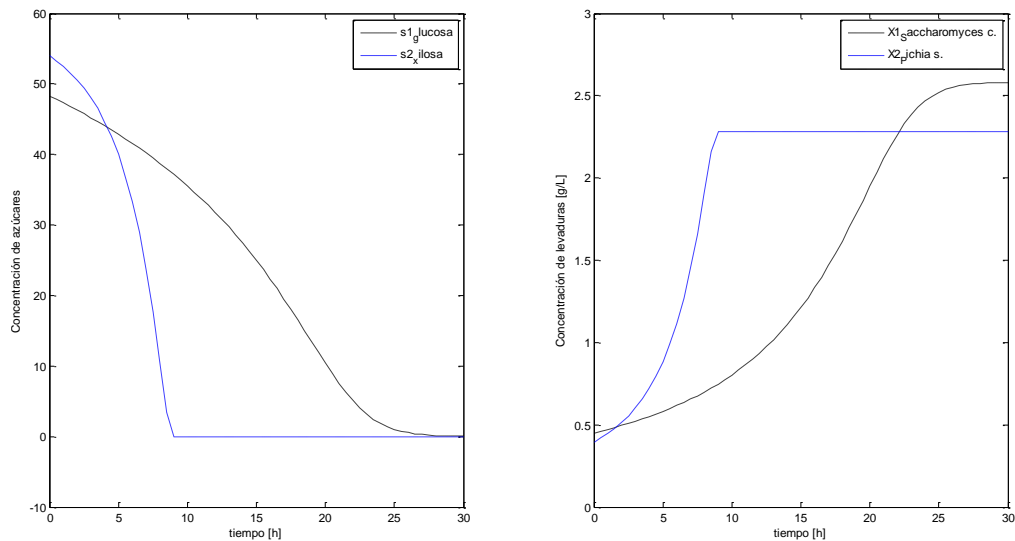


Figura 5.12 Simulación de cinéticas de consumo de azúcar y crecimiento de biomasa en hidrolizados de olote.

En la Figura 6.12 se observa que el consumo total de azúcares de hidrolizados de olate está entre 27 y 28 horas que es un tiempo menor sin presencia de azúcares residuales, las concentraciones de biomasa final son de 2.25 y 2.5 g/L de *S. cerevisiae* y *S. stipitis* respectivamente, son datos cercanos a los de la fermentación en biorreactor.

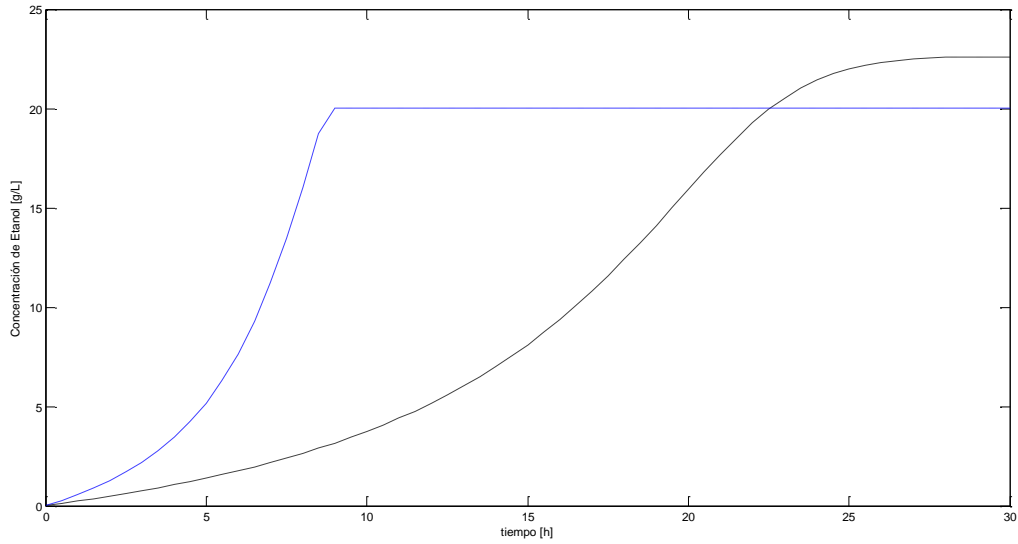


Figura 5.13 Cinética de producción de etanol de cada una de las cepas en hidrolizados de olate.

En la Figura 6.13 se observa que las concentraciones de etanol por cada una de las especies está entre 20 y 22 g/L, que se asemejan a las de las obtenidas en fermentación en biorreactor.

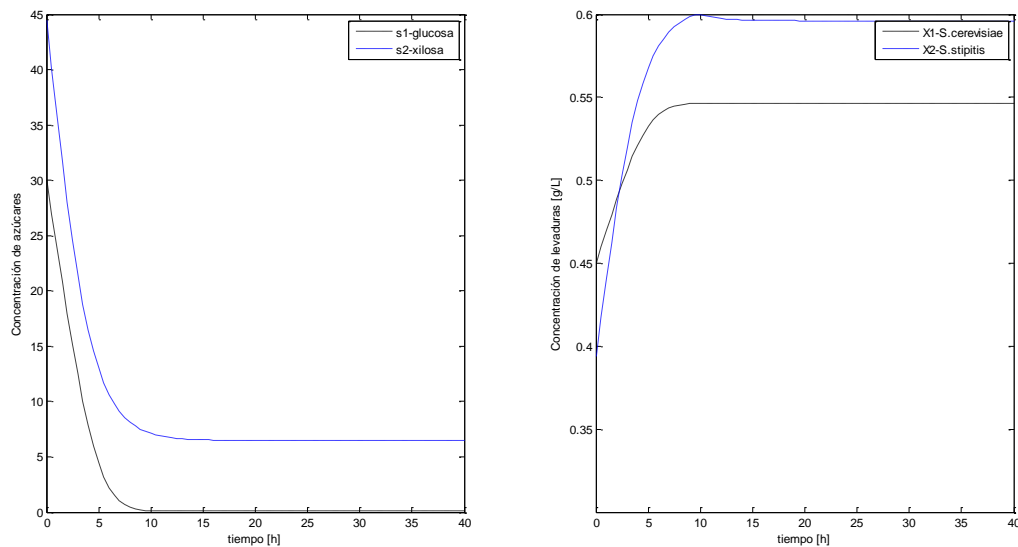


Figura 5.14 Simulación de cinéticas de consumo de azúcar y crecimiento de biomasa en hidrolizados de CEDA.

En la Figura 6.15 se observa que en la simulación hay un consumo mucho más rápido en los hidrolizados de CEDA en comparación con los hidrolizados de olote, con presencia de xilosa residual. La biomasa final fue menor a la de los hidrolizados de olote con concentraciones de entre 0.55 y 0.6 g/L de *S. stipitis* y *S. cerevisiae* respectivamente.

