



Universidad
Tecnológica
de Pereira

**ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE
Saccharomyces cerevisiae silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
Y *Candida utilis* ATCC 9950.**

**SANDRA CATALINA GARZÓN CASTAÑO
CATALINA HERNÁNDEZ LONDOÑO**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
2009**



Universidad
Tecnológica
de Pereira

**ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE
Saccharomyces cerevisiae silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
Y *Candida utilis* ATCC 9950.**

**SANDRA CATALINA GARZÓN CASTAÑO
CATALINA HERNÁNDEZ LONDOÑO**

**Trabajo de Grado para optar al título de
Químico Industrial**

**Director
OSCAR A. PABON RINCÓN
Microbiólogo con énfasis en alimentos
Docente Escuela de Tecnología Química**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
2009**



Universidad
Tecnológica
de Pereira

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Pereira, noviembre 2009



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al profesor Oscar Aníbal Pabón Rincón por su conocimiento y confianza, al permitirnos realizar este proyecto de grado.

Agradecemos también a Carlos Humberto Montoya Navarrete y María Victoria Sánchez, por el uso de los laboratorios y reactivos que hicieron posible la realización de este trabajo, en conjunto a la Escuela de Tecnología Química y al laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira por los recursos brindados.

Y a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta estuvieron involucradas en el desarrollo de este trabajo.



CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	19
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
4. MARCO TEÓRICO	26
4.1. ETANOL	26
4.1.1. ¿Qué es el etanol?.	26
4.2. HISTORIA	26
4.2.1. El etanol en el mundo	26
4.2.2. El etanol en Colombia.	27
4.2.3. Etanol como combustible (Alcohol carburante).	28
4.3. EL ETANOL COMO COMBUSTIBLE LIMPIO	28
4.3.1. Etanol y medio ambiente	29
4.3.2. Producción de etanol como combustible	29
4.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	30
4.4.1. Introducción	30
4.4.2. Condiciones a medir y controlar en el proceso de fermentación	32
4.4.2.1. Temperatura	32
4.4.2.2. pH	32
4.4.2.3. Nutrientes	33
4.4.2.4. Aireación	33
4.4.2.5. Productividad	33
4.4.3. Limitantes de la fermentación	33
4.4.3.1. Concentración de alcohol	33



4.4.3.2. Acidez del sustrato	34
4.4.3.3. Concentración de Azúcares	34
4.4.3.4. Temperatura	34
4.4.3.5. Ritmo de crecimiento de las cepas	35
4.4.4. Materias primas	35
4.4.4.1. Fuentes con alto contenido de azúcares	35
4.4.4.2. Fuentes con alto contenido de almidón	35
4.4.4.3. Fuentes ricas en celulosa	35
4.4.5. Etanol a partir de melaza	36
4.4.5.1. Obtención de la melaza	36
4.4.5.2. Composición de la melaza	37
4.4.5.3. Utilización comercial de la melaza	38
4.4.5.4. Tratamiento previo de la melaza antes de la fermentación	39
4.4.6. Bioquímica de la fermentación alcohólica	40
4.4.6.1. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica	40
4.5. MICROORGANISMOS	45
4.5.1. Levaduras	45
4.5.1.1. Fisiología del crecimiento	46
4.5.1.2. Influencia del entorno	47
4.5.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
4.5.2. Aplicaciones industriales	52
4.6. TÉCNICAS Y MÉTODOS	53
4.6.1. Método Fenol-Ácido Sulfúrico (Método de Dubois)	53
4.6.2. Coloración de Gram	53
4.6.3. Cromatografía de gases.	54
4.6.3.1. Detector FID (Konik Instruments. 1992).	55



5. METODOLOGÍA	57
5.1. ESTANDARIZACIÓN CURVA AZÚCARES REDUCTORES TOTALES.	57
5.2. MICROORGANISMO.	57
5.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MELAZA.	58
5.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO.	59
5.5. FERMENTACIÓN	60
5.6. COLORACIÓN DE GRAM	62
5.7. ANÁLISIS DE AMBIENTES	63
5.8. DESTILACIÓN FRACCIONADA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES	63
5.8.1. Destilación fraccionada.	63
5.8.2. Cromatografía de gases	64
5.9. MONTAJE DEL BIRREACTOR	64
5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	68
6.1. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORBANCIA MÉTODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO.	68
6.2. ELABORACIÓN CURVA PATRÓN AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO	68
6.3. DETERMINACIÓN DE UFC PARA UN NÚMERO DETERMINADO DE COLONIAS AISLADAS SUSPENDIDAS EN SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL	70
6.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MELAZA	72
6.5. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> SILVESTRE (LEVAPAN)	73
6.5.1. Identificación macroscópica de colonias <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre (Levapan)	73
6.5.2. Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a diferentes concentraciones y determinación del porcentaje de etanol.	73
6.5.2.1. Concentración de 180g/L	74
6.5.2.2. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 180 g/L	78
6.5.2.3. Concentración 200 g/L.	82



6.5.2.4. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 200 g/L	86
6.5.2.5. Concentración 250 g/L.	87
6.5.2.6. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 250 g/L	91
6.5.2.7. Consumo total de azúcares para la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	92
6.5.2.8. Porcentaje de alcohol obtenido para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre.	92
6.5.2.9. Comparación % etanol obtenido a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	93
6.5.2.10. Comparación Etanol Obtenido vs Etanol Teórico a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	94
6.6. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 9763	96
6.6.1. Identificación macroscópica de colonias <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	96
6.6.2 Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a una concentración de 250g/L de azúcares reductores y determinación del porcentaje de etanol	96
6.6.2.1 Concentración de 250g/L	97
6.6.2.2 Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 250 g/L	101
6.7. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 9080	101
6.7.1. Identificación macroscópica de colonias <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	101
6.7.2 Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a una concentración de 250 g/L de azúcares reductores y determinación del porcentaje de etanol	102
6.7.2.1 Concentración de 250 g/L	102



6.7.2.2 Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación	105
6.8. <i>CANDIDA UTILIS</i> ATCC 9950	106
6.8.1. Identificación macroscópica de colonias <i>Candida utilis</i> ATCC 9950	106
6.8.2 Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a una concentración de 250 g/L de azúcares reductores y determinación del porcentaje de etanol	106
6.8.2.1 Concentración de 250 g/L	106
6.8.2.2 Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación	108
6.9. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA <i>S. CEREVISIAE</i> SILVESTRE, ATCC 9763, ATCC 9080 Y <i>C. UTILIS</i> ATCC 9950 A UNA CONCENTRACIÓN DE 250 g/L	111
6.9.1. Comparación consumo de azúcares reductores totales	111
6.9.2. Comparación porcentaje de etanol obtenido	112
6.9.3. Comparación de los rendimientos obtenidos	113
6.9.4. Comparación del etanol obtenido vs etanol teórico	114
6.10. ANÁLISIS DE AMBIENTE Y COLORACIÓN DE GRAM	115
6.10.1. Coloración de Gram	115
6.10.2. Análisis de ambiente.	116
7. CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Materias primas utilizadas para la producción de etanol.	36
Figura 2. Proceso de obtención de la melaza.	36
Figura 3. Ruta catabólica del piruvato obtenido mediante glicólisis	42
Figura 4. Conversión del Piruvato en Etanol y Dióxido de Carbono	43
Figura 5. Vía de Entner-Doudoroff utilizada por <i>Zymomonas mobilis</i> para	44
Figura 6. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG.	49
Figura 7. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	50
Figura 8. Reacción general Método Fenol-Ácido Sulfúrico	53
Figura 9. Vista microscópica coloración de Gram	54
Figura 10. Estandarización Curva Azúcares reductores totales.	57
Figura 11. Reconstitución y acondicionamiento de las cepas ATCC.	58
Figura 12. Análisis microbiológico de la melaza.	58
Figura 13. Determinación de la concentración del inóculo	59
Figura 14. Proceso de Fermentación de melaza para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
Figura 15. Proceso de Fermentación de melaza para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763, 9080 y <i>Candida utilis</i> ATCC 9950	61
Figura 16. Coloración de Gram	62
Figura 17. Destilación fraccionada.	63
Figura 18. Condiciones para el cromatógrafo de gases	64
Figura 19. Partes del Biorreactor.	65
Figura 20. Biorreactor.	67
Figura 21. Barrido espectral método Fenol-Ácido sulfúrico.	68
Figura 22. Curva patrón para azúcares reductores $\lambda = 490$ nm	69
Figura 23. Absorbancia para número de colonias suspendidas en 10mL de solución salina estéril.	71
Figura 24. Identificación macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	73



Figura 25. Seguimiento de azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 180 g/L	74
Figura 26. Seguimiento Azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 180 g/L	75
Figura 27. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 180g/L.	76
Figura 28. Cromatograma para el etanol obtenido por fermentación a una concentración de 180 g/L.	79
Figura 29. Cromatograma para el etanol absoluto.	80
Figura 30. Cromatograma metanol analítico.	81
Figura 31. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 200 g/L	82
Figura 32. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 200 g/L	83
Figura 33. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 200 g/L	84
Figura 34. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	87
Figura 35. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	88
Figura 36. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	89
Figura 37. Comparación % etanol obtenido a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre.	93
Figura 38. Comparación Etanol Obtenido vs Etanol Teórico a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	95
Figura 39. Identificación macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763.	96
Figura 40. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	97



Figura 41. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	98
Figura 42. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	99
Figura 43. Identificación macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	101
Figura 44. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	102
Figura 45. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	103
Figura 46. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	104
Figura 47. Identificación macroscópica de <i>Candida utilis</i> ATCC 9950.	106
Figura 48. Seguimiento de azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	107
Figura 49. Seguimiento de azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	108
Figura 50. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L	110
Figura 51. Comparación % etanol obtenido para cada una de las levaduras estudiadas	113
Figura 52. Comparación Etanol Obtenido vs Etanol Teórico	115



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la melaza.	37
Tabla 2. Composición química de las levaduras	51
Tabla 3. Barrido espectral método Fenol-Ácido sulfúrico.	68
Tabla 4. Determinación de la curva patrón para azúcares reductores $\lambda = 490 \text{ nm}$.	69
Tabla 5. Correlación entre número de colonias suspendidas en S.S.E y absorbancia.	70
Tabla 6. Correlación entre UFC y absorbancia para colonias suspendidas en S.S.E.	71
Tabla 7. Requisitos microbiológicos para el azúcar crudo según NTC 607	72
Tabla 8. Reporte análisis microbiológico de la melaza.	72
Tabla 9. Ensayo 1 Concentración 180g/L.	74
Tabla 10. Ensayo 2 concentración 180 g/L	75
Tabla 11. Promedio concentración 180 g/L.	76
Tabla 12. Ensayo 1 concentración 200 g/L.	82
Tabla 13. Ensayo 2 concentración 200 g/L	83
Tabla 14. Promedio concentración 200 g/L	84
Tabla 15. Ensayo 1 concentración 250 g/L.	87
Tabla 16. Ensayo 2 concentración 250 g/L	88
Tabla 17. Promedio Concentración 250 g/L.	89
Tabla 18. Consumo azúcares de cada ensayo a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	92
Tabla 19. Porcentaje de Alcohol Obtenido en cada ensayo a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	92
Tabla 20. Comparación % Etanol obtenido a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	93
Tabla 21. Alcohol obtenido en cada ensayo a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre.	94



Tabla 22. % Rendimiento para cada ensayo a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	94
Tabla 23. Comparación etanol obtenido vs etanol teórico a diferentes concentraciones para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	95
Tabla 24. Ensayo 1 concentración 250 g/L.	97
Tabla 25. Ensayo 2 concentración 250 g/L.	98
Tabla 22. Promedio concentración 250 g/L.	99
Tabla 27. Ensayo 1 concentración 250 g/L.	102
Tabla 28. Ensayo 1 concentración 250 g/L	103
Tabla 29. Promedio concentración 250 g/L	104
Tabla 30. Ensayo 1 concentración 250 g/L.	107
Tabla 31. Ensayo 2 concentración 250 g/L.	108
Tabla 32. Promedio concentración 250 g/L	109
Tabla 33. Comparación consumo de azúcares para cada una de las levaduras estudiadas	111
Tabla 34. Comparación % etanol obtenido para cada una de las levaduras estudiadas.	112
Tabla 35. Porcentajes de rendimiento obtenidos	114
Tabla 36. Comparación etanol obtenido vs etanol teórico en (L)	114



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aprovechamiento de la melaza de caña.	38
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>Candida utilis</i>	52



ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo preparado para levaduras.	124
Anexo 2. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación para una concentración de 200g/L	125
Anexo 3. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L.	126
Anexo 4. Ficha técnica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	127
Anexo 5. Cromatograma obtenido para el etanol en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L	128
Anexo 6. Ficha técnica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080.	129
Anexo 7. Cromatograma obtenido para el etanol en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L	130
Anexo 8. Ficha técnica de <i>Candida utilis</i> ATCC 9950.	131
Anexo 9. Cromatograma obtenido para el etanol en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L	132



RESUMEN

El etanol es considerado un recurso energético sostenible, puesto que ofrece diversas ventajas sobre los derivados del petróleo, como son; la disminución en la producción de gases invernadero, disminución del costo del combustible, mayor seguridad energética y apoyo a producciones agrícolas. Éste se obtiene a partir de microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que se encuentran en productos vegetales, que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales, para la producción del azúcar como: la melaza, el jugo de caña entre otros, emplear éstos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en los cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente. (Mancheno, 2006; Gonzales,2007).

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950, adicional a esto se evaluó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080.

Se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de melaza (180, 200 y 250 g/L) con *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, con el fin de establecer la concentración de melaza que produjera el mejor porcentaje de alcohol; encontrandolo con la concentración de 250 g/L. Evaluando a esta concentración las otras levaduras; el consumo de azúcares reductores se determino por el método Dubois, para realizar el seguimiento de los mismos.

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 , ATCC 9080 y *Candida utilis* ATCC 9950 presentaron un porcentaje de alcohol del 8 % (V/V), mientras que la



Saccharomyces cerevisiae silvestre mostro un porcentaje del 6,5 % (V/V) a la concentración de 250 g/L; el etanol obtenido fue cuantificado por alcoholimetría y cualificado por cromatografía de gases

Palabras claves: Etanol, fermentación, gases invernaderos, recurso energético, petróleo, *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080.



INTRODUCCIÓN

El etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, de alta viabilidad técnica, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo puesto que a diferencia del petróleo, éste se obtiene a partir de fuentes vivas como microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales; emplear éstos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en los cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente (Mancheno, 2006; Gonzales, 2007).

El 19 de Septiembre de 2001 el Congreso de la República expidió la ley 693 la cual pretende controlar la contaminación del medio ambiente, mediante el uso de oxigenantes en la gasolina, lo cual impulso la producción de alcohol, puesto que este se perfila como un biocombustible de fuentes renovables que reducen considerablemente las emisiones de dióxido de carbono, debido a que es un hidrocarburo de bajo peso molecular y con enlaces sencillos carbono-carbono (Grupo Manuelita, 2007).

El etanol ha sido obtenido por fermentación de diversos sustratos, principalmente de la industria agro-azucarera, aunque es posible obtenerlo de otras fuentes ricas en almidón o celulosa. Las principales responsables de la fermentación de estos sustratos han sido levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, aunque existen estudios que demuestran producción de alcohol empleando bacterias como *Zymomona mobilis* (Vázquez y Dacosta, 2007).

En los últimos años la melaza, se ha convertido en un sustrato de alto interés para la obtención de alcohol por medio de vías fermentativas debido a su bajo precio y



a que es considerado como un subproducto de la fabricación del azúcar crudo. La melaza está compuesta principalmente de diversos azúcares los cuales pueden ser fermentados por levaduras o bacterias, generando así un valor agregado para este subproducto y encontrando una fuente renovable de energía para frenar la crisis que se avecina por el uso del petróleo, puesto que éste es un recurso no renovable que tiende a agotarse rápidamente (Mancheno, 2004).

Por lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad realizar un estudio comparativo de la producción de alcohol carburante por medio de fermentación de melaza utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, silvestre y *Candida utilis* ATCC 9950.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El petróleo es un producto básico, siendo la principal fuente de energía usada en la actualidad a nivel mundial, aportando el mayor porcentaje del total de la misma que se consume en el mundo. Éste debe ser extraído de la naturaleza, pero su disponibilidad no es uniforme en el mundo; siendo un recurso no renovable y relativamente escaso, trayendo como consecuencia que la producción no sea suficiente para satisfacer la demanda mundial, lo que se ve reflejado en los precios; generando así repercusiones en la economía de los países tercermundistas; por lo que se ha hecho indispensable el estudio, desarrollo y uso de nuevos combustibles (Levtona, 2006; Cadena Agroindustrial, 2004).

Cada vez la demanda del petróleo se acelera debido al crecimiento económico, derivado de la industrialización, mejoras en la infraestructura y urbanización de países en desarrollo; trayendo consigo incrementos en los precios debido al escaso abastecimiento de este producto.

Adicional a esto, la utilización del petróleo como fuente energética trae como consecuencia daño sobre el entorno natural, no solo, por la producción de grandes cantidades de dióxido de carbono, el cual aumenta la absorción de calor contribuyendo al calentamiento global (Gallardo, 2007), sino también por el impacto que tiene sobre el territorio en el que se realizan las explotaciones (Sánchez y Vargas, 2005). Estos fenómenos solo podrían ser contrarrestados a medida que aparezcan nuevos hallazgos, que aumenten considerablemente la oferta de sustitutos y que disminuyan los efectos sobre el medio ambiente.

El etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, de alta viabilidad técnica, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a



largo plazo en contraposición al uso del petróleo, éste se obtiene a partir de fuentes vivas como microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que se encuentran en productos vegetales, que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales para la producción del azúcar como: la melaza y el jugo de caña, emplear éstos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en los cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente, debido a que se ha comprobado que la cantidad de gases emitidos usando etanol son menores que los que se producen con la gasolina, la cual, actualmente contiene 10% de etanol, para reducir la contaminación (Mancheno, 2006; Gonzales, 2007).

Por lo tanto, se considera que con el tiempo aumentará la producción de este recurso renovable, sin afectar al medio ambiente, trayendo consigo la reactivación del agro, para lograr producir suficiente etanol carburante, siendo necesario aumentar las plantaciones de caña, lo que ayudará a incrementar la oferta de empleo en el campo; por ello es importante determinar ¿Cuál de las especies a estudiar *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* silvestre y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, presenta el mayor rendimiento para la producción de etanol carburante, empleando como sustrato melaza?