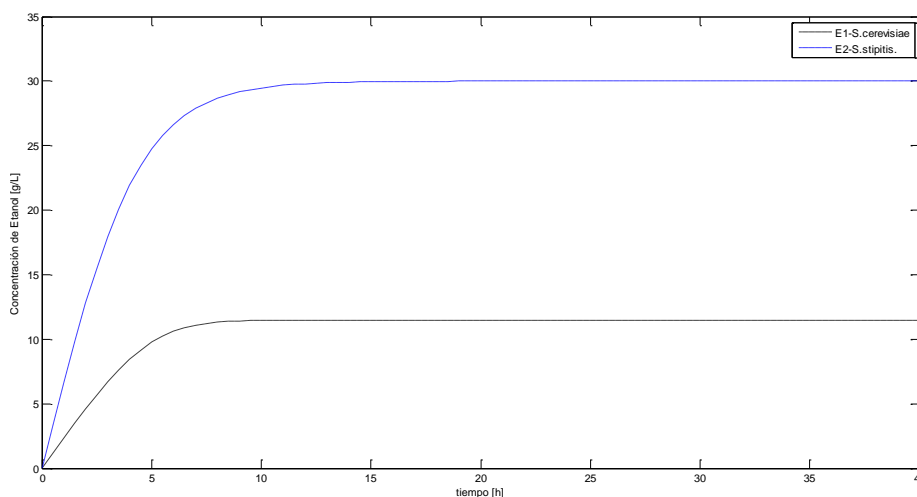


Figura 5.15 Cinética de producción de etanol de cada una de las cepas en hidrolizados de CEDA.

El proceso de fermentación con los hidrolizados de CEDA requiere menos tiempo que los hidrolizados de olote para alcanzar concentraciones de 20 y 10 g/L de etanol por *S. stipitis* y *S. cerevisiae* respectivamente con una concentración final de 30 g/L de etanol.

Las simulaciones del proceso de fermentación utilizando los dos tipos de hidrolizado presentan rendimientos de etanol respecto al teórico del 80%.

Se evaluaron las condiciones de microareación de la fermentación con co-cultivo para incrementar los rendimientos de etanol, se utilizó el Toolbox de Optimización es una colección de funciones que amplía la capacidad de computación numérica del programa MatLab. Este conjunto de funciones logran minimizar o maximizar funciones no lineales generales, donde hay la búsqueda del mínimo o máximo de una función,

denominada comúnmente '*función objetivo*', este Toolbox también incluye funciones para la resolución de ecuaciones no lineales.

Una de las funciones de Toolbox de Optimización es *fmincon*, el propósito de esta función es encontrar el mínimo que devuelve una función de varias variables no lineal y sujeta a una serie de restricciones. Normalmente se conoce este tipo de problemas como optimización no lineal con restricciones o programación no lineal.

Se utilizó la función *fmincon* para encontrar las condiciones de microareación y mejorar la cantidad de etanol a partir de cada especie utilizada, considerando la concentración de cada azúcar (glucosa y xilosa) de acuerdo al tipo de hidrolizado, la cantidad inicial y final de biomasa para cada especie, la cantidad mínima y máxima de los rendimientos de etanol por cada especie, así como la cantidad mínima y máxima de flujo de aire requerido por cada especie.

La función objetivo y las restricciones consideradas fueron:

$$\begin{aligned} & \text{Max} (C_{\text{etanol-S.stipitis}} + C_{\text{etanol-S.cerevisiae}}) \\ & 0.39 \leq X_{S.stipitis} \leq 4.1 \quad , \quad 0.45 \leq X_{S.cerevisiae} \leq 4.1 \\ & 0.45 \leq C_{\text{etanol-stipitis}} \leq 0.643 \quad , \quad 0.54 \leq C_{\text{etanol-cerevisiae}} \leq 0.741 \\ & 0.003 \leq Cl_{S.stipitis} \leq 0.2 \quad , \quad 0.004 \leq Cl_{S.cerevisiae} \leq 0.2 \end{aligned}$$

Como condición inicial en el proceso de fermentación se consideró una concentración 0.2 g/L de oxígeno disuelto en el medio (Arriaga, 2000).

Los datos presentados se introdujeron en el programa con la función *fmincon* para encontrar las condiciones de aireación que aumenten la producción de etanol por cada una de las cepas utilizadas en el co-cultivo, los resultados obtenidos de la concentración de oxígeno se muestran en la Tabla 6.11, donde se comparan las concentraciones de etanol obtenidas con cada concentración de oxígeno. Para ambos tipos de hidrolizados se obtuvieron valores iguales de concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación.

CONCENTRACIÓN DE O ₂	S. stipitis	S. cerevisiae
	4.94	4.94
3.92	3.92	
1.57	1.57	
0.0041	0.0041	

Tabla 5.11 Valores de O₂ disueltos en el medio de fermentación para maximizar la producción de etanol.

Los datos de concentración de oxígeno de la Tabla 6.11 se introdujeron en el modelo matemático, para evaluar su efecto en la producción de etanol, en la Tabla 6.12 se muestran los resultados de las concentraciones de etanol producidos por cada especie a partir de la concentración de azúcares de cada hidrolizado.

CONCENTRACIÓN DE O ₂	ETANOL OLOTE		ETANOL CEDA	
	S. <i>cerevisiae</i>	S. <i>stipitis</i>	S. <i>cerevisiae</i>	S. <i>stipitis</i>
g/L				
0.2	22	20	11	30
4.94	24	22	12	31
3.92	24	22	12	31
1.57	26	22	14	32
0.0041	20	17	9	26

Tabla 5.12 Concentraciones de etanol a partir de la concentración de O₂.

En la Tabla 6.12, se puede observar que para los valores de 4.94 y 3.92 se incrementa la concentración de etanol con hidrolizados de olote en 2 unidades, esto con respecto a las condiciones iniciales (0.2 g/L de oxígeno), mientras con CEDA solo hay diferencia de una unidad. Sin embargo la concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación que puede incrementar la concentración de etanol en 6 g/L en los dos tipos de hidrolizados es de 1.57 g/L de oxígeno.

6 CONCLUSIONES

El co-cultivo de *Sacharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis* es una opción para el mayor aprovechamiento de las azúcares presentes en los hidrolizados de CEDA y olote para la producción de etanol ya que alcanzan rendimientos teóricos de etanol entre 68 y 78%.

Parámetros como la temperatura, agitación, tipo de sustrato, elementos traza y el porcentaje de levadura en el inóculo de fermentación, juegan un papel importante en los rendimientos de etanol con el uso de co-cultivo en materiales lignocelulósicos.

De acuerdo al diseño experimental los parámetros que mayor efecto tienen en la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos con co-cultivo son temperatura, porcentaje de cada cepa en el inóculo de fermentación y el tipo de hidrolizado.

La combinación del co-cultivo de 25 % *S. cerevisiae* y 75% *S. stipitis* tiene mejores rendimientos de etanol en biorreactor, de 68 y 78 % fermentando hidrolizado de olote de maíz y CEDA respectivamente.

La aireación promueve la producción de etanol en co-cultivo ya que la cepa de *S. stipitis* requiere condiciones adecuadas de microaireación para la formación de etanol sin presencia de xilitol.

Los rendimientos de etanol se ven afectados por la transferencia de oxígeno, ya que la demanda de oxígeno está limitada por las especies del co-cultivo, la agitación y la concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación.

La agitación y aireación en matraz y biorreactor permitió la formación de xilitol en pequeñas cantidades.

El modelo que se desarrolló para el proceso de fermentación de los hidrolizados de olote y CEDA con los parámetros calculados de acuerdo a la fermentación en biorreactor, fue capaz de describir el fenómeno que se lleva a cabo en la fermentación.

La función *fmincon* permitió encontrar el punto óptimo para la producción de etanol a partir de la concentración de 1.57 g/L de oxígeno disuelto en el medio de fermentación para cada tipo de hidrolizado utilizado, con el que se podría incrementar la concentración de etanol en 6 g/L.

7 PERSPECTIVAS

El pH podría afectar el rendimiento de las cepas utilizadas por lo que sería conveniente llevar un estudio de este factor en la fermentación en co-cultivo.

Llevar acabo los experimentos de fermentación en biorreactor para cada tipo de sustrato con la concentración de 1.57 g/L de oxígeno disuelto en el medio de fermentación.

Existe una gran variedad de microorganismos capaces de producir etanol a partir de la diferentes azúcares presentes en los residuos lignocelulósicos, por lo que sería conveniente probar otras combinaciones de cocultivo que puedan tener mayor rendimientos de etanol a partir de la fermentación de hidrolizados de olote y CEDA.

8 GLOSARIO

ATP	Adenosín trifosfato
Cl	Concentración de O ₂ disuelto en el medio de fermentación
K _c	Coeficiente de consumo de O ₂
K _{dp}	Coeficiente de degradación de producto
K _{is}	Coeficiente de inhibición por sustrato
K _s	Coeficiente de afinidad al sustrato
NADH	Nicotinamida adenina dicucleótido
NADHP	Nicotinamida adenina dicucleótido fosfato
P	Producto
X	Biomasa

9 BIBLIOGRAFÍA

A.W. Khan y William D. Murray (1982). Single Step Conversion Of Cellulose To Ethanol By A Mesophilic Coculture, Division of Biological Sciences, Ottawa, Ontario, Canada. *Biotechnology Letters* Vol.4 (3): 177-180

Ahlam Abdul (2005). Microbiological Conversion of Waste Fruits and Vegetables into Ethanol, Department of Zoology University of the Punjab, Lahore.

Akekasit Eiadpum, Savitree Limtong, y Muenduen Phisalaphong (2012) High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Thailand¹ and Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 114 (3):325-329, www.elsevier.com/locate/jbiosc

Akira Seto y Yu Saito & Mayumi Matsushige (2006). Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Japan. *Microbiol Biotechnol* (73):915–921

Akpa, Jackson Gunorubon (2012). Modeling of a bioreactor for the fermentation of palmwine by *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) and *Lactobacillus* (bacteria), Department of Chemical/Petrochemical Engineering, Rivers State University of Science and Technology, Port-Harcourt, Rivers State, Nigeria. *American Journal of Scientific and Industrial Research* © 2012, Science Hub, <http://www.scihub.org/AJSIR> ISSN: 2153-649X, doi:10.5251/ajsir.2012.3.4.231.240

Altintas, Mehmet M, Eddy Christina K., Min Zhang, James D. McMillan, Kompala Dhinakar S. (2006) Kinetic Modeling to Optimize Pentose Fermentation in *Zymomonas mobilis* Department of Chemical Engineering, University of Colorado, Boulder, Colorado, Canada. Published online 28 March 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20843

Abouzied, Mohamed and Reddy (1987). Fermentation of starch to ethanol by a complementary mixture of an Amylolytic yeast and *saccharomyces cerevisiae*. Department of Microbiology and Public Health, Michigan State. *Biotechnology Letters* Vol 9 (1): 59-62

Amicarelli A. N ,Di Sciascio F. A, Álvarez H. D. y Ortiz O. (2006). Estimación De Biomasa En Un Proceso Batch: Aplicación A La Producción De δ - Endotoxinas De Bt, Escuela de Procesos y Energía. Facultad de Minas. Grupo de Automática, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos, IACCHE - Interamerican Confederation of Chemical Engineering, XXII IACChE (CIIQ) 2006 / V CAIQ

Anuj Kumar Chandel, Gajula Chandrasekhar, Konakalla Radhika, Rudravaram Ravinder y Pogaku Ravindra (2011). Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions, School of Engineering of Lorena, University of Sao Paulo, Brazil. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 6(1):008-020

Arellano Plaza, HerreraLópez, Díaz Montaña, Moran, y Ramírez Córdova (2007). Unstructured Kinetic Model for Tequila Batch Fermentation, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara Jalisco, México. *International Journal Of Mathematics And Computers In Simulation*, Issue 1, Vol. 1

Arisra Rodmui, Jirasak Kongkiattikajorn y Yuwapin Dandusitapun (2008). Optimization of Agitation Conditions for Maximum Ethanol Production by Coculture, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42, 285 – 293

Aros Nelson, Cifuentes Marcelo y Mardones Javier (2011) Modelación, simulación y control de procesos de fermentación. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, Vol. 19 (2): 210 218

Arriaga Diana María (2000) Estudio Técnico Económico para la Producción de Trehalosa por vía Fermentativa, Universidad Iberoamerica México, Distrito Federal

BABETHANOL New feedstock and innovative transformation process for a more sustainable development and production of lignocellulosic ethanol. 2010. Disponible en: <http://babethanol.com/>

Barrera Martínez Liliana del Carmen (2010). Modelación Metabólica De Compuestos De Reserva De *Saccharomyces cerevisiae*, Tesis doctoral, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México.

Button D. K.(1985). Kinetics of Nutrient-Limited Transport and Microbial Growth, Institute of Marine Science, University of Alaska, Fairbanks, Alaska. *Microbiological Reviews*, Vol. 49 (3):270-297

Centro de investigación científica de Yucatán (CICY) Líneas de investigación: bioenergía. 2010. <http://www.cicy.mx>

De la Cruz Canul Chan Michel (2010). Estudio de los Parámetros de un Reactor Anaerobio para la Producción de hidrogeno a partir de Residuos Orgánicos, Tesis Doctoral, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México.