2. JUSTIFICACIÓN

La energía es un recurso indispensable en el desarrollo de las actividades que realiza el hombre, por lo que temas relacionados en la búsqueda de nuevas energías, no son de interés nacional si no mundial. La utilización del petróleo como fuente de energía es una amenaza continua puesto que este es un recurso no renovable y difícil de conseguir, por el contrario, el uso de etanol como fuente de energía se ha convertido en un tema amplio de investigación mundial, y su producción a aumentado notablemente en los últimos años. La demanda de etanol para ser usado como combustible pasa de 19 billones de litros en el 2000 a 22 billones de litros en el 2004 (Enríquez, 2005; Cadena Agroindustrial, 2004).

En Colombia, el gobierno tomó la decisión de impulsar un proyecto para mezclar el etanol con el combustible como una estrategia para frenar la dependencia al petróleo, mediante la ley 693 del 19 de septiembre de 2001; con el fin de reemplazar el petróleo y darle mayor valor agregado a la melaza que se exporta a bajo precio, buscando además proteger el medio ambiente, puesto que, se aumentarán las plantaciones de caña, la absorción de dióxido de carbono y la oferta de empleo en el campo. Éste plan consiste en mezclar 10% de etanol con la gasolina que se consumirá en el país. Para esto se requerirá montar entre cinco y 10 destilerías que produzcan 840 mil litros de etanol diariamente (Cadena Agroindustrial, 2004; Mancheno, 2006).

El etanol ofrece diversas ventajas sobre los derivados del petróleo, como son: menores precios de las importaciones, disminución en el costo del combustible, apoyo a producciones agrícolas, mejoramiento de las situaciones económicas y sociales en las zonas rurales, mayor seguridad energética y reducción de la contaminación, puesto que se ha comprobado que en términos de generación de



gases invernaderos, el etanol reduce la producción de estos gases en un 10 ó 15 % de los que se generan con la gasolina; y por último el uso de etanol para ser mezclado con la gasolina no ha tenido ningún efecto negativo en los motores de los automóviles (Pérez, 2007).

Por ello se hace necesario realizar un estudio comparativo para la producción de etanol entre las especies *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y silvestre; debido a que estos microorganismos han sido estudiados ampliamente por su alta eficiencia en la fermentación alcohólica; permitiendo determinar que microorganismo puede fermentar la melaza con un alto rendimiento, además de dar a conocer las condiciones óptimas y el microorganismo adecuado para dicho proceso, puesto que se controlaran diferentes variables como el pH, temperatura y agitación siendo estos importantes para la obtención de etanol por fermentación; volviendo rentable la producción del mismo mediante una vía microbiana, conduciendo así al desarrollo de energía renovable.



3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de etanol mediante un estudio comparativo entre *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* silvestre y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elaborar un biorreactor para la producción de etanol empleando *Candida utilis* ATCC 9950, *Saccharomyces cerevisiae* silvestre y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, controlando condiciones de temperatura, pH y agitación para la producción de etanol.
- Determinar el porcentaje de etanol obtenido por fermentación de melaza mediante alcoholimetría y cualificarlo por cromatografía de gases.
- Realizar el seguimiento del consumo de azúcares reductores, empleando el método del Fenol-Acido Sulfúrico por espectrofometría.
- Realizar un estudio comparativo de los porcentajes de etanol obtenidos con cada una de las especies estudiadas.



4. MARCO TEÓRICO

4.1. ETANOL

Las recurrentes crisis en los precios y el agotamiento de los combustibles fósiles como el petróleo, el cual es clave en el desarrollo de la vida de la sociedad, hace necesaria la investigación, fomento y uso de nuevos combustibles. Uno de estos combustibles es el etanol producido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, el que debidamente procesado poco a poco comienza a postularse como combustible en el mercado internacional (Levtona, 2006).

4.1.1. ¿Qué es el etanol?. El etanol o alcohol etílico es el producto químico orgánico sintético más antiguo usado por el hombre, se presenta como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C, su fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$, siendo el componente activo esencial de las bebidas alcohólicas, además es una de las materias primas importantes para las síntesis. Puede obtenerse a través de dos procesos de elaboración: la fermentación o descomposición de los azúcares contenidas en distintas frutas, y la destilación, la cual consiste en la depuración de las bebidas fermentadas (Cadena Agroindustrial, 2004).

4.2. HISTORIA

4.2.1. El etanol en el mundo. La utilización de los biocombustibles líquidos es tan antigua como la de los mismos combustibles de origen fósil y los motores de combustión interna. Las crisis energéticas que sacudieron el siglo XX, y la preocupación mundial por la conservación del medio ambiente, fueron el motor para incentivar la búsqueda de nuevas fuentes energéticas como el etanol (Grupo Manuelita, 2007).



La historia del uso del etanol como combustible, se remonta al siglo XIX y su línea cronológica desde entonces hasta la actualidad, describe, una serie de acontecimientos importantes en el campo de la ingeniería automotriz, la agroindustria, la ecología y la industria energética.

4.2.2. El etanol en Colombia. Ante la iniciativa tomada por el Gobierno Nacional de impulsar una Ley que estimule la producción, comercialización y consumo de alcoholes carburantes y ante la anunciada deficiencia de petróleo en los próximos años, la producción de alcohol aparece como una nueva alternativa para la producción de combustible limpio; lo que dará sostenibilidad al sector azucarero y a su área de influencia que depende en gran parte de éste, además proporcionará, nuevas posibilidades al sector agropecuario en general.

Es necesario destacar que en el mundo entero, el alto nivel de contaminación del aire en los principales centros urbanos ocasionado por el uso de combustibles fósiles, llevó a las autoridades a extremar las medidas de control y previsión, tanto en los requisitos exigidos para las condiciones de operación de los motores de combustión interna, como en las exigencias en la formulación de los combustibles.

Este fue uno de los motivos que tuvo en cuenta el Congreso de la República para expedir la Ley 693 de septiembre 19 de 2001, cuyo objeto es controlar la contaminación del aire mediante el uso de oxigenantes en las gasolinas que reduzcan la contaminación producida por los motores de combustión interna. Igualmente, establece que, a partir del 27 de septiembre del año 2005, las gasolinas que se utilicen en las ciudades con más de 500 mil habitantes como Bogotá, Cali, Medellín y Barranquilla y, posteriormente, para el 2006, Bucaramanga, Cartagena, Cúcuta, Pereira y sus áreas metropolitanas, deberán contener un 10% de alcohol carburante (Grupo Manuelita, 2007); debido a que la utilización de oxigenantes en la gasolina como el etanol, obedece a dos factores: el primero es la racionalización en el consumo de energía y el segundo es la



preservación del medio ambiente, además los oxigenantes hacen más eficiente la conversión de energía térmica en energía mecánica y por lo tanto, reducen el consumo de combustible.

4.2.3. Etanol como combustible (Alcohol carburante). El Etanol Carburante es un alcohol libre de agua, conocido también como alcohol anhidro; con el fin de lograr la combinación con las gasolinas, este cuenta con un alto octanaje y se produce por la fermentación de azúcares. Es reconocido en la actualidad como un biocombustible de alta calidad que puede ser usado en mezclas con gasolina ó sólo.

El auge a escala mundial del etanol como biocombustible se fundamenta en dos grandes realidades: por un lado, la cada vez más complicada localización y obtención de petróleo y los altos costos de sus derivados y, por otro, los altos niveles de contaminación ambiental que éstos producen (Briceño y Calero, 2004).

4.3. EL ETANOL COMO COMBUSTIBLE LIMPIO

El etanol es un biocombustible de fuente renovable, reduce considerablemente las emisiones de dióxido de carbono (CO_2); esto debido a que el etanol es una sustancia de bajos pesos moleculares con enlaces sencillos carbón-carbón, en comparación con la gasolina y el diesel, los cuales son mezclas complejas de hidrocarburos con altos pesos moleculares y fuertes enlaces carbón-carbón.

Las emisiones de monóxido de carbono son menores en el caso del etanol, ya que este producto es reducido por mezclas aire-combustible, con un contenido bajo de este último y exceso de aire. La combustión de etanol genera menor cantidad de óxidos de nitrógeno (NO_x) que la gasolina y el diesel, debido a que su elevado calor latente de vaporización proporciona un mayor enfriamiento del motor y una temperatura de flama más baja; teniendo en cuenta el riesgo inminente que



implica el calentamiento, el gran desafío de conservación del medio ambiente, es reducir las emisiones de gases con efecto invernadero, principalmente el CO₂ que no sólo a diferencia de otros componentes de gases de escape tóxicos, este no puede ser reducido por efecto catalítico; las únicas alternativas para reducir las emisiones de este gas, son el uso de combustibles más limpio y la mejora de la eficiencia de los vehículos introduciendo tecnologías de punta y reduciendo así el consumo de combustible (Briceño y Calero, 2004).

4.3.1. Etanol y medio ambiente. El uso del etanol carburante reduce las emisiones del dióxido de carbono emitido por la flota vehicular. Con esto, se espera un impacto positivo sobre el medioambiente, y en consecuencia en la salud de las personas que habitan las ciudades. Los efectos positivos sobre el medio ambiente se debe a que el etanol carburante (Cadena Agroindustrial, 2004):

- Es un compuesto biodegradable.
- Su combustión produce un efecto oxigenante.
- Reduce la emisión de gases tóxicos de los vehículos tradicionales.
- Reduce el efecto invernadero.

4.3.2. Producción de etanol como combustible. La agroindustria azucarera es pionera en la producción de etanol en Colombia, al haber asumido en 2005 el reto de la diversificación en apoyo al Plan Nacional para la oxigenación de gasolinas, proyecto que comenzó en el país en 2001 con el objeto de producir etanol a partir de caña de azúcar y otros insumos agrícolas para mejorar la calidad de las gasolinas utilizadas. En el año 2007 el sector azucarero produjo cerca de 1.100,000 litros de etanol combustible por día; con dicha cantidad de etanol se abastece aproximadamente el 60% de la demanda nacional (Cenicaña, 2007).

De acuerdo a las estadísticas internacionales, Brasil, Estados Unidos e Indonesia, encabezan respectivamente la lista de principales países productores a nivel mundial, acumulando entre ellos un 64.2% de la producción mundial total; la cual



ascendió en el año 2002 a 127.871,529 litros de etanol; Brasil es pionero, siendo el primer productor y exportador mundial de alcohol carburante.

El uso del etanol como combustible representa el 61% de la producción mundial, ya sea para mezclar o reemplazar petróleo y derivados, alrededor del 23% se destina a la industria procesadora (cosméticos, farmacéutica, química, entre otras), y el 16% restante se destina a la industria de bebidas, la producción de alcohol destinada al uso como combustible, se debe al impacto positivo del uso del etanol carburante sobre el medio ambiente, por otra parte permite la reducción de la petróleo-dependencia (Cadena Agroindustrial, 2004).

4.4. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

4.4.1. Introducción. La fermentación es un término general, que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un substrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP.

La degradación anaeróbica es quizá la más antigua, puesto que los organismos vivos aparecieron en una tierra primitiva, la cual era carente de oxígeno (Lehninger, 1981).

Existen muchas clases de fermentaciones, dependiendo de: el tipo de organismo que las produce, del substrato, o incluso de las condiciones impuestas, tales como pH o el abastecimiento de oxígeno.

Una de las más importantes y mejor conocidas es la fermentación alcohólica, la cual es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante la siguiente reacción química:





Las principales responsables de esta degradación son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con mayor frecuencia, pero existen diversos estudios que comprueban la producción de alcohol por otros tipos de levaduras y algunas bacterias como *Zymomona mobilis*, pero su explotación a nivel industrial es mínima (Vázquez y Dacosta, 2007).

A nivel estequiométrico, esta reacción parece ser sencilla, pero la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, puesto que al mismo tiempo la levadura debe utilizar la glucosa y otros nutrientes adicionales para poder reproducirse (Vázquez y Dacosta, 2007).

El rendimiento estequiométrico teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de dióxido de carbono por 1 gramo de glucosa. En realidad es difícil obtener este rendimiento por que como se menciono anteriormente la levadura utiliza glucosa para la producción de otros metabolitos indispensables para su crecimiento y desarrollo. El rendimiento experimental varía entre el 90 y el 95 % del teórico, y en la industria varia del 87 al 93 % del teórico (Vázquez y Dacosta, 2007).

Puesto que gran cantidad de residuos que contienen carbohidratos de precio muy reducido, pueden aprovecharse en la fabricación de etanol; este tipo de fermentación a escala industrial, ha sido usada años atrás por la humanidad para la elaboración de cerveza, vinos y en general bebidas alcohólicas y en la actualidad se le está dando un valor agregado a la producción de etanol para ser utilizado como biocombustible.

La fermentación alcohólica industrial típica es esencialmente un proceso que se produce en un biorreactor, mediante el cual determinados substratos son transformadas mediante la reacción microbiana en etanol, dióxido de carbono y



biomasa. Estos contenedores son herméticos y permiten retirar mediante canalizaciones apropiadas el dióxido de carbono resultante.

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar: concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado (Prescott y Cecil, 1992).

La fermentación de tipo industrial está enfocada, en aumentar la eficiencia de los biorreactores, con el fin de obtener mejores resultados en cuanto a productos, empleando teorías de control, en las variables que determinan la eficiencia del proceso, como son el calor, la temperatura, contaminaciones, pH, niveles de alcohol, concentraciones del sustrato, biomasa producida entre otras (Biocombustibles, 2007).

4.4.2. Condiciones a medir y controlar en el proceso de fermentación

4.4.2.1. Temperatura. La temperatura afecta de manera notable en el crecimiento microbiano, debido a que los microorganismos tienen un rango restringido de temperatura para su crecimiento.

4.4.2.2. pH. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio, por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento.



4.4.2.3. Nutrientes. Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar.

4.4.2.4. Aireación. La ausencia o presencia de oxígeno permite una selección tanto del microorganismo como de los productos del mismo. Cuando el cultivo se realiza en presencia de oxígeno la fermentación se denomina aeróbica y cuando este carece de oxígeno se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaeróbica generalmente por la producción de etanol.

4.4.2.5. Productividad. La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo de cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función de tiempo (h).

4.4.3. Limitantes de la fermentación

4.4.3.1. Concentración de alcohol. Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato.

En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma.



La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso, 2004).

4.4.3.2. Acidez del sustrato. El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5.

En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero.

En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Ríos, *et al* 2005).

4.4.3.3. Concentración de Azúcares. Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos, *et al* 2005).

4.4.3.4. Temperatura. Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar lo 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte.



Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C.

4.4.3.5. Ritmo de crecimiento de las cepas. Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

4.4.4. Materias primas. El etanol puede obtenerse a partir de cualquier azúcar ó polisacáridos. En general la materia prima puede clasificarse en tres grupos (Biocombustibles, 2007):

4.4.4.1. Fuentes con alto contenido de azúcares. Como lo son azúcar de caña, remolacha, melazas y jugos de fruta. Son materias primas que poseen un alto contenido de azúcares simples y fermentables, como la glucosa, la fructosa, la galactosa y la sacarosa, entre otros. La ventaja de utilizar este tipo de fuentes consiste en que no es necesario realizar tratamientos previos para obtener los azúcares fermentables, puesto que estos ya se encuentran presentes.

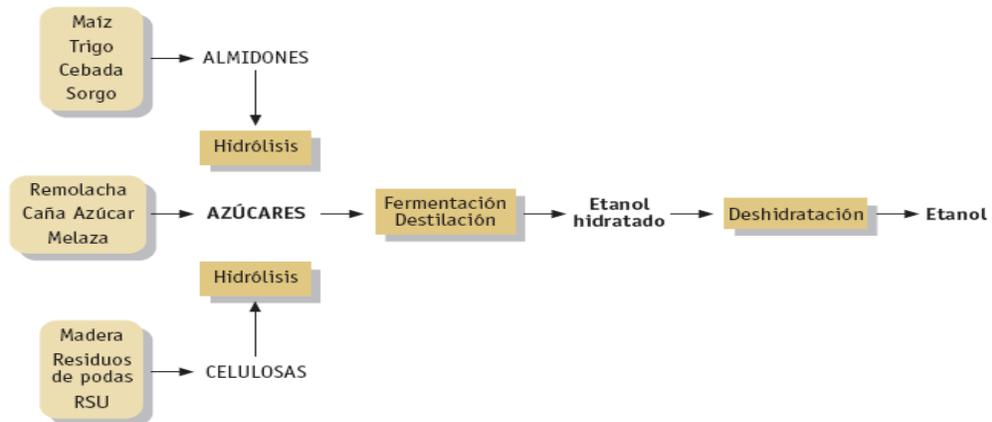
4.4.4.2. Fuentes con alto contenido de almidón. Como por ejemplo el maíz, malta, cebada, avena trigo, arroz, sorgo y otros.

Estas fuentes deben ser tratadas previamente para obtener los azúcares fermentables. En el caso de los cereales, estos deben someterse previamente a un proceso de hidrólisis del almidón, con el fin de romper este biopolímero en azúcares fermentables que estén disponibles para los microorganismos encargados de la fermentación alcohólica.

4.4.4.3. Fuentes ricas en celulosa. Como la madera, residuos de pasta y el papel. Las materias primas con alto contenido de celulosa son las fuentes más abundantes de biomasa a nivel global, y su uso ha tenido un creciente interés

global; sin embargo, la compleja composición química de estas fuentes ha planteado retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados. La clasificación de las materias primas se ilustra en la Figura 1.

Figura 1. Materias primas utilizadas para la producción de etanol.