Demirbas A. (2008) Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management* 49, 2106–2116

Density Systems, Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des IAA, France. Elsevier Science Publishers 5 19-525.

Diseño de Medios de Cultivo (2009) Departamento de Ciencia y Tecnología, Bioprocesos 1

Doran, Pauline M. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. ACRIBA S. A. Zaragoza, España

EIA(2009) Energy Information Administration. *International Energy Outlook 2008*. September, 2009. 260

Eric Young, Sun-Mi Lee, Hal Alper (2010) Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches, Department of Chemical Engineering, The University of Texas at Austin, USA. Young et al. *Biotechnology for Biofuels* (1): 03-24, <http://www.biotechnologyforbiofuels.com>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The state of food and agriculture 2008 - BIOFUELS: prospects, risks and opportunities*. Rome: FAO, 2008. 138

Fu Nan, Peiris Paul, Markham Julie and Bavor John (2009) A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures, *School of Natural Sciences, University of Western Sydney, Australia*. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 210–217. Disponible en: www.elsevier.com/locate/emt

Ganduglia, F. (2008) Diagnóstico y estrategias para el desarrollo de los biocombustibles en la Argentina. Capítulo IV. www.iica.int/Esp/regiones/sur/argentina

Goldschmidt Felix (2008). *From Cellulose to Ethanol: Engineering Microorganisms to Produce Biofuel*, Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics, Department Environmental Sciences, ETH Zürich. Term Paper.

Gutierrez Beatriz y Waliszewski Krzysztof, Caevajal Octavio y Aguilier Maria G. (2011). Conversion efficiency of glucose/xylose mixture for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Chem Technol Biotechnol* (87): 263-270. www.soci.org

Gutiérrez Beatriz, Waliszewski Krzysztof, Carvajal Octavio y Aguilar María Guadalupe (2011) Conversion efficiency of Glucose/Xylose for ethanol production using *Saccharomyces*

Cerevisiae ITV01 y *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, Instituto Tecnológico de Tierra Blanca, Veracruz, México. Society of Chemical Industry, Chem Technol Biotechnol (87): 263-270, www.wileyonlinelibrary.com, DOI 10. 1002./jctb.2709

Gutiérrez, L.F., Sánchez, O.J. y Cardona, C.A. (2011). Modeling of Batch Extractive Fermentation for the Fuel Ethanol Production, Department of Chemical Engineering, National University of Colombia at Manizales Department of Engineering, University of Caldas, Colombia

H. Christensen y Bjo-Rn K. Jensen (1992). Modelling TCE Degradation by a Mixed Culture of Methane-Oxidizing Bacteria, Department of Environmental Engineering/Groundwater Research Centre, Denmark. Printed in Great Britain. All rights reserved, *Wat. Res.* Vol. 26. (9): 1177-1185

Hamidimotlagh Rouhollah, Nahvi Iraj, Emtiazi Giti y Abedinifar Sorah. (2007). Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylosefermenting *Kluyveromyces marxianus* and their Cocultures. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (9) 1110-1114

Hanly Timothy J y Henson Michael A. (2008). Dynamic Flux Balance Modeling of Microbial Co-Cultures for Efficient Batch Fermentation of Glucose and Xylose Mixtures, Department of Chemical Engineering, University of Massachusetts, USA. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108 (2)

Hanna Ingesson, Guido Zacchi, Bin Yang, Ali R. Esteghlalian y John N. Saddler (2011) The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose, Department of Chemical Engineering, Canada. Journal of Biotechnology 88: 177-182. www.elsevier.com/locate/jbiotec.

Hettenhaus James R. (1998) Ethanol fermentation strains *present and future requirements for biomass to ethanol commercialization*, United States Department Of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy Ethanol Program and National Renewable Energy Laboratory

Jeffries, Thomas (1984). Comparison alternatives for the fermentation of pentoses to ethanol by yeasts, Energy applications of biomass: Proceedings of the National Meeting on Biomass, New York. Applied Science Publishers; 231-252.

Kamini N. R. and Gunasekaran P (1987). Simultaneous Ethanol Production from Lactose by *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*, Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai, India. CURRENT MICROBIOLOGY Vol. 16 : 153-157

Kerstin Skoog y Barbel Hahn-Hagerdal(1990. Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*, Applied Microbiology, Chemical Center,Sweden. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56(11):3389-3394

Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R. y Navarro J. M. (1991) Combined Alcoholic Fermentation Of D-Xylose And D-Glucose By Four Selected Microbial Strains :Process Considerations In Relation To Ethanol Tolerance, Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des I.A.A.,France. Biotechnology Letters Vol 13 (6): 445-450

Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R. y Navarro J. M. (1993)Effects of culture conditions on the co-fermentation of a glucose and xylose mixture to ethanol by a mutant of *Saccharomyces diastaticus* associated with *Pichia stipitis* Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des I.A.A.,France. Microbiol Biotechnol (39):760-763

Laplace J. M., Delgenes J. P., Moletta R. y Navarro J. M. (1993). Ethanol Production from Glucose and Xylose Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement des I.A.A.,France. Microbiol Biotechnol

M. Ribas, R. Hurtado, N. Garrido, M. Díaz de los Ríos, F. Doménech, R. Sabadí, T. García y D. Rodríguez (2006). Modelación matemática y simulación de procesos fermentativos. Simulación de Procesos, Ingeniería Química, disponible en: www.hotfrog.es

Machado Cristina M. M. (2010) Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe, Organización Latinoamericana de Energía

Mehmet M. Altintas, Christina K. Eddy, Min Zhang, James D. McMillan y Dhinakar S. Kompala (2006). Kinetic Modeling to Optimize Pentose Fermentation in *Zymomonas mobilis*, Department of Chemical Engineering, University of Colorado, Boulder. Wiley Inter Science. www.interscience.wiley.com

Mercedes Ferreyra María (2006) Estudio del Proceso Biotecnológico para la Elaboración de una Bebida Alcohólica a Partir de Jugo de Naranjas, Universidad Politécnica De Valencia Departamento De Tecnología De Alimentos, Valencia, España

Mingyu Qian, Shen Tian, Xuefeng Li, Jing Zhang, Yaping Pan, And Xiushan Yang (2006) Ethanol Production From Dilute-Acid Softwood Hydrolysate by Co-Culture, College of Life Science, Capital Normal University,Beijing, China. Humana Press Volume 134, (3): 273–289

Nemecio González, Jesús Zamora, Luís Ramos, Eikel Pérez, Carlos Pérez Eladio Salazar (2009) Transferencia y Consumo de Oxígeno en el Cultivo de Alta Densidad del Microorganismo con Actividad Bionemática Tsukamurella

Nikel Pablo I.(2009). Metabolitos de interés biotecnológico a la carte: Análisis de flujos metabólicos como herramienta para la evaluación de fenotipos industriales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Química Viva, Vol. 8 (2):125-144, www.redalyc.org

Olga Volfvfi, Olga Suchardovfi, Jan Pano y Vladimir Krumphanzl. (1985). Formation from Cellulose by Thermophilic. Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Czechoslovakia, Microbiol Biotechnol (22):246-248

Opara C.C., Ajoku G. y Madumelu N.O.(2013). Palm Wine Mixed Culture Fermentation Kinetics, Department of Chemical Engineering, University of Port Harcourt, Rivers State, Nigeria. Greener Journal of Physical sciences ISSN: 2276-7851 Vol. 3 (1):028-037

Paurometabola, C924, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey, Cuba. Tecnología Química Edición Especial.