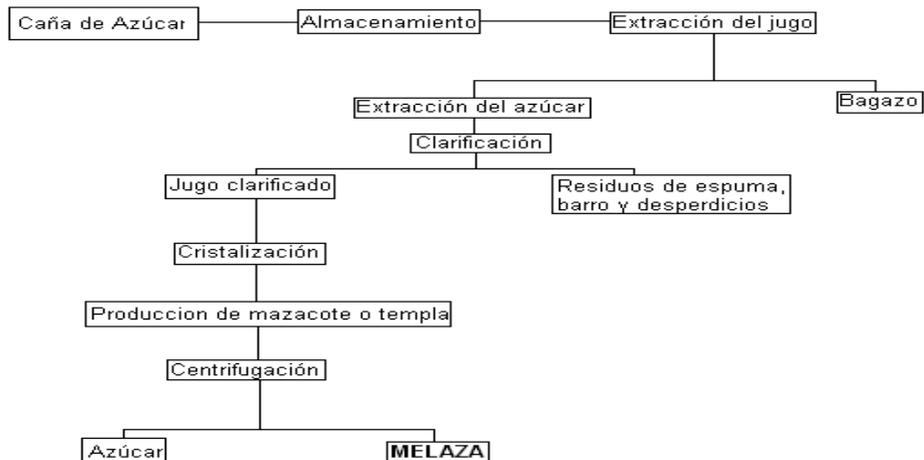


(Biocombustibles, 2007).

4.4.5. Etanol a partir de melaza.

4.4.5.1. Obtención de la melaza. La melaza se obtiene como subproducto final de la elaboración del azúcar de caña en la figura 2 se muestra un cuadro resumido de su obtención.

Figura 2. Proceso de obtención de la melaza.



(Fajardo y Sarmiento, 2007)



4.4.5.2. Composición de la melaza. La composición de la melaza es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de la caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos entre 68 y 75 % un pH de 5.0 a 6.1 (Fajardo y Sarmiento, 2008).

Tabla 1. Composición de la melaza.

Constituyentes Principales	Componentes	Porcentaje en peso (% p/p)
Agua	Agua	17-25
Azúcares	Sacarosa	30-40
	Glucosa	4-9
	Fructosa	5-12
	Otras sustancias reductoras	1-4
Otros carbohidratos	Gomas, almidón, pentosanos, Ácidos urónicos, D-manitol y otros.	2-5
Cenizas	Carbonatos bases:	
	K ₂ O	7-15
	CaO	30-50
	MgO	7-15
	Na ₂ O	2-14
	Ácidos:	0.3-9
	SO ₃	7-27
	Cl	12-20
	P ₂ O ₅	0.5-2.5
SiO ₂	1-7	
Compuestos nitrogenados	Proteína bruta	2.5-4.5
	Proteína verdadera	0.5-1.5
	Aminoácidos: ácido aspártico y glutámico	0.3-0.5
Ácidos no nitrogenados	Ácido aconítico, cítrico, malico, oxálico, glicólico	1.5-6
	Mesaconico, succínico, fumarico, tartárico	0.5-1.5
Ceras, esteroides y lípidos		0.1-1
Vitaminas	Vitamina A, Biotina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina.	Cantidades variables

(Meade, 1986).



La gama amplia de las melazas que salen de las centrifugas debe ser de 85 a 92 grados Brix, lo cual equivale a aproximadamente 77 a 84 sólidos por desecación.

4.4.5.3. Utilización comercial de la melaza. La melaza es el subproducto de la fabricación o refinación del azúcar crudo. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en carbohidratos además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo.

La norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel fina o melaza (no cristalizable) al jarabe líquido denso o viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Su principal uso es como suplemento energético para la alimentación de ganado por su alto contenido de azúcares y su bajo costo en algunas regiones, aunque el precio de la melaza se ha incrementado en los últimos años, en más del 122% debido a su utilización como sustrato en la producción de etanol (Manchero, 2004). No obstante, una pequeña porción de la producción se destina al consumo humano, empleándola como endulzante culinario, producción de bebidas como el ron, producción de ácido butírico y acetona y elaboración de levadura de melaza (Meade, 1986).

Cuadro 1. Aprovechamiento de la melaza de caña.

UTILIZACIÓN	GENERALIDADES
Alimentos	<ul style="list-style-type: none">• Alimentación rica.
Animales	<ul style="list-style-type: none">• Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezcla de diversos alimentos, pulverizados de forrajes, suplemento de ensilajes.
Recuperación de líquidos desazucarados	<ul style="list-style-type: none">• Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos.• Vinazas para la obtención de ácido glutámico.



Cuadro 1. Continuación

Fermentación	<ul style="list-style-type: none">• Levaduras para panificación• Levaduras para alimentación humana y animal: aditivo para piensos, extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácido nucléicos. Además es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular.• Grasas de levadura• Alcohol etílico• Productos colaterales de fermentación alcohólica.
--------------	--

(Fajardo y Sarmiento, 2007).

4.4.5.4. Tratamiento previo de la melaza antes de la fermentación. Antes de realizar el proceso de fermentación alcohólica, es necesario someter la melaza a tratamientos previos para acondicionarla.

- **Esterilización.** Las melazas pueden contener microorganismos que pueden ser nocivos para la fermentación. El más común es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, el cual polimeriza las moléculas de sacarosa en dextranos no fermentables (Biocombustibles, 2007).
- **Dilución.** La altísima concentración de azúcares y sales presentes en las melazas impiden que los microorganismos puedan fermentarlas, debido a la gran presión osmótica que generan sobre sus paredes celulares; asimismo, las melazas son altamente viscosas, y su manipulación es difícil en estas condiciones. Por estas razones, es necesario diluir las melazas; para ello, se les agrega agua, hasta obtener diluciones de 25° Brix o menores; a valores mayores se tiene el riesgo de inicios lentos de fermentación y contaminación bacteriana (Biocombustibles, 2007).
- **Adición de nutrientes.** En ocasiones es necesario añadir algunos elementos adicionales, con el fin de complementar los nutrientes necesarios



para los microorganismos que realizarán la fermentación. Para las melazas de caña de azúcar, es necesario añadir algo de nitrógeno y fósforo. Para producción de alcohol carburante, el nitrógeno puede añadirse en forma de urea. Los requerimientos en fósforo pueden cubrirse con fosfato de diamonio, con la correspondiente disminución de urea o la fuente de nitrógeno usada.

4.4.6. Bioquímica de la fermentación alcohólica. La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos (o añadidas artificialmente), realizan una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía (Biocombustibles, 2007).

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico el cual libera moléculas de ATP, las cuales son necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras. Debido a que el proceso es anaeróbico, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis, la cual produce moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. En el balance total energético se generan 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

4.4.6.1. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica. Tradicionalmente, los microorganismos más empleados en la obtención de etanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables. La fermentación alcohólica se realiza en ausencia de oxígeno, excepto durante el tiempo de inoculación, durante el cual se insufla una pequeña cantidad para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos para que estos superen su fase de latencia y entren en la fermentación ya en la fase exponencial (Biocombustibles, 2007).



En el caso de las levaduras, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como la ruta glicolítica o ruta Embden-Meyerhof. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las mismas.

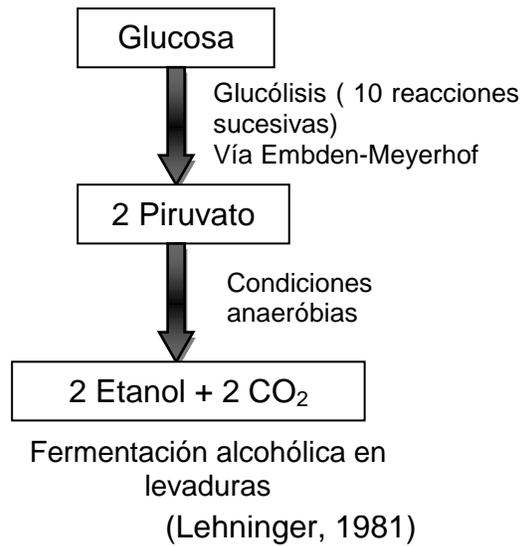
Sin embargo, existen otros microorganismos que siguen otras rutas metabólicas distintas durante la fermentación alcohólica. Muchas bacterias, como *Zymomonas mobilis*, las cuales transforman los azúcares a partir de la ruta de Entner-Doudoroff, la cual, por sus características, obliga al microorganismo a producir menos biomasa (comparado con las levaduras) y canalizar más carbono hacia los productos finales.

- **Levaduras.** Las levaduras empleados para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, requieren, que la glucosa sea catabolizada mediante la glucolisis o ruta de Embden-Meyerhof, para obtener el piruvato el cual posteriormente por la acción de enzimas específicas, se convierte anaeróbicamente en etanol y dióxido de carbono.

La glicolisis es una ruta catabólica en la cual la glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato, las cuales dependiendo de las condiciones, pueden tomar rutas diferentes, en la figura 3, se muestra la ruta que toma el piruvato en condiciones anaerobias.

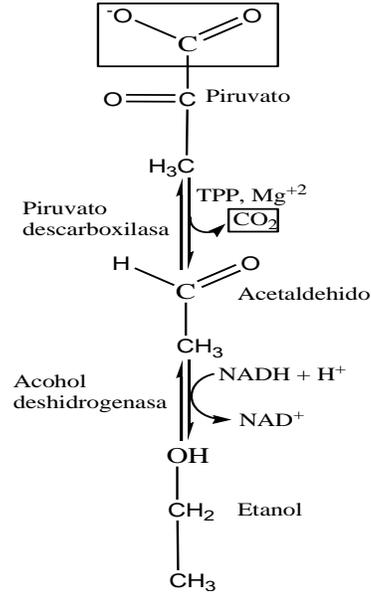


Figura 3. Ruta catabólica del piruvato obtenido mediante glicólisis.



Posteriormente el piruvato se descarboxila debido a la presencia de la enzima piruvato descarboxilasa que se encuentra en todos los organismos que metabolizan alcohol, para formar acetaldehído el cual se reduce a etanol por la presencia de NADH como agente reductor, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual está en todos los organismos capaces de dar lugar a la fermentación alcohólica. La conversión del piruvato a etanol se muestra en la figura 4.

Figura 4. Conversión del Piruvato en Etanol y Dióxido de Carbono.



(Lehninger, 1981).

En las levaduras, la producción de etanol se realiza principalmente sobre sustratos sacarosados, jugos de remolacha, jarabe, aguas residuales o melaza de azúcar. Las principales características que debe tener una cepa para la producción de alcohol industrial son:

- Capacidad de fermentar rápidamente el medio y producir etanol con un rendimiento próximo al rendimiento teórico.
- Pocos exigentes en factores de crecimiento, para evitar la adición de vitaminas a los medios industriales.
- Tener una buena tolerancia al etanol.
- Buena producción de esteres y glicerol.

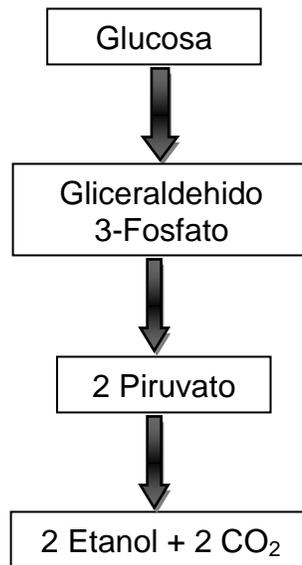
Las levaduras más utilizadas y estudiadas para la producción de alcohol, son *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* (Madigan, *et al*).



- ***Zymomonas mobilis***. *Zymomonas mobilis* a diferencia de las levaduras, no siguen la vía de la glicolisis si no la vía de Entner-Doudoroff, mediante esta vía, la producción de ATP es de uno por mol de hexosa degradada, por lo que *Zymomonas mobilis*, tiene que metabolizar rápidamente los hidratos de carbono para satisfacer la demanda energética para su crecimiento (Leveau, Bouix. 2000). A diferencia de las levaduras, *Zymomonas mobilis* por seguir esta ruta, obliga al microorganismo a producir menos biomasa y canalizar más carbono hacia los productos finales (Leveau, Bouix. 2000).

La transformación de la glucosa a etanol utilizada por *Zymomonas mobilis* se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Vía de Entner-Doudoroff utilizada por *Zymomonas mobilis* para producir etanol.



(Leveau, Bouix. 2000).

La transformación de piruvato a etanol y dióxido de carbono ocurre de la misma forma que para levaduras, como se mostró en la figura 3.



Zymomonas mobilis han sido utilizadas para la producción de etanol, debido a que presentan un rendimiento de conversión en etanol superior al de la levadura que resulta de la vía metabólica utilizada por las mismas, por lo que produce menos biomasa, una velocidad de producción más alta, aunque del otro lado, esta cepa necesita un pH más elevado aumentando el riesgo de contaminación, además de que su rango de sustratos es restringido a glucosa, fructosa y sacarosa.

Los principales sustratos utilizados para la fermentación con *Zymomonas mobilis*, son el almidón, lactosa, materias primas en base de sacarosa, remolachas y raíces.

Las melazas también son usadas ampliamente, pero presentan un inconveniente y es debido a su alta concentración en sales; pero las melazas desalinizadas presentan resultados mucho más promisorios (Leveau, Bouix. 2000).

4.5. MICROORGANISMOS

4.5.1. Levaduras. Las levaduras pueden ser definidas como hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fisión. Las levaduras están implicadas en fenómenos de competición por nutrientes, de antagonismo o de simbiosis en los suelos, las aguas, los animales y los vegetales. Su presencia depende en primer lugar de la disponibilidad de carbono orgánico, temperatura, pH y de la presencia de agua (Leveau, Bouix. 2000).

El hábitat de las levaduras, puede ser en las capas superiores del suelo, ó en materias orgánicas sobre todo de origen vegetal que sean ricas en carbohidratos; estas pueden aislarse especialmente del suelo de los viñedos y huertos, de las superficies de uvas, manzanas y de la mayoría de los frutos dulces. Son arrastradas por el aire, junto con el polvo (Prescott y Cecil, 1992).



Las levaduras han sido usadas por el hombre desde hace milenios, en particular en la fabricación de bebidas alcohólicas y de pan.

4.5.1.1. Fisiología del crecimiento. Las necesidades nutricionales de las levaduras, buscan medios de cultivo que aporten los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir las necesidades energéticas de las levaduras (Leveau, Bouix. 2000):

- **Carbono:** El carbono es el compuesto mayoritario de la célula de la levadura, alrededor del 50% en peso seco. Los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono. Entre las fuentes de carbono, los glúcidos son los más frecuentemente utilizados como hexosas, disacáridos, trisacáridos.
- **Nitrógeno:** El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo. Es utilizado por las células en los aminoácidos, los nucleótidos y algunas vitaminas.

Todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ion amonio, los cuales pueden ser aportados en el medio por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, y sobre todo el sulfato amónico siendo este el mejor, y al mismo tiempo aportando el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos.

- **Fósforo:** El fosforo se halla incluido en los ácidos nucleicos y los nucleosidos di y tri-fosfato. El fosforo es asimilado por la célula en forma de iones orto fosfato (H_2PO_4^-). Las fuentes de fósforo en el medio de cultivo deben estar constituidas por el dihidrogeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) o por el hidrogenofosfato disodico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$).



- **Azufre:** El 60% del azufre está incorporado en las proteínas. El 5% en forma de sulfato inorgánico libre. El resto está en forma de enlaces disulfuro y en aminoácidos sulfurados libres, así como también está presente en algunas vitaminas. La fuente de azufre más utilizada en los medios de cultivo es el sulfato amónico.
- **Potasio:** El potasio es elemento mineral cualitativamente más importante en las levaduras, ya que a pH ácido el potasio estimula la fermentación y la respiración, además actúa como efector de numerosas enzimas entre otros. Las fuentes de potasio en los medios de cultivo son el cloruro potásico y los fosfatos mono y dipotásico.
- **Magnesio:** El magnesio es necesario para el buen funcionamiento de muchas enzimas del metabolismo, así mismo está implicado en las estructuras de los ribosomas, de las membranas nucleares y ácidos nucleicos. Una carencia de magnesio en la fermentación alcohólica conlleva a la producción de ácido acético. El magnesio en los medios de cultivo se encuentra como cloruro o sulfato de magnesio.
- **Otros Iones:** Otros iones que juegan papel importante son: calcio, manganeso, zinc, hierro, bario, cloruro, sodio.

4.5.1.2. Influencia del entorno.

- **Temperatura:** La temperatura de las levaduras, oscila entre 25 y 30°C que permite un efectivo crecimiento.
La temperatura de crecimiento influye en la composición en ácidos grasos de las membranas plasmáticas.



Saccharomyces cerevisiae no posee ácidos grasos polinsaturados, el grado de insaturación es poco o nada modificado por la temperatura de crecimiento.

Candida utilis que poseen ácidos grasos mono y polinsaturados, el grado de insaturación es función de la temperatura de crecimiento.

- **Oxígeno:** Todas las levaduras son capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno, no hay levaduras anaeróbicas estrictas. El oxígeno interviene en la síntesis de esteroides y del ácido nicotínico.

4.5.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura cuya colonia es color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante de bordes irregulares (Figura 6). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Figura 6. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG.



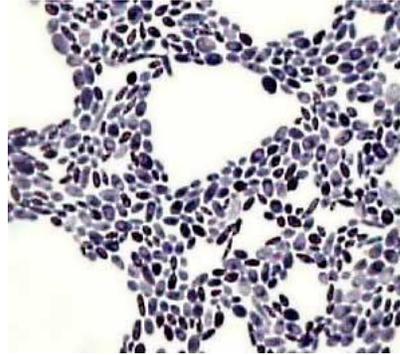
(Manual de medios de cultivo. Merk 2000).

Sus dimensiones son: 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta la lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. La aireación óptima es de 0.6-0.9vvm (Fajardo y Sarmiento, 2007).

El nombre de *Saccharomyces cerevisiae* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar masa de pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites.

Saccharomyces cerevisiae pertenece al género de las levaduras de la familia *Sacchaomycetaceae*; las células son esferoidales, elipsoidales o cilíndricas (Figura 7): La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales: los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies pero presentan ausencia de hifas verdaderas. En presencia de oxígeno las cepas pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Figura 7. Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*.



(http://www.n-t.ru/tp/nr/mk_p02.jpg)

- **Requerimientos nutricionales:** *Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable (Fajardo y Sarmiento, 2007).

- **Requerimientos fisicoquímicos.** El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los



medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento (Fajardo y Sarmiento 2007).

- **Composición Química.** Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25 % de materia seca aproximadamente. La composición de la materia seca se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química de las levaduras.

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Cenizas	7
Carbohidratos	43
Proteínas	48
Grasa	2

(Fajardo y Sarmiento, 2007).

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5-9% en peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30%. Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30-75%), contienen entre un 5 y 12% de Nitrógeno. Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura, el cultivo (Fajardo y Sarmiento, 2007).