Peña Poma Maribel (2008) Optimización de las Condiciones de Cultivo de las Cepas *Pichia stipitis* CBS 5773 y 6054 para la Producción de Bioetanol a partir del Hidrolizado de Aserrín de Curupau como Residuo Lignocelulósico, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, La Paz, Bolivia

Producción de ATP y Fermentación, www.slideshare.net/gugaslide/respiracion-y-fermentacion-presentation 28 de diciembre de 2008

Quiroz Castañeda, Balcázar López, Dantán-González y col. (2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 Vol.12 (4)

Raposo Sara, Pardao Joao M., Diaz Inti y Lima Ma Emilia (2009). Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products. International Journal Of Energy And Environment, Issue 1, Vol. 3

Rivera, E.; Costa, A.C.; et al. (2006) Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature Process Biochemistry (Brasil) (41): p. 1682-1687

Romero Garcia Aida (2003). Desarrollo de una cepa etanológica a partir de *Bacillus subtilis*, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernava, Morelos, México.

Rosa Carlos y Peter Gabor (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. ISBN-10 3-540-26100-1 Springer Berlin Heidelberg New York

Scheper T., Ulber R. and Sell D. (2007) *White Biotechnology, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Springer, Vol 105

Silva J. P. A., S. I. Mussatto, I. C. Roberto y J. A. Teixeira (2011). Ethanol Production From Xylose by *Pichia Stipitis* NRRL Y-7124 In A Stirred Tank Bioreactor, Department of Biotechnology, Engineering College of Lorena, University of Sao Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 28, (1): 151 – 156

Solange I. Mussatto y Giuliano Dragone (2008). The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Springer Science, Cellulose* (15):711–721

Srilekha Yadav, Shaik Naseeruddin, Sai Prashanthi, Lanka Sateesh y Venkateswar Rao (2011). Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*, Department of Microbiology, Osmania University, India. *Bioresource Technology* 102:6473–6478, journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Stambuk Boris, Eleutherio Elis, Flores Luz Maria, Souto Ana Maria y Bon Elba (2008). Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains, *Molecular biology and Biotechnology of yeast Laboratory, Brasil, Journal of Scientific and Industrial Research* Vol. 6 81):918-926

Tae-Young Lee, Myoung-Dong Kim, Kyu-Yong Kim., Kyungmoon Park, Yeon-Woo Ryu and y Jin-Ho Seo (2000). A Parametric study on Ethanol Production from Xylose by *Pichia stipitis*, Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National

Tetsuji Chohji, Tatsuro Sawada y Yoshitoshi Nakamura (1983). Mathematical Model for Diauxic Growth of Microorganisms in Mixed Substrate Medium. *Journal of Chemical Engineering of Japan*.

Teunissen M., E. W. Kets , Op den Camp, Huis in't Veld y D. Vogels (1991). Effect of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on

cellulolytic and xylanolytic enzyme activities, Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Nijmegen Toernooiveld, The Netherlands. *Microbiology* (157): 176-182

Tohyama Masayuki, Patarinska Trayanka, Qiang Ziwen y i Shimizu Kazuyuk (2002) Modeling of the mixed culture and periodic control for PHB production, *Department of Biochemical Engineering, Japan*. *Biochemical Engineering Journal* (10): 157–173

Toribio Cuaya Héctor (2011) Experimentación, Modelado Matemático y Estimación de parámetros de la Fermentación de mezclas de azúcares mediante un co-cultivo de *Pichia stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de Bioetanol, Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana, México Distrito Federal

Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). Proyecto de investigación multidisciplinaria: la biomasa recurso sustentable esencial - el caso de la producción de etanol. 2010. http://www.cua.uam.mx/docs/CNI/investigacion_dpt_biomasa.php

Volfová O., O. Suchardov_a, J. Panos, and V. Krumphazl.(1985) Ethanol formation from cellulose by thermophilic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(4):246-248

Wan Ping, Zhai Dongmei, Wang Zhen, Yang Xiushan, y Tian Shen (2012) Ethanol Production from Nondetoxified Dilute-Acid Lignocellulosic Hydrolysate by Cocultures of *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and *Pichia stipitis* CBS6054, *College of Life Science, Capital Normal University, Beijing, China*. Hindawi Publishing Corporation, *Biotechnology Research International* Vol. (1)

Wang Conney, Demain Dunill and Humphrey Lilly (1976) *Fermentation and enzyme technology*, Canadá, Jhon Wiley and Sons Inc.

William II. Murray y M. Asther (1984) Ethanol Fermentation of Hexose NDP Entcsew Oods Ugarsp Reduced By Hydrogen-Fluorsidoel Volysiso F Aspenc Hip. Division of Biological Sciences National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. *Biotechnology Letter* Vol. 6 (5): 323-326

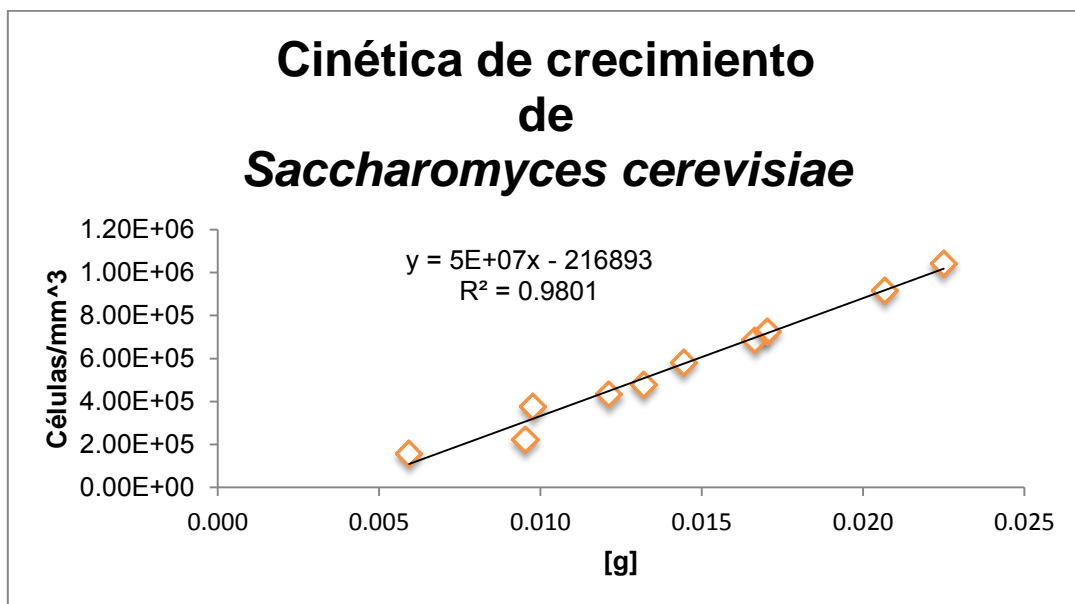
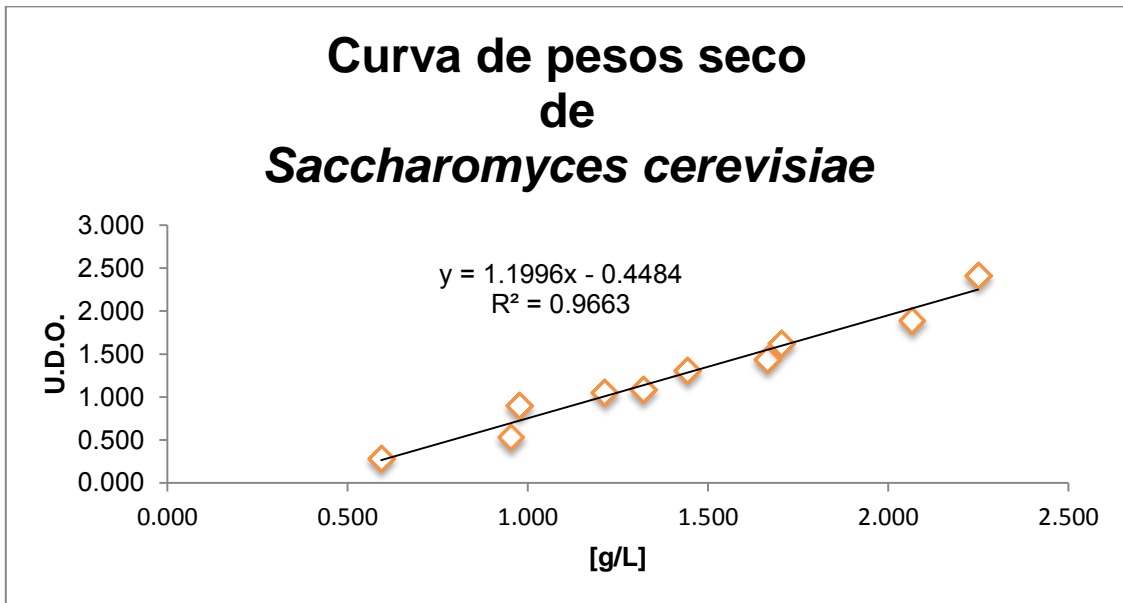
Xuewu Guo & Jun Zhou & Dongguang Xiao (2010). Improved Ethanol Production by Mixed Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from Cheese Whey Powder Solution Fermentation. Tianjin Industry Microbiology Key Lab, College of Bioengineering, China, *Biochem Biotechnol* (160):532–538

Yang Mu, Gang Wang, Han-Qing Yu (2005). Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures, School of Chemistry, University of Science & Technology of China, China. *Bioresource Technology* 97:1302–1307. Disponible en: www.sciencedirect.com

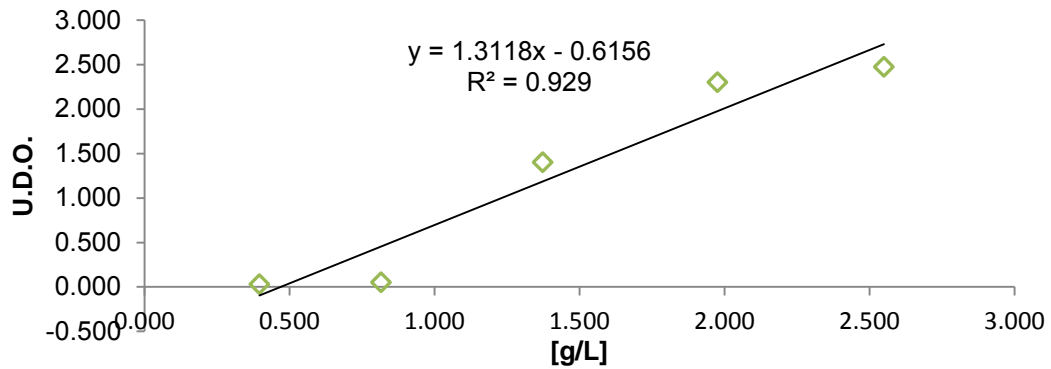
Yanli Che. (2010). Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review Department of Chemical Engineering, Auburn University, USA. Springer

Yuan Li, Jeung-yil Park, Riki Shiroma, y Ken Tokuyasu (2011). Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation, National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Japan. *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 111 (6): 682–686, www.elsevier.com/locate/jbiosc.

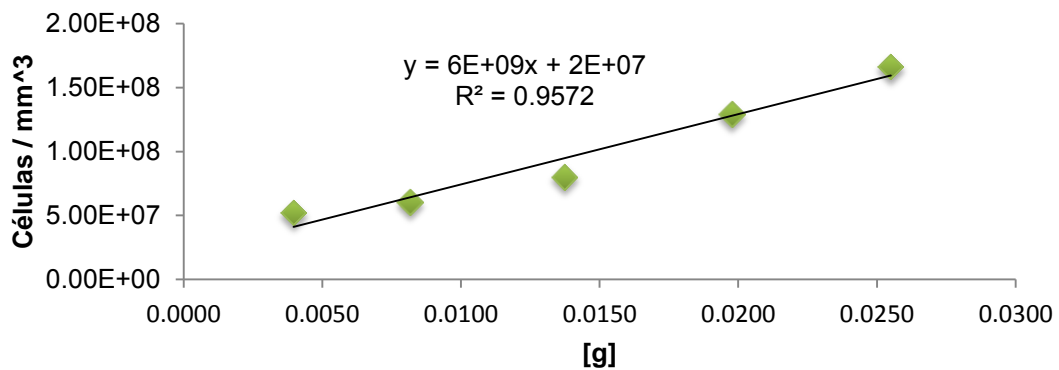
Zhao Chongde y Dale M. Clark (1994) Xylose and Xilose/Glucose Fermentation by Yeast: a Strain Comparison, Agricultural and Biological Engineering Dept