- **Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*.**



Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reino	Hongo
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetidae</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Sacchaomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetidae</i>
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>cerevisiae</i>

(Fajardo y Sarmiento, 2007).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Candida utilis*.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>utilis</i>

(Leveau, Bouix. 2000)

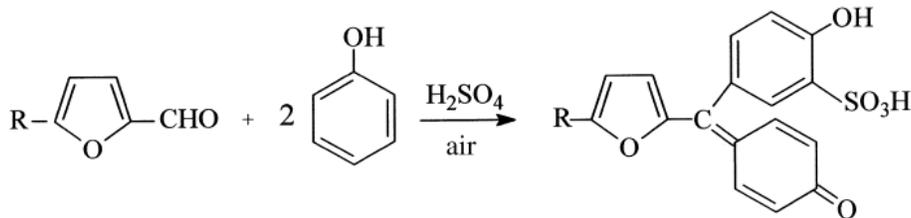
4.5.2. Aplicaciones industriales. Las principales aplicaciones industriales de las levaduras son las siguientes (Leveau, Bouix. 2000):

1. Levadura de panadería.
2. Levadura de cervecería.
3. Levaduras para elaborar vinos y alcoholes.
4. Levaduras para la elaboración de quesos.
5. Levadura-Alimento
6. Producción de proteínas Heterólogas.

4.6. TÉCNICAS Y MÉTODOS

4.6.1. Método Fenol-Ácido Sulfúrico (Método de Dubois). En ácido sulfúrico concentrado los polisacáridos son hidrolizados a sus constituyentes monosacáridos, a su vez estos son deshidratados a reactivos intermediarios que en presencia de fenol forman productos amarillo-naranja estables (figura 8), la intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes en la solución. Esta absorbancia puede ser medida a 492 nm con un rango de linealidad de 5 – 50 mg/L (Mikkelsen, Cortón. 2004).

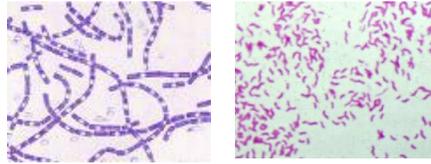
Figura 8. Reacción general Método Fenol-Ácido Sulfúrico.



(Mikkelsen, Cortón. 2004).

4.6.2. Coloración de Gram. Es una coloración que permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias Gram (+) y Gram (-), según se comporten ante esta tinción. El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacáridica externa. Tras la tinción con el primer colorante Cristal violeta, se efectúa un lavado con alcohol cetona que arrastrará al colorante sólo en las Gram (-), mientras que en las Gram (+) el colorante queda retenido y las células permanecerán azules o violeta. Las células Gram (-) se teñirán después con un colorante de contraste safranina para que puedan observarse de color rosado (Departamento de Microbiología y Genética Universidad de Salamanca).

Figura 9. Vista microscópica coloración de Gram.



(www.a14.san.gva.es/laboratorio/Web/Biot2001.htm)

4.6.3. Cromatografía de gases. La cromatografía de gases (GC) es una técnica ampliamente utilizada para separar compuestos tanto orgánicos e inorgánicos técnicamente estables y volátiles.

En este tipo de cromatografía la muestra se inyecta y se volatiliza antes de ingresar en la cabeza de la columna en la cual se lleva a cabo la separación la cual se presenta por medio del reparto entre los componentes de una mezcla química entre la fase gaseosa que fluye y una fase líquida estacionaria sujeta a un soporte sólido.

La Cromatografía de gases tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos, por otra; su aplicación como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra.

Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo).

En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito (Skoog, *et al.*2001).

Esta técnica es aplicada en las industrias y se enfoca principalmente a evaluar la pureza de los reactivos y productos de una reacción química, así como es utilizada



en el análisis de contaminantes de aguas, pesticidas y en el estudio del petróleo se pueden analizar los constituyentes de la gasolina, mezclas de refinería etc.

Esta técnica utiliza una variedad de detectores según el tipo de muestra a analizar:

- Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector).
- Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity).
- Detector termoiónico (TID, Thermolonic Detector).
- Detector de captura de electrones (ECD, Electron-Capture Detector).
- Detector de emisión atómica (AED, Atomic Emission Detector).

4.6.3.1. Detector FID (Konik Instruments. 1992).

- **Introducción**

El detector de ionización de llama, es un detector muy sensible y lineal en un amplio rango dinámico. Normalmente se utiliza para el análisis de materiales orgánicos. La respuesta es alta para los hidrocarburos alifáticos y algo más baja para compuestos oxigenados de igual número de carbonos, compuestos nitrogenados y orgánico clorados.

El FID no tiene o tiene muy baja respuesta para el aire, el agua, gases paramagnéticos, óxidos nitrogenados, amoníaco, dióxido de carbono y monóxido de carbono entre otros.

Este detector trabaja bien por encima de los 100°C de esta manera evita la condensación de agua, además debe trabajar por encima de la temperatura de columna para prevenir la condensación del eluyente de la misma.

- **Principio de funcionamiento**

La corriente de ionización de llama hidrogeno-aire, en ausencia de cualquier sustancia se debe a la presencia de iones H_3O^+ acompañados de trazas de NO^+ y NH_3 . Esta corriente de fondo se establece al someter la llama a una diferencia de potencial.



Al aparecer en la llama una sustancia extraña habrá una variación en la corriente de fondo debido a la presencia de nuevas especies iónicas o incluso modificadas de las que ya había.

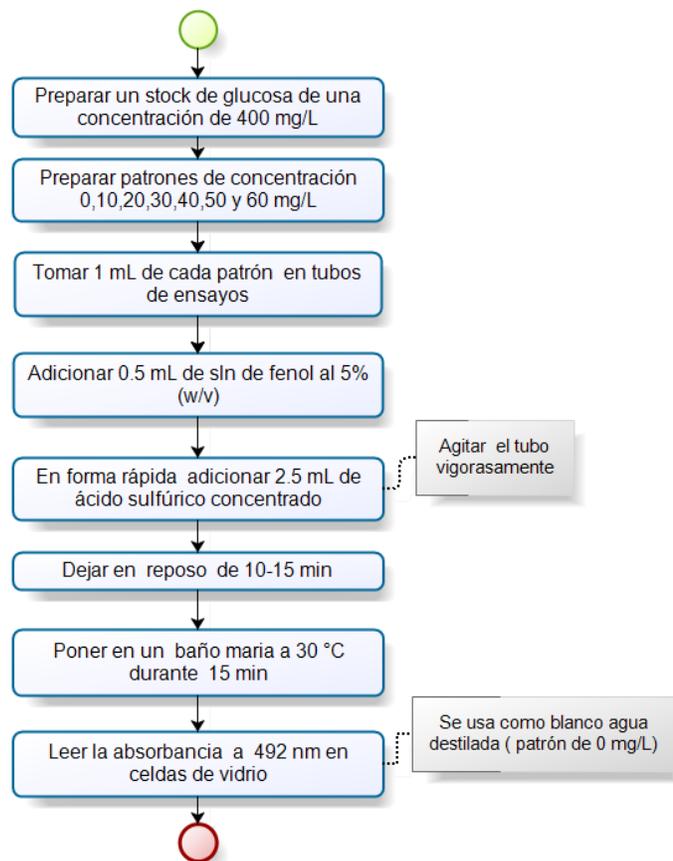
La detección de una sustancia orgánica en la llama de hidrogeno-aire provoca un fuerte aumento en la corriente de ionización siempre que el compuesto orgánico contenga unidades C-H en su molécula.

Las especies reactivas capaces de producir la mayor parte de iones se forman durante la oxidación que sufre la sustancia orgánica en la zona oxidante de la llama.

5. METODOLOGÍA

5.1. ESTANDARIZACIÓN CURVA AZÚCARES REDUCTORES TOTALES.

Figura 10. Estandarización curva azúcares reductores totales.



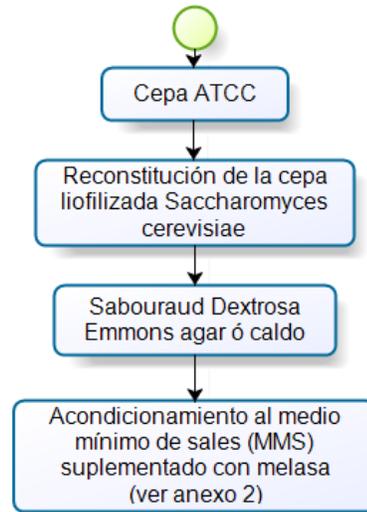
(Autores)

5.2. MICROORGANISMO.

Se evaluaron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Candida utilis* ATCC 9950 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; se les realizó el tratamiento como se muestra en la figura 11. Se conservará un ejemplar en el cepario del

laboratorio de microbiología de la Escuela de Tecnología química de la Universidad Tecnológica de Pereira.

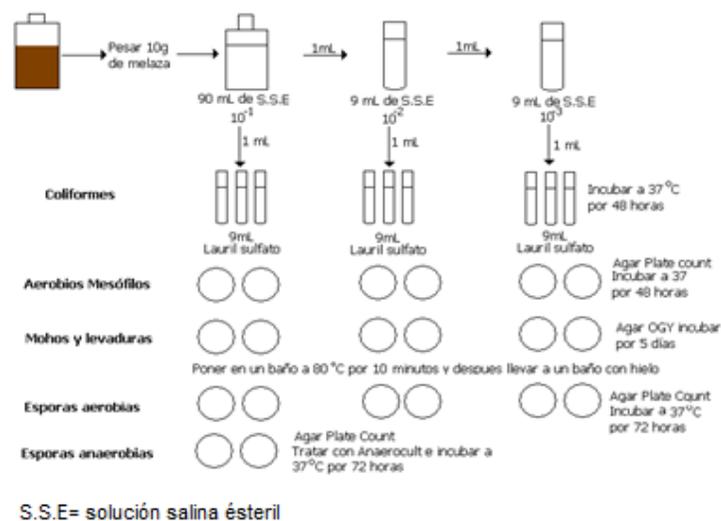
Figura 11. Reconstitución y acondicionamiento de las cepas ATCC.



(Autores)

5.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MELAZA.

Figura 12. Análisis microbiológico de la melaza.

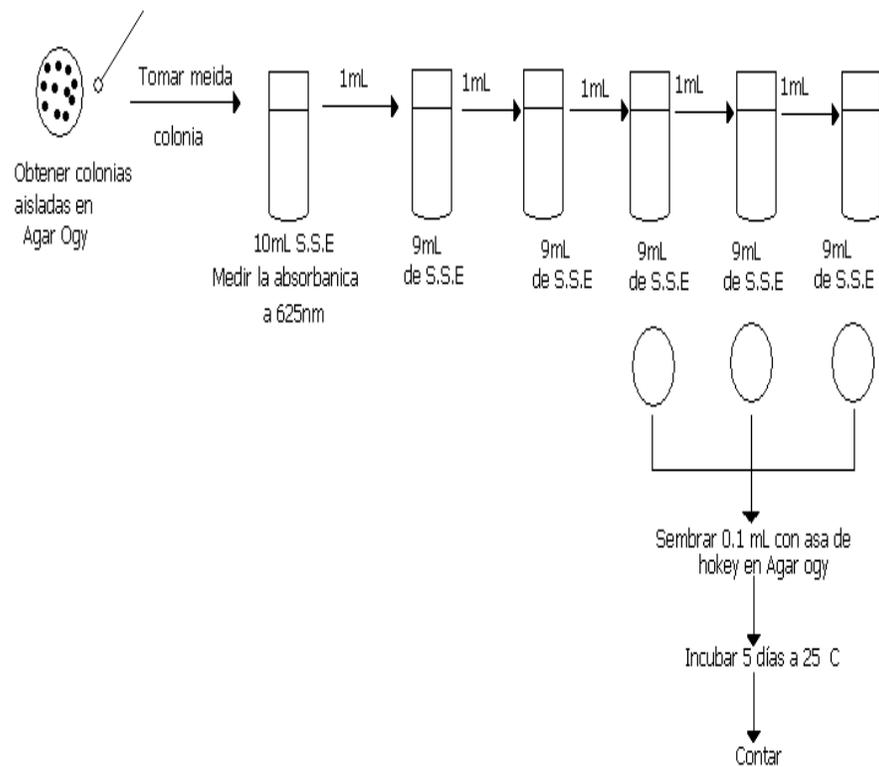


(Autores)

5.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO.

Para la preparación del inoculo en un proceso de fermentación, se deben tener conteos aproximados de 10^6 a 10^8 UFC/L, para esto se realizaron diluciones en solución salina estéril (S.S.E) de colonias aisladas de más o menos 5 mm de diámetro obtenidas en siembras por agotamiento en agar OGY se realizaron conteos en placa superficial sembradas con asa de Hockey, con el fin de establecer una relación entre la absorbancia y las UFC presentes en una o más colonias aisladas (Figura 10).

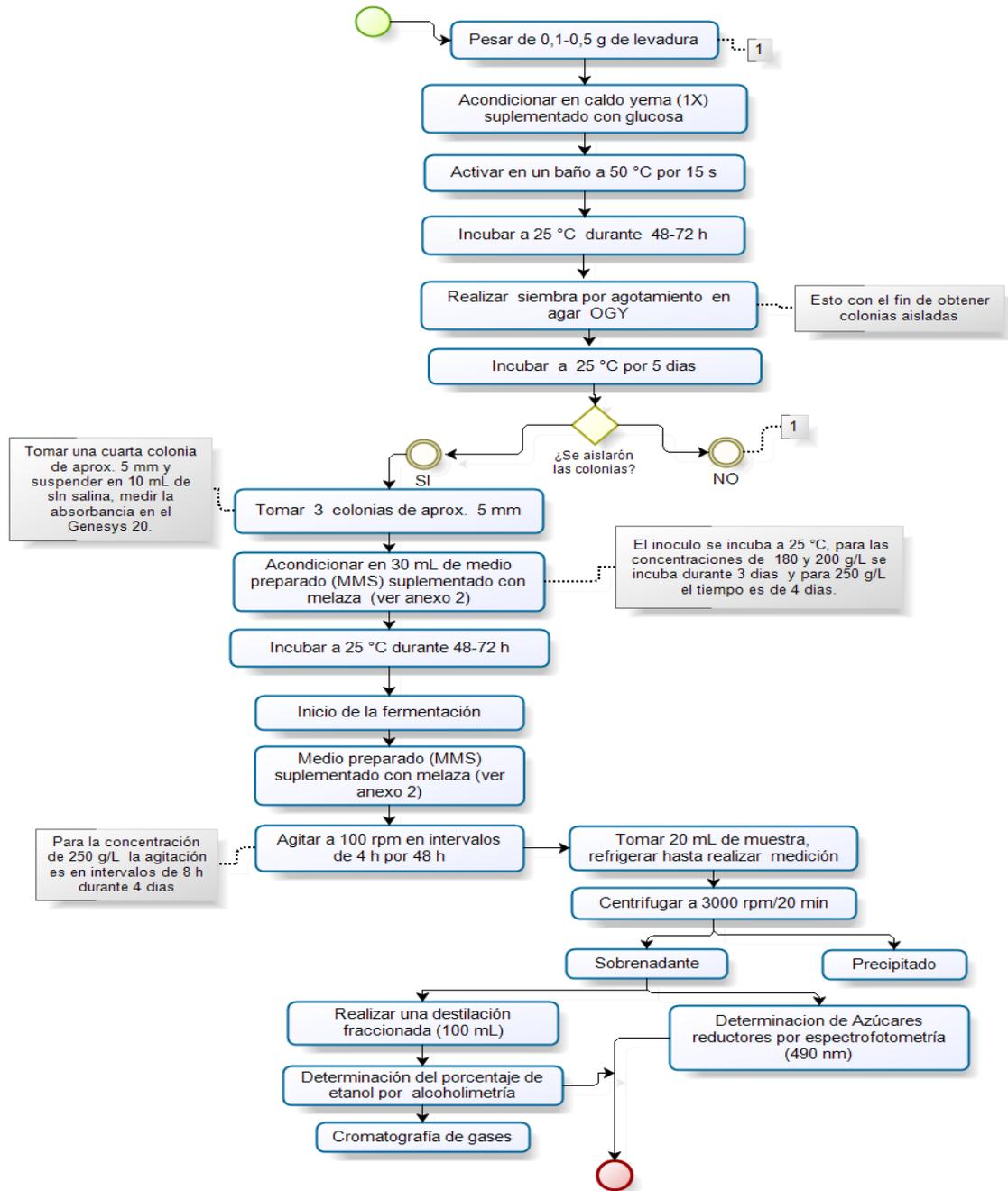
Figura 13. Determinación de la concentración del inóculo



(Autores)

5.5. FERMENTACIÓN.

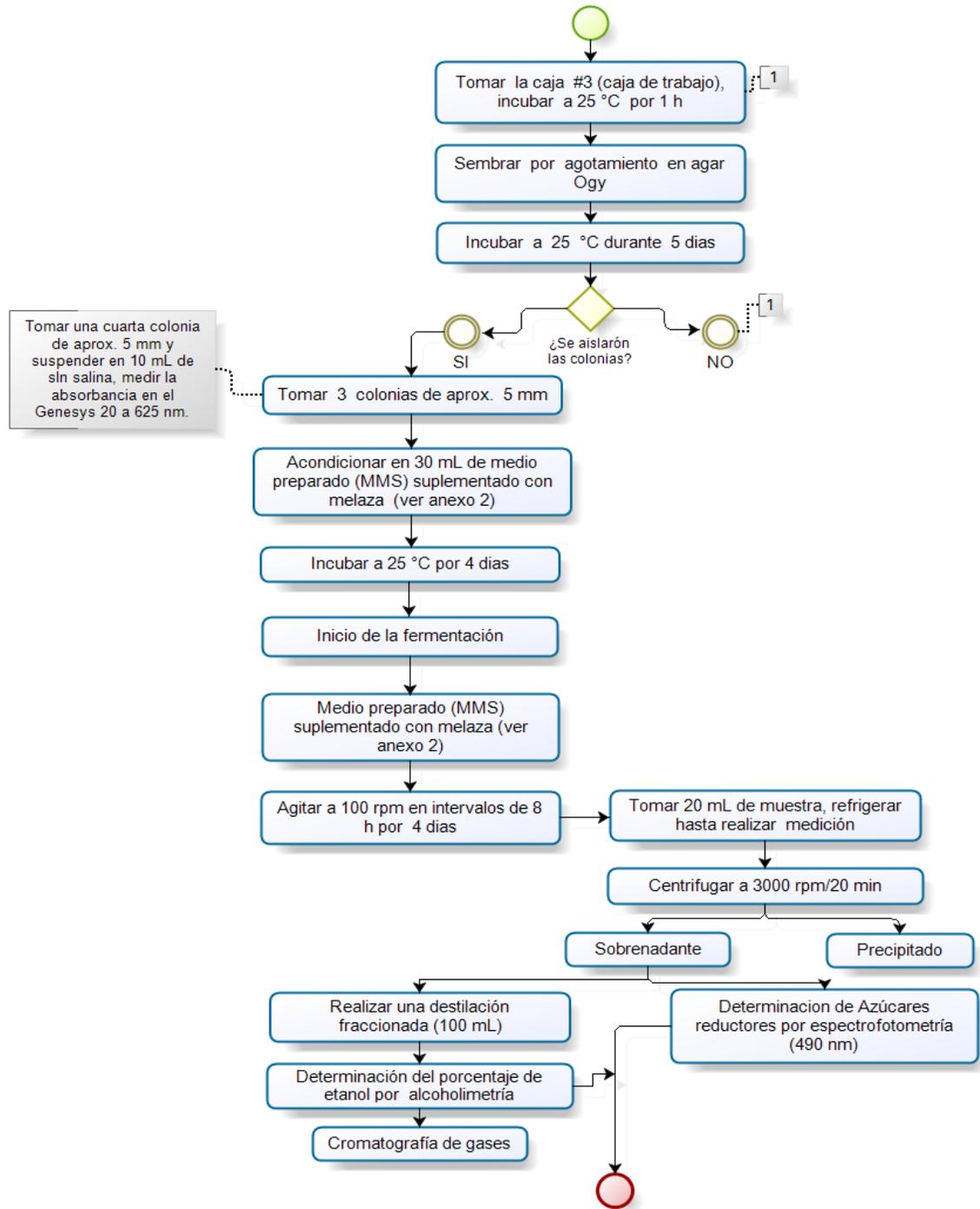
Figura 14. Proceso de Fermentación de melaza para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.



(Autores)



Figura 15. Proceso de Fermentación de melaza para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, 9080 y *Candida utilis* ATCC 9950.

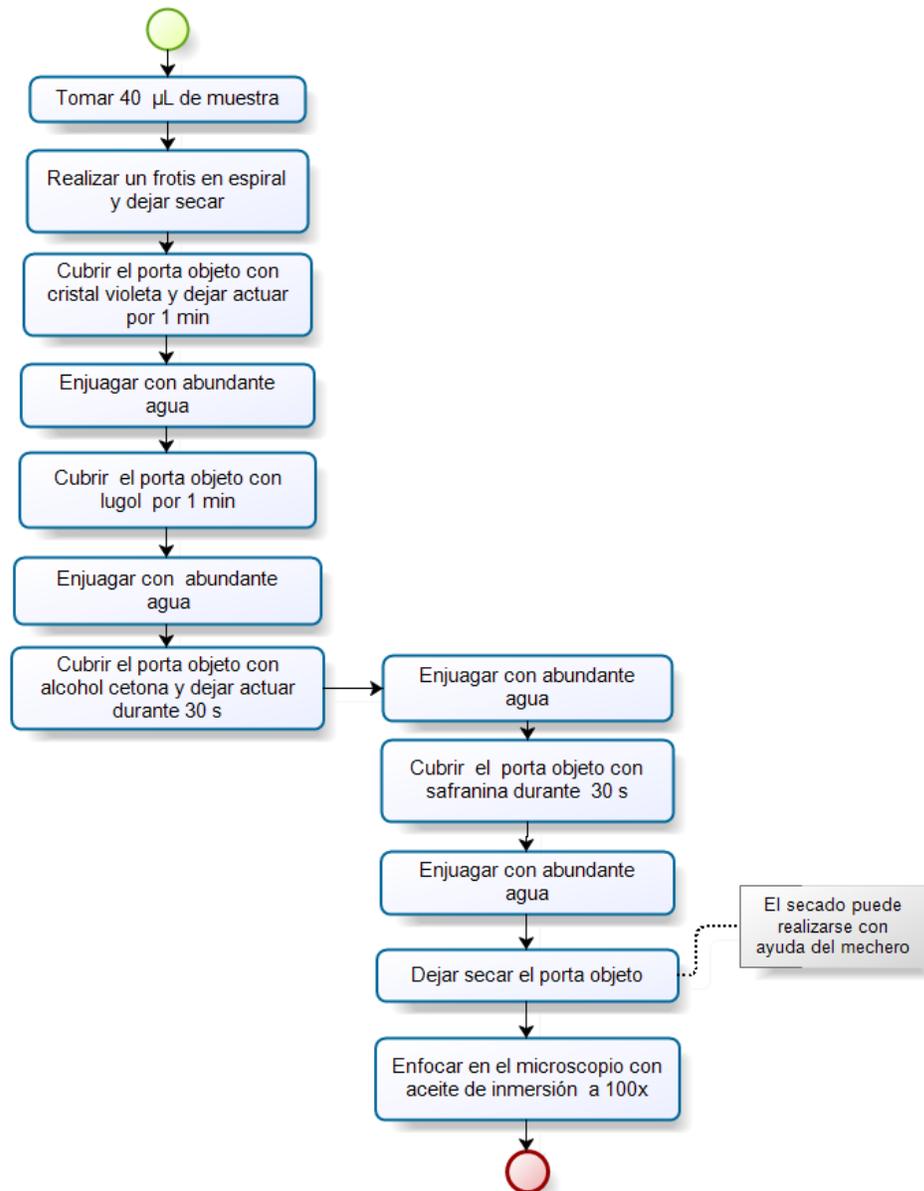


(Autores)

5.6. COLORACIÓN DE GRAM

Se realizaron coloraciones de Gram, cada 8 horas durante el proceso de fermentación con el fin de verificar que el cultivo no esté contaminado y la fermentación este siendo producto de la actividad metabólica de las levaduras.

Figura 16. Coloración de Gram



(Autores)

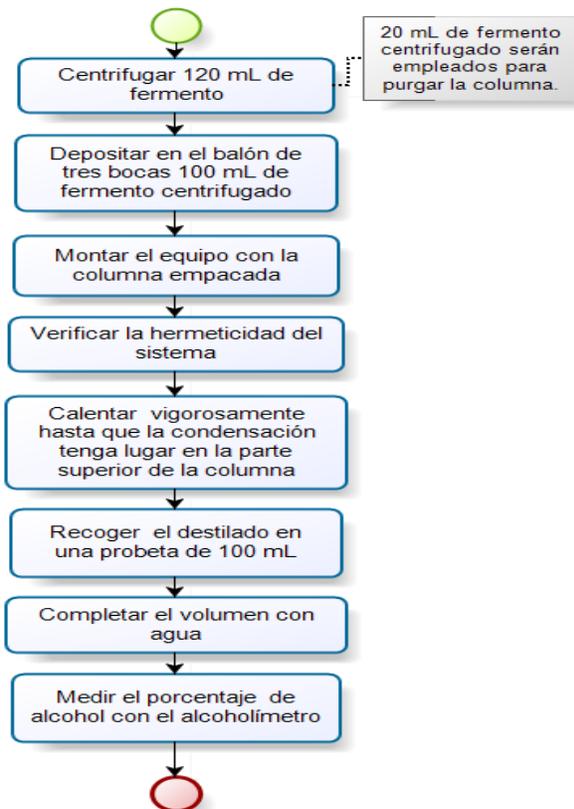
5.7. ANÁLISIS DE AMBIENTES

Se realizó análisis de ambientes realizando conteos para mesófilos en agar Plate Count y para mohos y levaduras en agar Rosa Bengala con el fin de verificar que microorganismos podrían estar contaminando el cultivo en caso de encontrar contaminación en las placas de la coloración de Gram.

5.8. DESTILACIÓN FRACCIONADA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES

5.8.1. Destilación fraccionada. Se realizó destilación fraccionada para 100 mL del fermento centrifugado a 3000 rpm por 20 min una vez finalizado el proceso de fermentación. La destilación se hizo en una columna de relleno de 1 m de alto de 12 platos teóricos, puesto que esta permite una mejor separación con respecto al azeótropo formado por el agua y el etanol.

Figura 17. Destilación fraccionada.



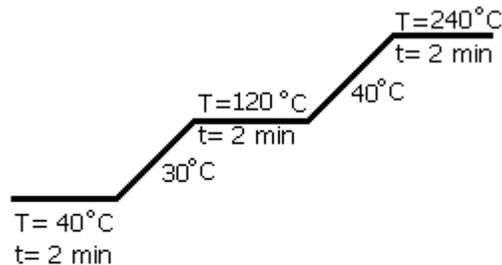
(Autores)



5.8.2. Cromatografía de gases. Para la determinación de la presencia de etanol en el destilado, las muestras fueron corridas por cromatografía de gases utilizando las condiciones que se muestran en la siguiente figura.

Figura 18. Condiciones para el cromatógrafo de gases

**Rampa de calentamiento para la determinación de EtOH
en el destilado**



Temperatura inyector= 180

Temperatura detector=

Volumen de inyección = 2 μ

Gas de arrastre= Helio a 10 psi

Equipo = KONIK INSTRUMENTS HRGC-3000C GAS
CHROMATOGRAPH

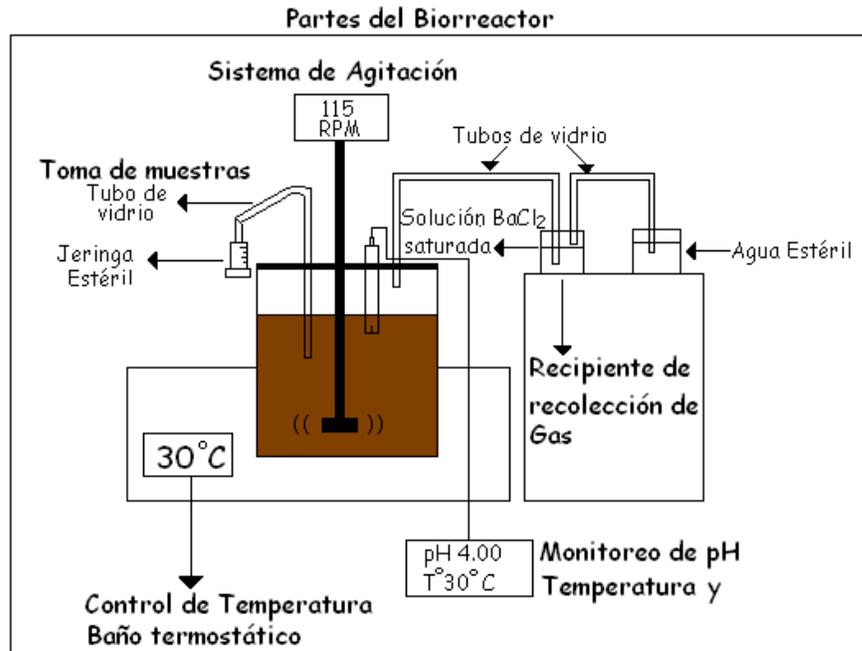
5.9. MONTAJE DEL BIRREACTOR.

Se utilizó un frasco de vidrio de 5 L de capacidad, a la tapa se realizaron perforaciones para introducir el desprendimiento de gas, toma de muestra, agitación mecánica y pH-metro con sensor de temperatura, estos dispositivos fueron adheridos a la tapa en cabina de flujo laminar, para evitar posibles contaminaciones del ambiente y allí mismo fue adicionado el mosto y el inóculo, la tapa del biorreactor se selló herméticamente con silicona para garantizar la anaerobiosis, este fue un proceso por lotes puesto que no hubo adición de nutrientes ni de nueva levadura durante el desarrollo de la fermentación.

El proceso se llevó a cabo en ausencia de luz para ello se construyó un cajón de madera y su parte frontal se cubrió con una tela especial para aislarla, además permaneció durante todo el proceso de fermentación en un baño termostático a

una temperatura de 30 °C. El CO₂ producido se recogió en una solución saturada de BaCl₂.

Figura 19. Partes del Biorreactor.



En la figura anterior se muestran las partes y los materiales con los cuales se llevó a cabo el montaje del biorreactor.

Los tubos de vidrio, mangueras, tapa, frasco, y demás materiales utilizados se esterilizaron previamente al proceso y el electrodo del pH metro se irradio con luz ultravioleta 30 minutos antes del montaje.

Para la toma de la muestra se tomó un tubo de vidrio y se doblo en forma de uno, verificando que el extremo quedara bien sumergido en el mosto y estuviera cerca del sistema de agitación para garantizar que la muestra tomada estuviera bien homogenizada, en el otro extremo del tubo de vidrio se insertó una jeringa estéril para poder llevar a cabo la recolección de las muestras. Estas eran depositadas en tubos de ensayo previamente esterilizados. Antes de la recolección de las



muestras se realizaron aspersiones con alcohol para evitar cualquier contaminación del mosto.

Para la recolección del CO_2 , se tomaron tubos de vidrio y mangueras los cuales iban dirigidos a una solución de BaCl_2 saturada y agua estéril.

El electrodo de pH metro se introdujo en el mosto a un nivel adecuado para garantizar la veracidad de la medida, este dispositivo contaba con sensor de temperatura para verificar que esta fuera la adecuada.

La agitación se realizó por medio de paletas de acero inoxidable, las cuales iban conectadas a un motor que regulaba las revoluciones por minuto, este equipo de agitación es utilizado para el análisis de aguas y es conocido como test de jarras, en este caso se realizaron las adecuaciones necesarias para utilizar el motor y las paletas como sistema de agitación, este se realizó para aumentar el área de contacto entre las levaduras y el sustrato, además de garantizar como se menciono anteriormente que las muestras tomadas fueran homogéneas, para la posterior determinación de los azúcares.

El biorreactor permaneció durante todo el proceso de fermentación en un baño termostático a una temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, el cual se monitoreo dentro del recipiente de vidrio con el sensor de temperatura que tiene el electrodo del pH metro.

Durante los primeros ensayos se introdujeron en la tapa dos jeringas las cuales estaban conectadas con bolsas para suero que contenían ácido láctico y NaOH 1 M, para que en caso de haber variaciones significativas de esta variable se pudieran regular y mantener el pH óptimo en el cual se desarrollan las levaduras, una vez se verifico que no hubieran variaciones drásticas de esta variable estas jeringas fueron retiradas de la tapa.



En la siguiente figura se muestra el montaje del biorreactor en el cual se realizaron los ensayos para llevar a cabo los procesos de fermentación.

Figura 20. Biorreactor.



5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó empleando Microsoft Excel.



6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORBANCIA MÉTODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO.

Se realizó un barrido espectral con el fin de obtener la longitud de onda a la cual el compuesto a determinar presenta la mayor absorbancia.

Figura 21. Barrido espectral método Fenol-Ácido sulfúrico.

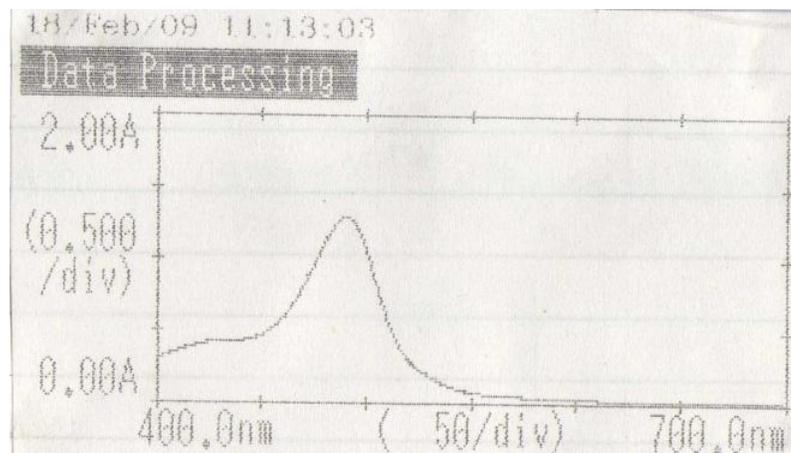


Tabla 3. Barrido espectral método Fenol-Ácido sulfúrico.

Longitud de onda (nm)	Absorbancia
490,5	1,288

6.2. ELABORACIÓN CURVA PATRÓN AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO.

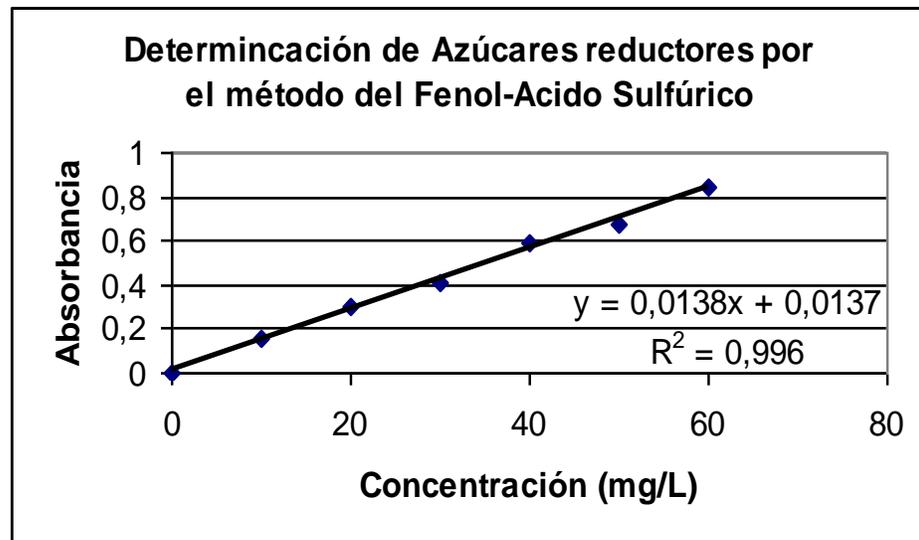
Al realizar la técnica del fenol-ácido sulfúrico se obtuvieron los siguientes resultados:



Tabla 4. Determinación de la curva patrón para azúcares reductores $\lambda = 490$ nm.