Curva de peso seco de *Scheffersomyces Stipits*



Cinética de crecimiento de *Scheffersomyces stipitis*

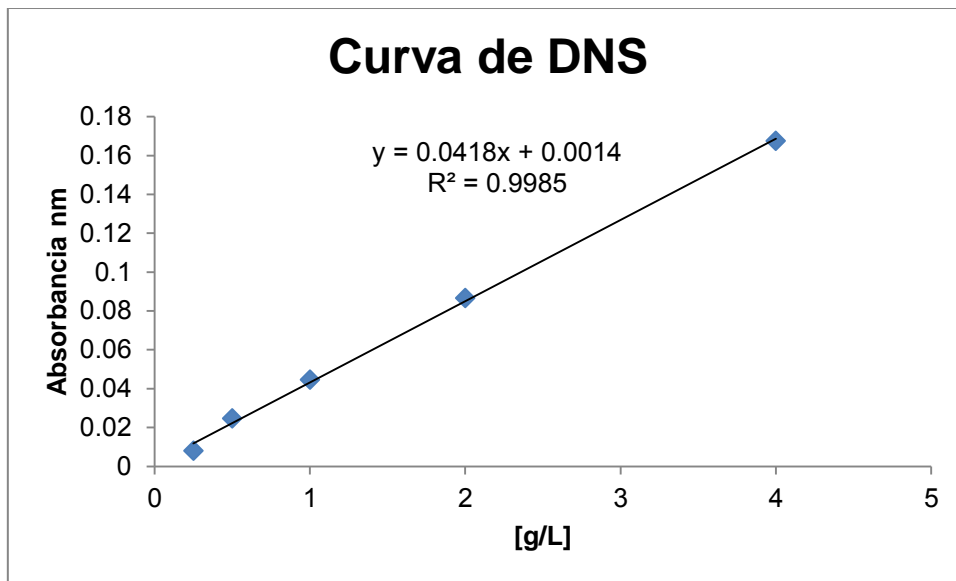


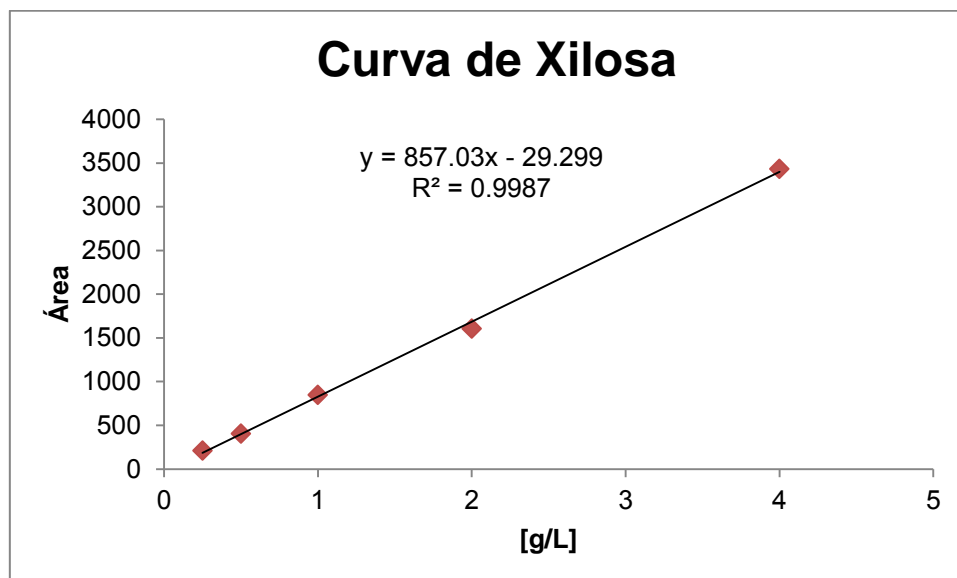
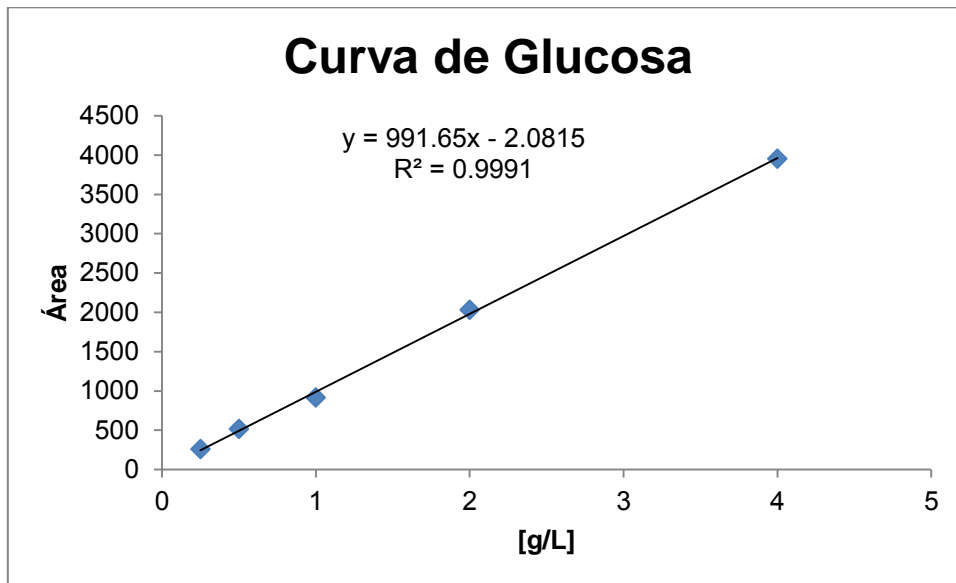
ANEXO B Reactivo DNS