Patrón	Concentración de glucosa (mg/L)	Absorbancia
1	0	0
2	10	0,156
3	20	0,307
4	30	0,415
5	40	0,592
6	50	0,676
7	60	0,845

Figura 22. Curva patrón para azúcares reductores $\lambda = 490$ nm.



Como se muestra en la gráfica anterior, el método presenta una correlación de 0,996 a la presencia de azúcares reductores totales, mostrando una relación directa entre la absorbancia y la presencia de los mismos, la formación del complejo es evidente por un color naranja que se hace más intenso a medida que la cantidad de azúcares reductores totales aumenta.

La tendencia de la gráfica es lineal mostrando un índice de correlación de 0.996 con el cual es posible realizar interpolaciones, para posteriormente elaborar la curva de seguimiento de los azúcares reductores totales en el proceso de fermentación.



Este método es muy sensible puesto que a pequeñas variaciones en la concentración de azúcar presenta grandes cambios en la absorbancia, y por ende en el resultado de la concentración por lo cual se debe ser sumamente cuidadoso en el desarrollo del mismo.

6.3. DETERMINACIÓN DE UFC PARA UN NÚMERO DETERMINADO DE COLONIAS AISLADAS SUSPENDIDAS EN SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL.

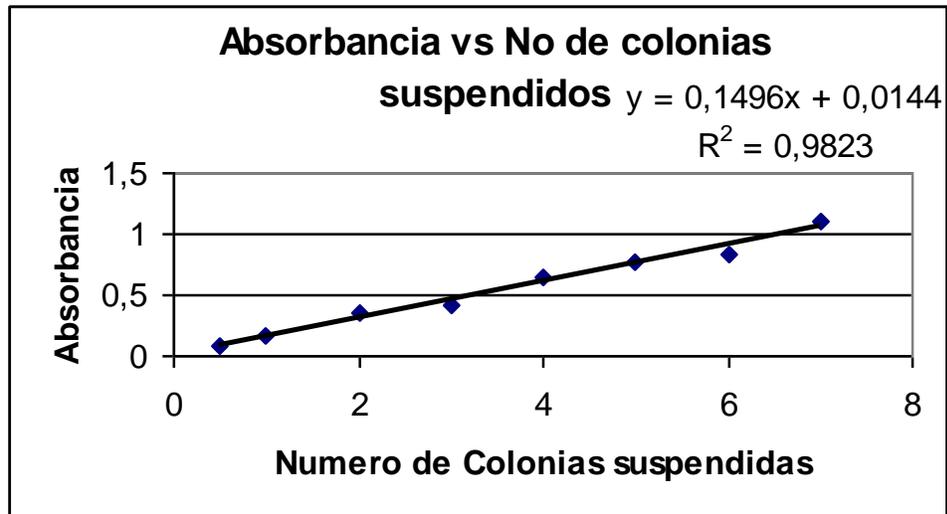
Los procesos de fermentación requieren conteos aproximados de 10^6 - 10^8 UFC/L en el 10% del volumen total del medio, para llevar a cabo dicho proceso. Para determinar este rango se obtuvo una relación entre la absorbancia, número de colonias suspendidas y UFC de las mismas, a continuación se muestran los resultados obtenidos para dichas correlaciones.

Se realizaron siembras por agotamiento en agar OGY con el fin de obtener colonias aisladas. Se seleccionaron colonias medianas midiendo su diámetro para determinar el tamaño promedio de las mismas, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 5. Correlación entre número de colonias suspendidas en S.S.E y absorbancia.

Número de colonias suspendidas	Absorbancia ($\lambda = 625\text{nm}$)
½	0.084
1	0.158
2	0.354
3	0.415
4	0.650
5	0.780
6	0.826
7	1.112

Figura 23. Absorbancia para número de colonias suspendidas en 10mL de solución salina estéril.



Se realizaron diluciones sucesivas para las colonias suspendidas, luego se depositaron 0.1mL y se esparcieron con asa de Hockey en agar OGY por triplicado en superficie, y se determinaron las UFC por medio de conteos, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 6. Correlación entre UFC y absorbancia para colonias suspendidas en S.S.E.

Numero de colonias suspendidas	Absorbancia	UFC/mL
½	0.084	$5.1 \cdot 10^6$
1	0.158	$7 \cdot 10^7$
2	0.354	$3.2 \cdot 10^8$
4	0.650	$1.2 \cdot 10^9$
5	0.780	$2.2 \cdot 10^9$
6	0.826	$7.9 \cdot 10^{10}$

Como resultado se obtuvo un tamaño promedio de colonia de 5 mm con un rango de absorbancia de 0,15-0,25 a una $\lambda = 625$ nm, con el fin de obtener conteos de 10^7 - 10^8 UFC.

6.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MELAZA.

A la melaza a utilizar se realizó análisis microbiológico por medio de la determinación de aerobios mesófilos, mohos, levaduras, esporas aerobias, esporas anaerobias y coliformes totales, con el fin de conocer el estado de la materia prima.

La norma técnica Colombiana NTC 587 reglamenta el estado de las melazas como materia prima para la alimentación animal y para la producción de alcohol y de levaduras, en esta norma se establecen las características de la misma en cuanto a cenizas sulfatadas, azúcares reductores totales, lodos y Brix refractométrico, pero no se tiene una referencia en cuanto a los microorganismos que presentan y sus respectivos límites, por lo tanto se presentara una comparación entre los resultados obtenidos y la norma vigente NTC 607 para el azúcar crudo, puesto que la melaza de caña proviene directamente de el proceso de la elaboración del azúcar.

Tabla 7. Requisitos microbiológicos para el azúcar crudo según NTC 607.

Requisitos microbiológicos del azúcar crudo	
Microorganismo	Límite
Coliformes Totales (NMP/g)	< 3
Bacterias mesófilas aerobias (UFC/g)	<5000
Mohos y levaduras (UFC/g)	<2000

Tabla 8. Reporte análisis microbiológico de la melaza.

Microorganismo	Método	Reporte
A. Mesófilos	Recuento en placa profunda	$20 \cdot 10^2$ (UFC/g)
Mohos y Levaduras	Recuento en placa profunda	$29 \cdot 10^1$ (UFC/g)
E. Aerobias	Recuento en placa profunda	$16 \cdot 10^1$ (UFC/g)
E. anaerobias	Recuento en placa profunda	$11 \cdot 10^1$ (UFC/g)
Coliformes totales	NPM	<3 (NPM/g)

En comparación con la norma NTC 607 la melaza a utilizar cumple con los conteos para Bacterias aerobias mesófilas, mohos, levaduras y coliformes totales.



Para esporas aerobias y anaerobias no se encuentra reglamentación relacionada con este tipo de producto.

Puesto que la melaza cumple con la norma se puede garantizar el buen estado microbiológico de la materia prima a utilizar.

6.5. SACCHAROMYCES CEREVISIAE SILVESTRE (LEVAPAN).

6.5.1. Identificación macroscópica de colonias *Saccharomyces cerevisiae* silvestre (Levapan). Al hacer siembras por agotamiento en agar OGY se obtuvieron las siguientes colonias aisladas.

Figura 24. Identificación macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* silvestre



(Autores)

Descripción Macroscópica:

Colonias blancas, cremosas, húmedas, brillantes bordes irregulares y convexas.

6.5.2. Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a diferentes concentraciones y determinación del porcentaje de etanol. Se evaluaron concentraciones de 180 g/L, 200 g/L y 250 g/L con el fin de determinar cuál de estas es la que presenta mayor porcentaje de etanol.

Para la preparación del inóculo en cada ensayo, se tomo una colonia aislada de aprox. 5 mm de diámetro, se suspendió en 10 mL de S.S.E y se le midió la absorbancia a 625 nm utilizando un fotómetro Genesys 20.



6.5.2.1. Concentración de 180g/L.

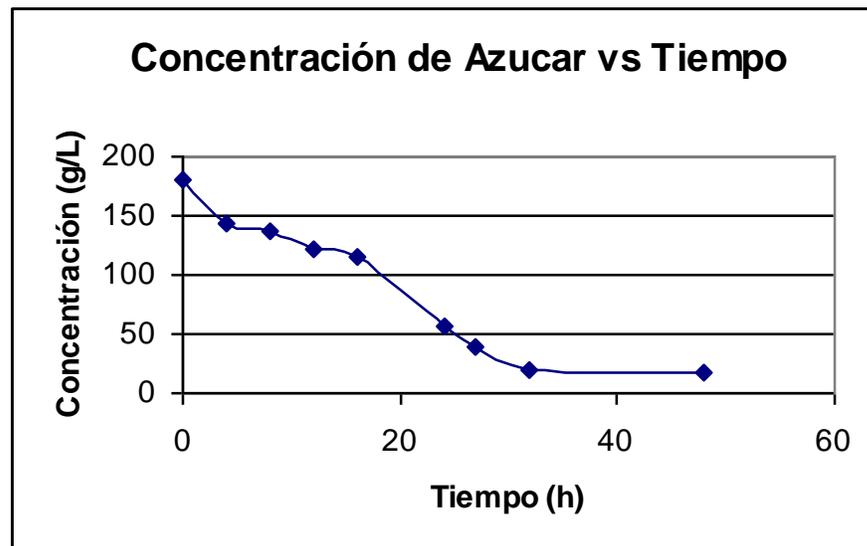
- Ensayo 1.

Absorbancia inoculo= 0,210

Tabla 9. Ensayo 1 Concentración 180g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	180	0,760	3/10000
4	142,58	0,604	3/10000
8	138	0,585	3/10000
12	121,33	0,516	3/10000
16	114,32	0,487	3/10000
24	55,6	0,781	1/1000
27	38,64	0,547	1/1000
32	20,6	0,298	1/1000
48	16,98	0,248	1/1000

Figura 25. Seguimiento de azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 180 g/L.



Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 180 g/L se obtuvo es siguiente resultado.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 4 %

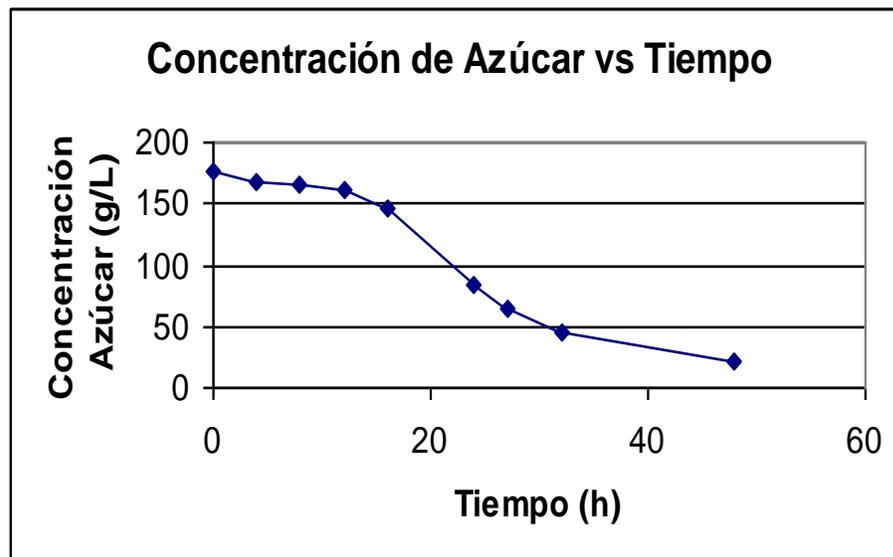
- Ensayo 2

Absorbancia inoculo= 0,189

Tabla 10. Ensayo 2 concentración 180 g/L

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	175,92	0,742	3/10000
4	168,19	0,71	3/10000
8	165,53	0,699	3/10000
12	161,18	0,681	3/10000
16	145,97	0,618	3/10000
24	83,89	0,361	3/10000
27	64,08	0,279	3/10000
32	44,37	0,626	1/1000
48	20,82	0,301	1/1000

Figura 26. Seguimiento Azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 180 g/L.



Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 180 g/L se obtuvo es siguiente resultado



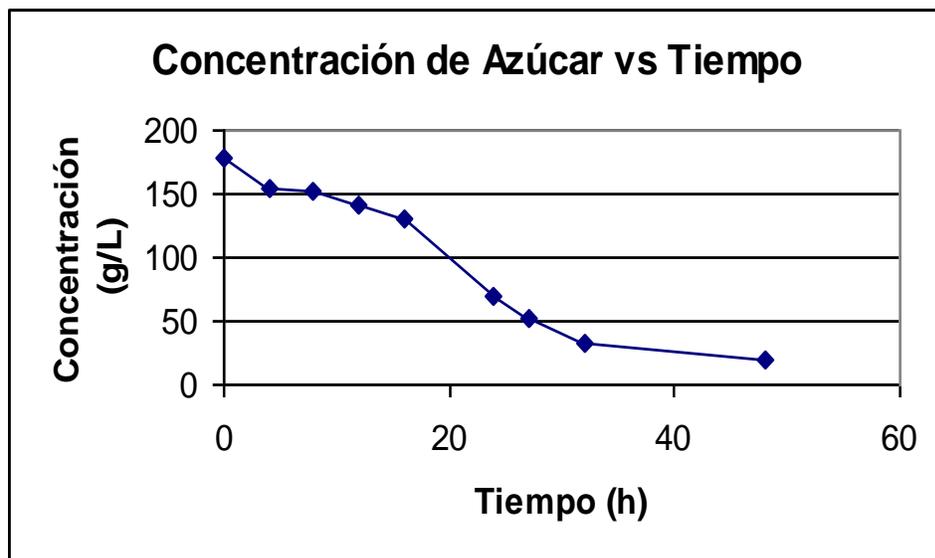
Porcentaje de etanol (%v/v) = 5 %

- Promedio Concentración 180 g/L.

Tabla 11. Promedio concentración 180 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)
0	177,96
4	155,385
8	151,765
12	141,255
16	130,145
24	69,745
27	51,36
32	32,485
48	18,9

Figura 27. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 180g/L.



Como se observa en la grafica, durante las primeras 16 h del ensayo la levadura no ha metabolizado cantidades apreciables de azúcar por la cantidad de levadura presente, considerando que en este periodo la población de microorganismo se



encuentra en fase de latencia; debido a que el inóculo fue transferido a un medio fresco; como muestra la grafica este periodo es corto debido a que el inóculo tuvo un periodo de acondicionamiento previo en 30 mL del medio mínimo de sales suplementado con melaza. Después de este periodo se da la fase exponencial, en donde las células en crecimiento están en el estado fisiológico más sano y la fermentación de la melaza es notoria ya que se generan grandes cantidades de gas y espuma (factores usados para el seguimiento del proceso); además presenta disminución en forma lineal de la concentración de azúcares hasta las 32 h. A medida que transcurre el tiempo y la cantidad de microorganismo aumenta debido a las condiciones favorables del medio y la caída de azúcares es mayor, se genera así un limitante para el proceso fermentativo, considerando que el sistema usado para este proceso es por batch, por ello entre las 32 h y 48 h del ensayo se observa como la tendencia de la curva es a mantenerse constante indicando que la población de levadura está entrando en fase estacionaria, por lo que se detiene el proceso de fermentación considerando además que la producción de gas y espuma ha cesado y la concentración de azúcares a partir de esta hora es de 18,9 g/L.

Por lo tanto el tiempo óptimo de fermentación para una concentración de 180 g/L de melaza es de 48 h.

Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 180 g/L se obtuvo es siguiente resultado

Porcentaje de etanol (%v/v) = 4.5 %

El porcentaje de alcohol obtenido para esta concentración es bajo; considerando que la concentración trabajada se encuentra el rango óptimo de concentración de azúcares (10% - 18%), pero esto se pudo deber a la cantidad de inóculo usado para el proceso, por ello el proceso fermentativo se evaluará a concentraciones mayores.



6.5.2.2. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 180 g/L. El Fermentado obtenido se destilo en una columna fraccionada, y esta muestra fue corrida por cromatografía de gases en el equipo KONIK HRGC-3000 C (ver figura 28).

Para analizar el cromatograma obtenido, y verificar la presencia de etanol y descartar la presencia de otras sustancias por posibles desvíos en la ruta de fermentación se corrió una muestra de etanol absoluto y de metanol analítico bajo las mismas condiciones de la muestra del fermentado.

Como se observa en el cromatograma del etanol absoluto (ver figura 29) el tiempo de retención es de 1.083 minutos, para el destilado el tiempo de retención es de 0.850 minutos y para el metanol (ver figura 30) el tiempo de retención es de 0.60 minutos por lo tanto podemos atribuir la presencia de etanol en el destilado por mostrar tiempos de retención cercanos, condiciones óptimas para la producción de etanol y el proceso de destilación se dio a una temperatura de ebullición de aproximadamente 78 °C (el aumento en la temperatura de ebullición del etanol se debe a la presencia de sólidos disueltos); de la misma forma podemos concluir que el destilado no presenta otros compuestos orgánicos puesto que en el mismo no se observan picos importantes y teniendo en cuenta que el detector utilizado FID es muy sensible para compuestos orgánicos.



Figura 28. Cromatograma para el etanol obtenido por fermentación a una concentración de 180 g/L.

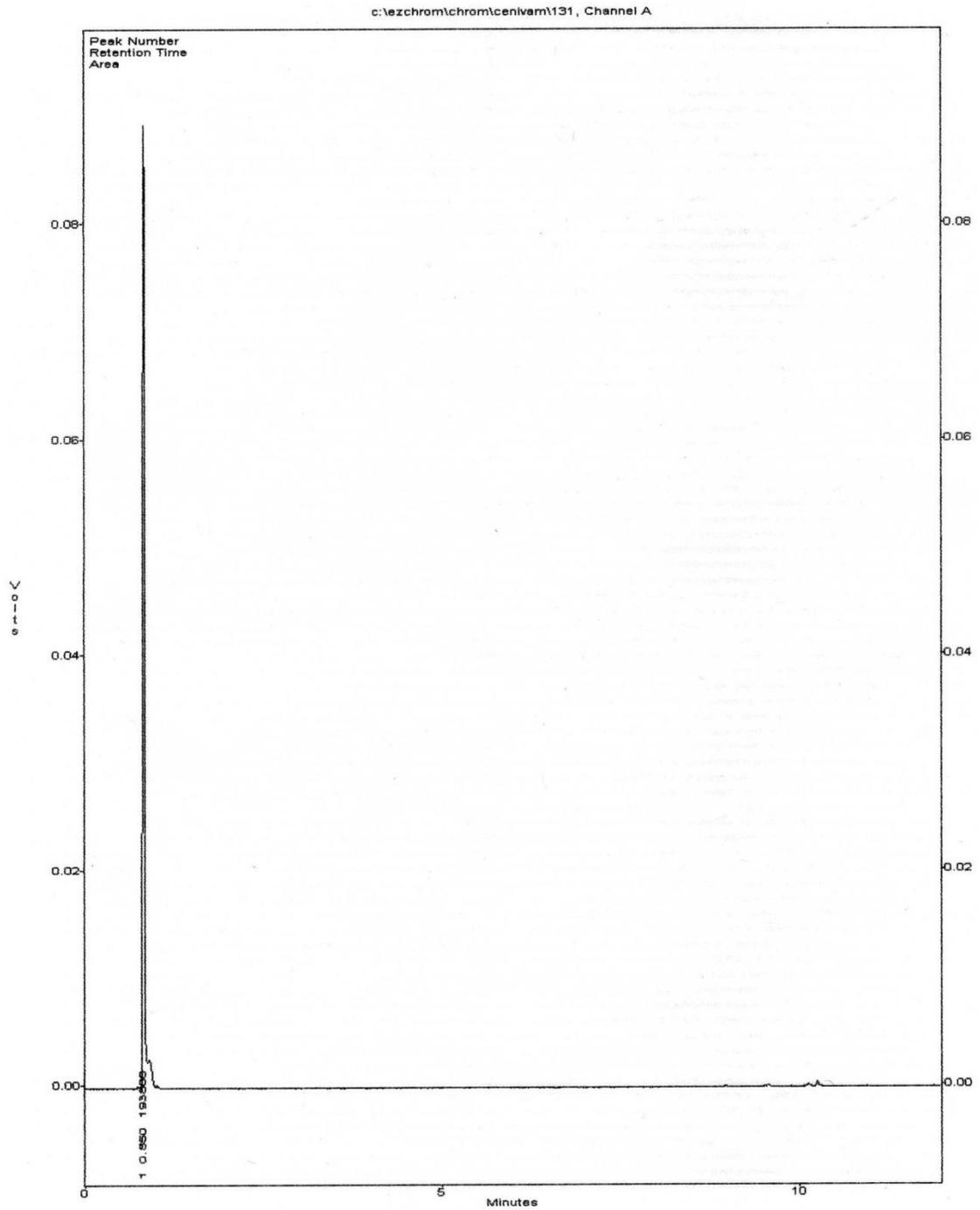




Figura 29. Cromatograma para el etanol absoluto.

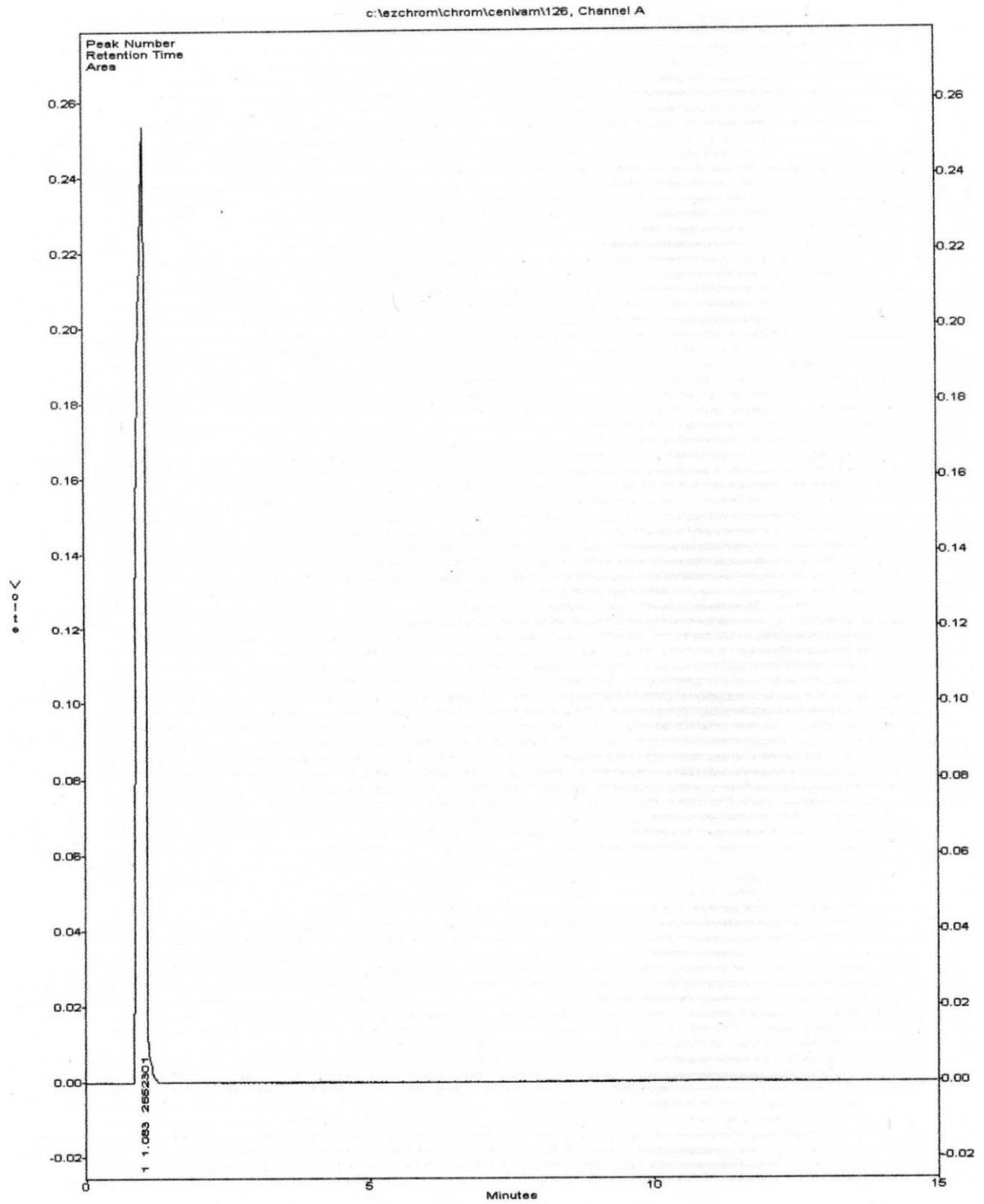
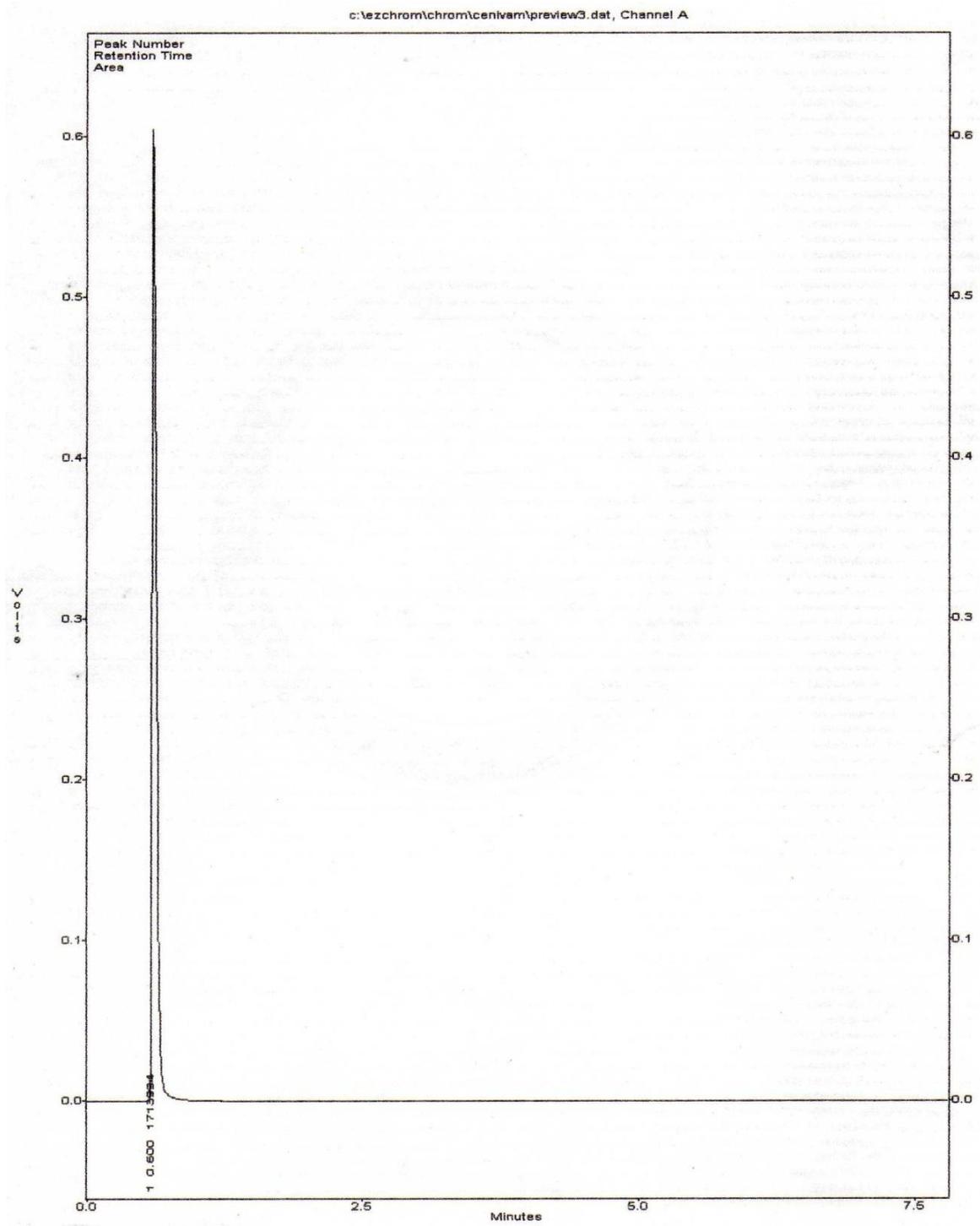




Figura 30. Cromatograma metanol analítico.





6.5.2.3. Concentración 200 g/L.

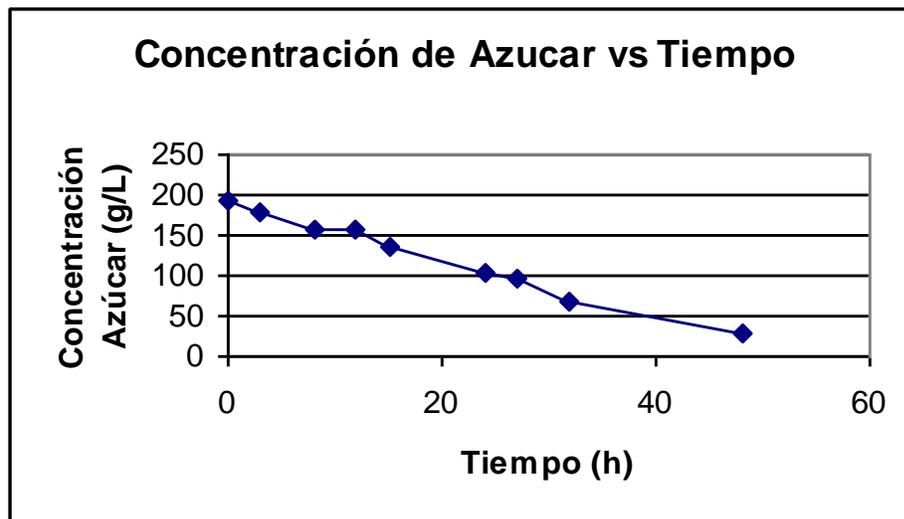
- Ensayo 1

Absorbancia inoculo= 0,202

Tabla 12. Ensayo 1 concentración 200 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	193,71	0,682	1/4000
3	179,22	0,632	1/4000
8	158,06	0,559	1/4000
12	155,74	0,551	1/4000
15	136,61	0,485	1/4000
24	104,72	0,375	1/4000
27	98,06	0,352	1/4000
32	66,27	0,242	1/4000
48	29,66	0,423	1/1000

Figura 31. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 200 g/L.



Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 200g/L se obtuvo es siguiente resultado



Porcentaje de etanol (%v/v) = 5 %

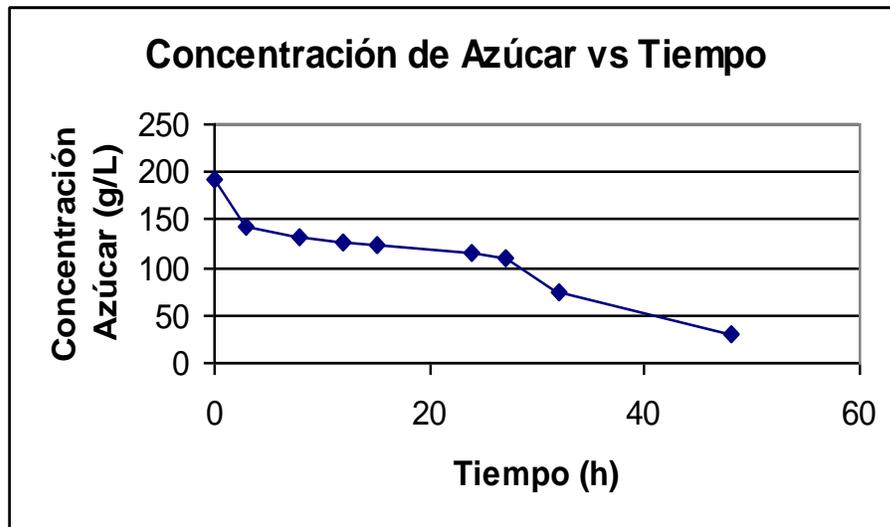
- Ensayo 2.

Absorbancia inoculo= 0,161

Tabla 13. Ensayo 2 concentración 200 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	193,13	0,68	1/4000
3	143,86	0,51	1/4000
8	133,13	0,473	1/4000
12	126,46	0,45	1/4000
15	124,14	0,442	1/4000
24	115,16	0,411	1/4000
27	109,36	0,391	1/4000
32	74,87	0,272	1/4000
48	30,96	0,441	1/1000

Figura 32. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 200 g/L.





Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 200g/L se obtuvo el siguiente resultado

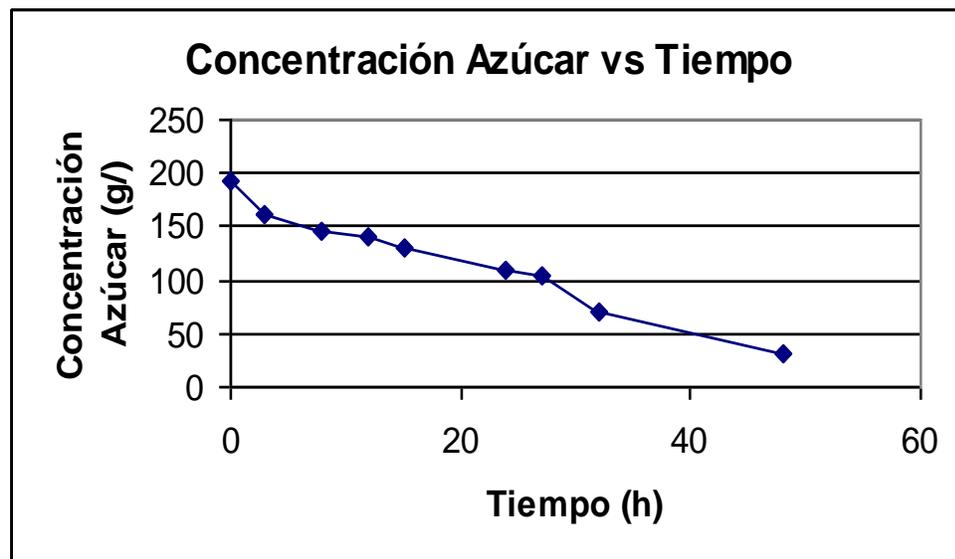
Porcentaje de etanol (%v/v) = 6 %

- **Promedio de 200 g/L**

Tabla 14. Promedio concentración 200 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)
0	193,42
3	161,54
8	145,595
12	141,1
15	130,375
24	109,94
27	103,71
32	70,57
48	30,31

Figura 33. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 200 g/L.



Como se observa en la gráfica la concentración de azúcares disminuye con respecto al tiempo, en la primera parte hasta aproximadamente las 15 h de



fermentación la levadura no ha metabolizado grandes cantidades de azúcar por el número de microorganismo presente, esto se debe a que en este punto están superando la fase de latencia, es decir el reconocimiento del medio mínimo de sales enriquecido con melaza en el que se encuentran. Transcurrido este tiempo y hasta las 24 h el número de microorganismo aumentan puesto que ya han entrado en fase exponencial por lo cual se observa una rápida degradación del azúcar presente en el medio, posiblemente hasta las 48 horas las levaduras entran en fase estacionaria y posteriormente de muerte puesto que la caída de los azúcares empieza a disminuir notoriamente en comparación con las horas anteriores, por lo cual en este punto se da por terminada la fermentación.

La caída de azúcares durante toda la gráfica es de forma irregular este puede deberse a que la cantidad de azúcar a aumentado en comparación al ensayo anterior, y considerando un aumento en la concentración de azúcar puede empezar a afectar el proceso de ósmosis en las células de la levadura y generando también problemas en su proceso de respiración celular. Por otro lado; a medida que el tiempo transcurre el pH comienza a disminuir debido a un aumento en la producción de ácidos formados durante el proceso, puesto que las células de las levaduras, toman los nitrógenos de los aminoácidos y estos pierden así su carácter anfótero, trayendo como consecuencia una disminución del pH.

De la misma manera al aumentar el tiempo de fermentación es de esperarse una disminución de los nutrientes puesto que el número de células presentes en el medio aumentan por lo cual es posible que se presenten deficiencias en su crecimiento y en la síntesis de los tejidos celulares.

El proceso se dejó hasta un valor de 30.31 g/L, en este punto se detuvo la fermentación debido a que no se presentaba burbujeo ni espuma, tomando esta observación como parámetro para la determinación del tiempo óptimo, puesto que la producción de CO₂ es directamente proporcional a la producción de etanol.