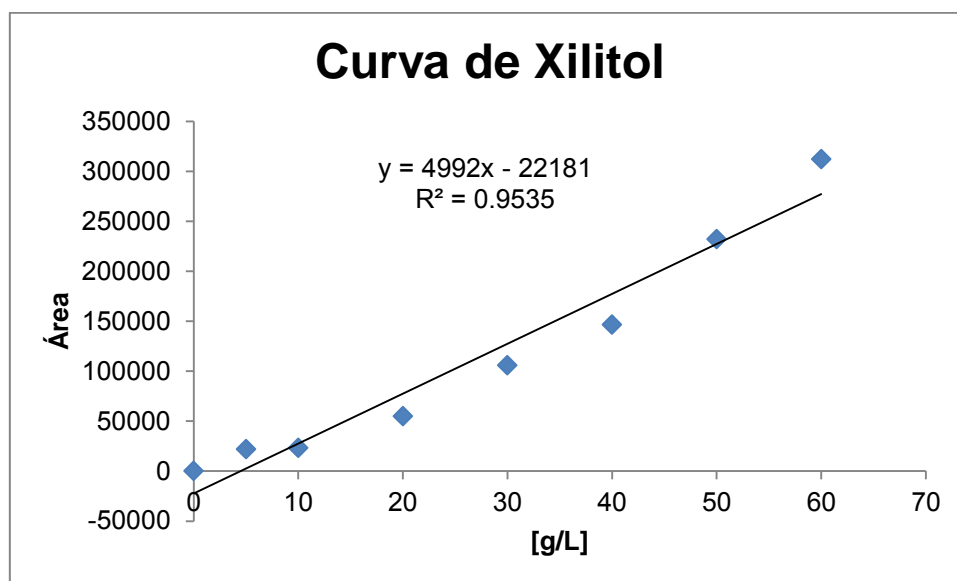
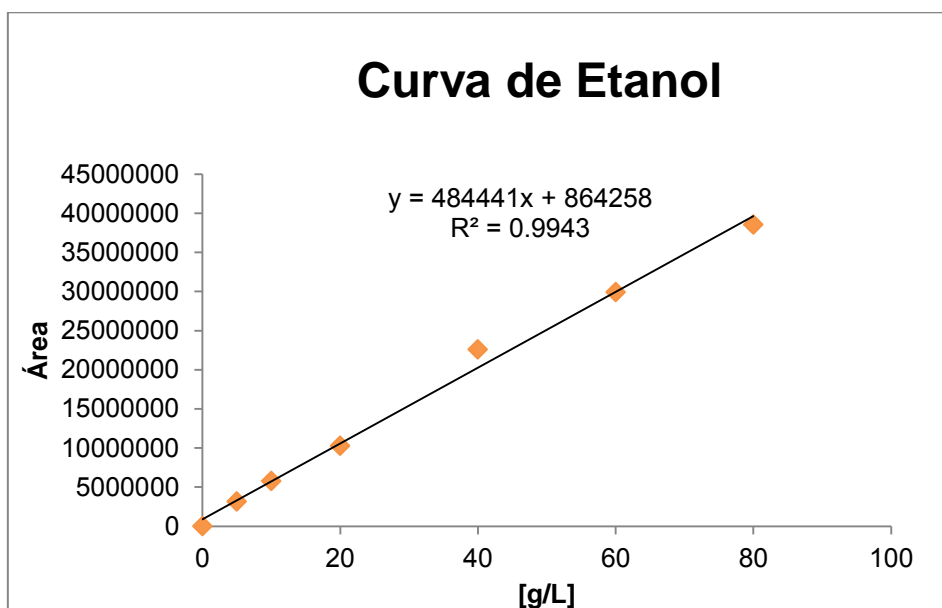
Preparación de DNS

- 750 mL de agua deionizada.
- g de hidróxido de sodio.
- 200 g de tartrato de sodio.
- 0.5 g de sulfato de sodio.
- 2 g de fenol.
- 10 g de 3,5-dinitrosalicílico.

En un vaso precipitado se van adicionando los reactivos en el orden en que están escritos, hasta que se hayan disuelto completamente cada uno, posteriormente se afora a un litro, el pH debe estar en 13, de no ser así ajustar con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio según convenga.







ANEXO E Ecuaciones de Simulación

Ecuaciones para el dimensionamiento del fermentador (biorreactor):

Volumen de trabajo inicial:

$$V_{to} = Vn \left(\frac{V_{to}}{Vn} \right) \quad 15$$

Diámetro de un fermentador con una tapa plana y una torriesférica ($0.4 \leq V_n < 5 \text{ m}^3$):

$$Dt = \sqrt[3]{\frac{Vn}{0.7854 \frac{Ht}{Dt} - 0.023}} \quad 16$$

Diámetro de un fermentador con dos tapas torriesféricas ($5 \leq V_n \leq 250 \text{ m}^3$):

$$Dt = \sqrt[3]{\frac{Vn}{0.7854 \frac{Ht}{Dt} - 0.0459}} \quad 17$$

Altura del líquido en la parte cilíndrica del tanque para $V_n < 40 \text{ L}$:

$$H_{CL} = \frac{4 V_L}{\pi Dt^2} \quad 18$$

Altura de la tapa torriesférica (código ASME):

$$h = 0.11632 \quad 19$$

Altura del líquido:

$$H_{CL} = H_{CL} + h \quad 20$$

Altura total del tanque:

$$Ht = Dt \left(\frac{Ht}{Dt} \right) \quad 21$$

Altura cilíndrica del tanque:

$$Hc = Ht - 2h \quad 22$$

Volumen del líquido aireado:

$$V_{L\varepsilon} = V_L(1 + \varepsilon) \quad 23$$

Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La):

Modelo de Van't Riet (1979):

$$k_{La} = 2 \times 10^{-3} \left(\frac{Pg_{tot}}{V} \right)^{0.7} (Vs)^{0.2} \times 3600 \quad 24$$

Modelo de Van't Riet:

$$k_{La} = 2 \times 10^{-2} \left(\frac{Pg_{tot}}{V} \right)^{0.4} (Vs)^{0.5} \times 3600 \quad 25$$

Número de Reynolds:

$$Re = \frac{NDi^2\rho}{\eta} \quad 26$$

Flujo volumétrico de aire máximo:

$$Qa_{max} = 0.6 \frac{N^2 Di^5}{Dt^{15}} \quad 27$$

Velocidad máxima del impulsor ($0 \leq V_L \leq 20000$ L):

$$Na_{max} = 2824.812 V_L^{-0.23911} \quad 28$$

Velocidad seccional del aire en el fermentador:

$$Vs = \frac{Qa}{\pi \frac{Dt^2}{4}} \quad 29$$

Flujo volumétrico de aire, ajustando vvm's:

$$Qa = \frac{Vs \pi Dt^{2(60)(1000)}}{4Vlf} \quad 30$$

Cálculo de la Potencia:

Potencia sin airear del impulsor i :

$$P_{oi} = \rho N^3 Di^5 N_{pi} \quad 31$$

Potencia aireada del 1^{er} impulsor (método de Michel y Miller):

$$P_{g1} = 0.706 \left(\frac{P_{o1}^2 N D_i^3}{Q_a^{0.56}} \right)^{0.45} \quad 32$$

Potencia aireada para otros impulsores (método de Nienow):

$$P_{g_{i(>1)}} = P_{o_{(i)}} (1 - \varepsilon) \quad 33$$

Potencia total consumida por el líquido aireado:

$$P_{g_{tot}} = \sum_{i=1}^{N_{oi}} P_{gi} \quad 34$$

Cálculo de la velocidad global de transferencia de oxígeno (N_A):

Para $V_n < 1000$ L:

$$N_a = k_{La}(C_{out}^* - C_L) \quad 35$$

Las ecuaciones utilizadas fueron tomadas de Wang Conney, Demain Dunill and Humphrey Lilly (1976) Fermentation and enzyme technology, Canadá, Jhon Wiley and Jons Inc