Al determinar el porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 200 g/L se obtuvo el siguiente resultado

$$\text{Porcentaje de etanol (\%v/v)} = 5.5 \%$$

En comparación con el porcentaje de etanol obtenido para la concentración anterior se puede afirmar que la levadura tolera una concentración de 200 g/L y un porcentaje de alcohol del 6%, con lo cual se concluye que el proceso anterior se frenó posiblemente por un agotamiento en los nutrientes o en la concentración de azúcar y no por la presencia de este porcentaje de alcohol. Debido a estos resultados se evaluará una concentración superior de azúcares para determinar si la levadura tolera un aumento en la concentración de este y por ende muestra un aumento en el porcentaje de alcohol.

6.5.2.4. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 200 g/L. El Fermentado obtenido se destiló en una columna fraccionada, y esta muestra fue corrida por cromatografía de gases en el equipo KONIK HRGC-3000 C (ver Anexo 2).

Al comparar los tiempos de retención obtenidos para el etanol absoluto, metanol analítico y el destilado obtenido, podemos concluir la presencia de etanol en el cromatograma para esta muestra, debido a la cercanía en los tiempos de retención, puesto que para el etanol absoluto es de 1.085 (ver figura 29), para el metanol analítico es de 0.60 (ver figura 30) y para la muestra es de 0.950 (ver Anexo 2); considerando además que la muestra presentó una temperatura de ebullición de 78 °C; de la misma manera podemos descartar la presencia de altas concentraciones de otros compuestos orgánicos, puesto que en el cromatograma no se detectan picos importantes y teniendo en cuenta que el detector utilizado FID es muy sensible para compuestos orgánicos.



6.5.2.5. Concentración 250 g/L.

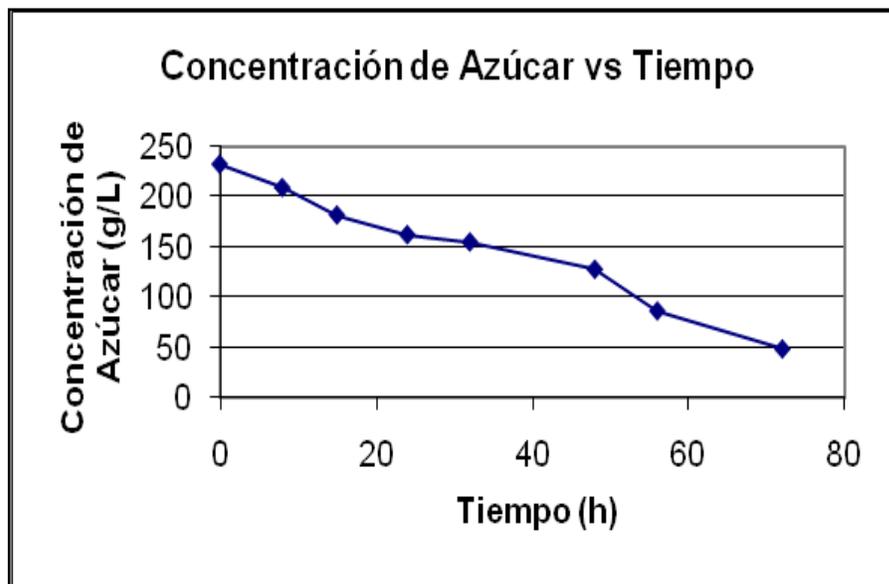
- Ensayo 1

Absorbancia=0.174

Tabla 15. Ensayo 1 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	231,99	0,654	1/4000
8	208,8	0,59	1/4000
15	181,63	0,515	1/4000
24	162,07	0,461	1/4000
32	154,82	0,441	1/4000
48	127,64	0,366	1/4000
56	86,34	0,252	1/4000
72	48,66	0,148	1/4000

Figura 34. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 6 %



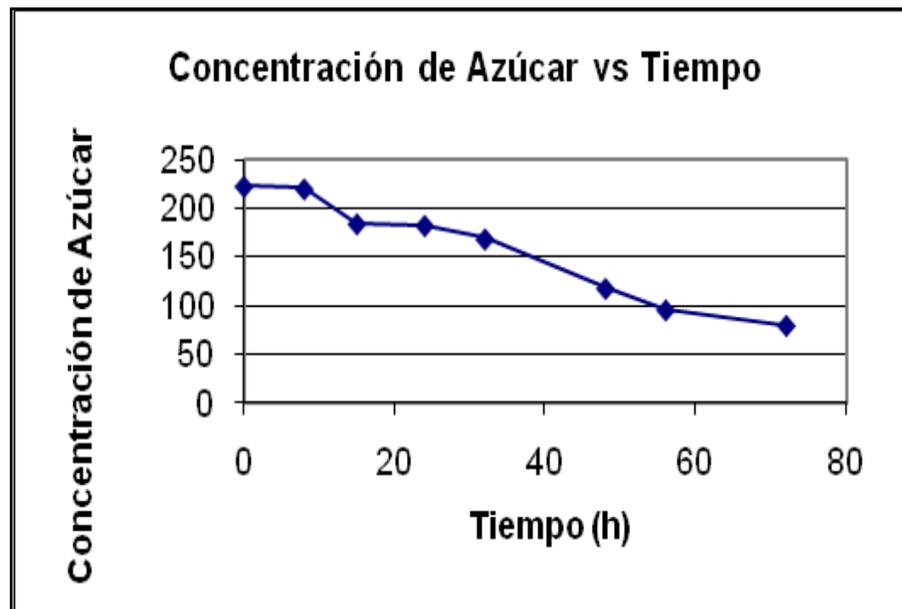
- **Ensayo 2**

Absorbancia= 0.196

Tabla 16. Ensayo 2 concentración 250 g/L

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	222,57	0,628	1/4000
8	220,04	0,621	1/4000
15	184,17	0,522	1/4000
24	182,36	0,517	1/4000
32	168,59	0,479	1/4000
48	117,86	0,339	1/4000
56	95,76	0,278	1/4000
72	79,82	0,234	1/4000

Figura 35. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 7 %

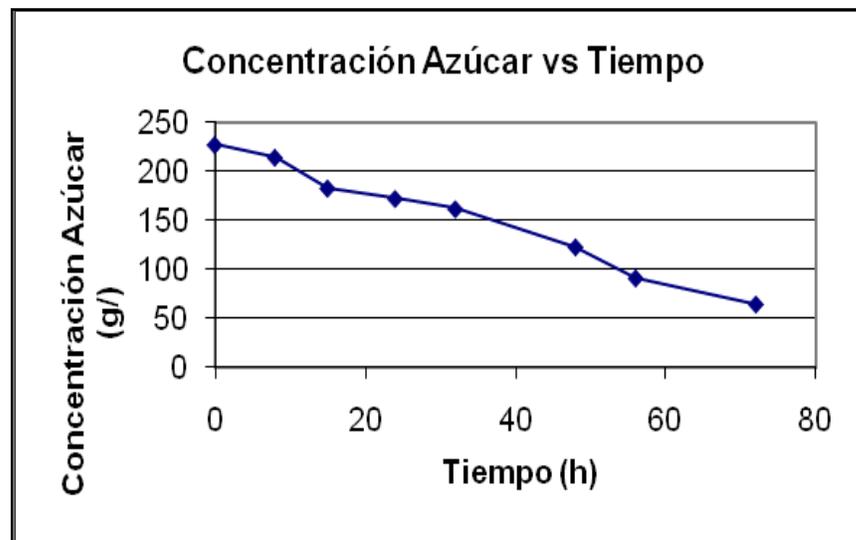
- **Promedio de 250 g/L**



Tabla 17. Promedio Concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)
0	227,28
8	214,42
15	182,9
24	172,215
32	161,705
48	122,75
56	91,05
72	64,24

Figura 36. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Como se observa en la gráfica la concentración de azúcares disminuye con respecto al tiempo, en la primera parte de la gráfica hasta aproximadamente las 8 h de fermentación la levadura no ha metabolizado grandes cantidades de azúcar por el número de células presentes esto teniendo en cuenta que están superando su fase de latencia lo cual se observa en una caída leve de los azúcares, esto se debe a que la concentración de azúcar es mayor por lo que las levaduras requieren mayor tiempo para acondicionarse al medio puesto que un aumento de esta puede generar problemas de osmosis y de respiración celular. Por lo cual el



inóculo para este ensayo conto con un día más de acondicionamiento previo a la fermentación. Desde las 8 h hasta las 56 horas se observa una caída rápida de los azúcares puesto que las levaduras han entrado a la fase exponencial, lo cual representa mayores cantidades de la misma y como consecuencia mayor consumo de azúcar y desde las 56 horas y hasta las 72 horas se observa una disminución en el consumo de azúcar lo cual puede deberse que en este punto de la fermentación las levaduras ya entraron a la fase estacionaria y posteriormente a la fase de muerte.

A diferencia de las concentraciones anteriores en los cuales el tiempo de fermentación total era de 48 h, para la concentración de 250 g/L se decidió un tiempo de fermentación de 72 h, debido a que a las 48 h la concentración de azúcares era aun alta, presentando un valor de 122.75 g/L.

A las 72 h se observó la ausencia de burbujeo y espuma por lo cual se decidió frenar la fermentación. Además de estos parámetros la concentración de azúcar a las 72 horas era de 62,24 g/L, es decir que en este punto todavía había suficiente azúcar para degradar, por lo tanto en este caso la detención del proceso de fermentación posiblemente se presentó por la concentración de alcohol que se produjo inhibiendo así procesos vitales principalmente en la membrana de la célula.

Para esta concentración podemos observar como la levadura tolero este aumento de azúcares en el medio mínimo de sales y aumentó el porcentaje de alcohol como era de esperarse, aunque algunas referencias bibliográficas (Ríos, *et al.* 2005) reportan que a 250 g/L el proceso de respiración celular es defectuoso y por ende la producción de alcohol, como vemos en la gráfica a las 15 h la concentración de azúcar a disminuido a 182,9 g/L, entrando así en el rango óptimo, esto pudo deberse a que el inóculo tubo un día más de acondicionamiento en este medio, demorándose menos para entrar en fase exponencial, lo que facilito la disminución rápida de los azúcares y llevo a que las células de la



levadura degradaran de manera rápida la cantidad de azúcar presente y estuvieran en un rango óptimo en poco tiempo superando las dificultades de la respiración y produciendo así un buen porcentaje de alcohol.

Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 250 g/L se obtuvo el siguiente resultado

Porcentaje de etanol (%v/v) = 6.5 %

El porcentaje de alcohol obtenido para esta levadura es bueno teniendo en cuenta que esta es utilizada principalmente para la producción de pan y no de alcohol. Su poca capacidad fermentativa puede deberse a que posiblemente su membrana celular no presenta alto contenido de ácidos grasos insaturados y la longitud de las cadenas carbonadas no es la necesaria para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol.

6.5.2.6. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 250 g/L. El fermentado obtenido se destiló en una columna fraccionada, y esta muestra fue corrida por cromatografía de gases en el equipo KONIK HRGC-3000 C (ver Anexo 3).

Como se observa en el cromatograma la muestra presenta un tiempo de retención de 0.892 minutos; el cual tiene similitud con el tiempo de retención mostrado para el etanol absoluto de 1.083 (ver figura 29) y se descarta la presencia de metanol puesto que el tiempo de retención para este 0.60 (ver figura 30) está más alejado que el de la muestra, además la temperatura de ebullición del fermento fue de 78 °C lo que se atribuye a la presencia del etanol, de la misma forma se descartan otros compuestos orgánicos en la muestra, puesto que no se observa la presencia de picos importantes en el cromatograma, teniendo en cuenta que el detector utilizado FID es muy sensible para compuestos orgánicos.



6.5.2.7. Consumo total de azúcares para la *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Tabla 18. Consumo azúcares de cada ensayo a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre. .

Concentración (g/L)	Consumo Total de Azúcares (g/L)		Promedio (g/L)	Desviación Estándar (g/L)
	Ensayo 1	Ensayo 2		
180	163,02	155,10	159,06	5,60
200	164,05	162,17	163,11	1,33
250	183,33	142,75	163,04	28,69

En la tabla anterior se muestran las desviaciones estándar para el consumo total de azúcares para cada ensayo. Para las concentraciones de 180 y 200 g/L las desviaciones estándar calculadas no son muy altas, lo que muestra que los ensayos se comportaron de forma similar; a diferencia de la concentración de 250 g/L, en la que la desviación estándar es muy alta, esto puede deberse a que la cantidad de inóculo varía en cada ensayo ya que el número de UFC/L óptimo para la fermentación se encuentra en un rango de 10^6 - 10^8 UFC/L y no en un valor exacto, lo cual puede generar un error.

6.5.2.8. Porcentaje de alcohol obtenido para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Tabla 19. Porcentaje de Alcohol Obtenido en cada ensayo a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Concentración g/L	% Alcohol Obtenido (V/V)		Promedio (% V/V)	Desviación Estándar (% V/V)
	Ensayo 1	Ensayo 2		
180	4	5	4,5	0,71
200	5	6	5,5	0,71
250	6	7	6,5	0,71



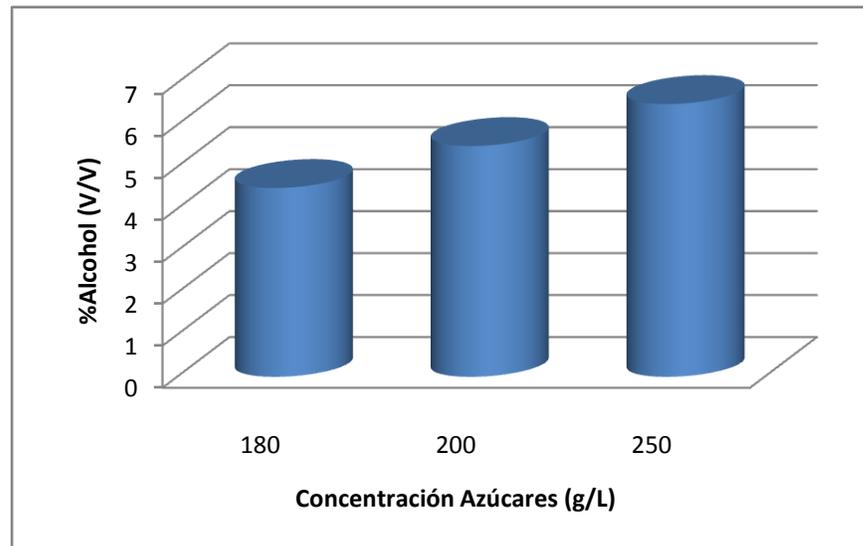
La tabla 19 muestra las desviaciones estándar para los porcentajes de alcohol obtenidos en cada concentración, éstas muestran un valor bajo e igual para las diferentes concentraciones; esto se debe a que el aumento en los porcentajes de etanol obtenido en cada ensayo es de una unidad porcentual.

6.5.2.9. Comparación % etanol obtenido a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Tabla 20. Comparación % Etanol obtenido a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre

Concentración g/L	% Alcohol Obtenido (V/V)
180	4,5
200	5,5
250	6,5

Figura 37. Comparación % etanol obtenido a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.



Como se observa en la grafica la concentración de alcohol es proporcional a la cantidad de azúcares en el medio, mostrando el mayor porcentaje de alcohol con un valor del 6,5% en promedio a la concentración de 250 g/L de azúcares



reductores totales, tolerando así esta condiciones para el proceso de fermentación. Con base en este resultado las cepas certificadas se evaluarán a esta concentración por presentar el mayor porcentaje de alcohol, y teniendo en cuenta que son cepas utilizadas en procesos de fermentación alcohólica por lo que se espera obtener mayores porcentajes de alcohol.

6.5.2.10. Comparación Etanol Obtenido vs Etanol Teórico a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre. Según la Universidad Nacional de Colombia (guías de fermentación) para determinar el rendimiento en el proceso de fermentación con base a la masa de melaza utilizada se emplea la siguiente relación.

100 Kg de melaza —————> 33 L de etanol
--

Tabla 21. Alcohol obtenido en cada ensayo a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Concentración g/L	% Alcohol Obtenido (V/V)		Alcohol Obtenido (L)		Alcohol Teórico (L)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	
180	4	5	0,120	0,150	0,178
200	5	6	0,150	0,180	0,218
250	6	7	0,180	0,210	0,272

Tabla 22. % Rendimiento para cada ensayo a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Concentración g/L	% Rendimiento		Promedio	Desviación Estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
180	67,42	84,27	75,84	11,92
200	68,81	82,57	75,69	9,73
250	66,18	77,21	71,69	7,80

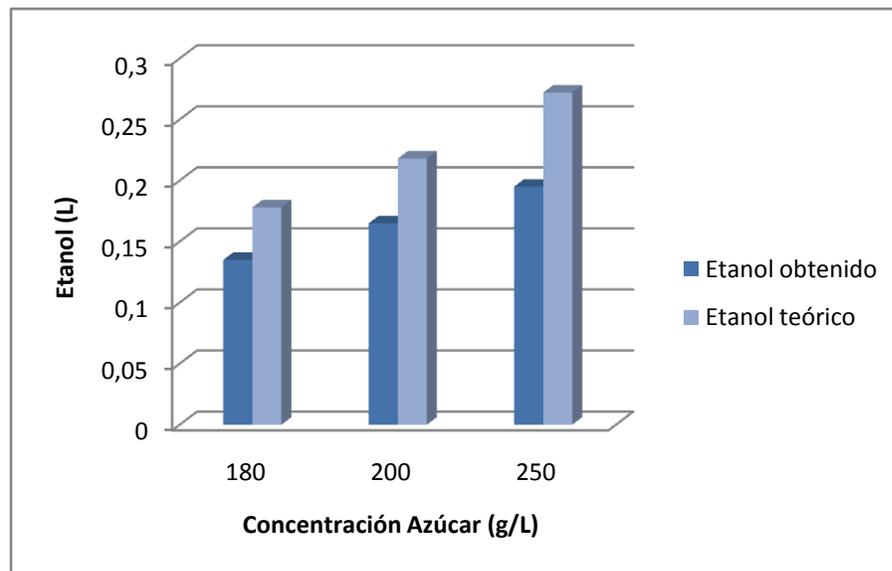


La tabla anterior presenta las desviaciones estándar calculadas para el porcentaje de rendimiento de alcohol obtenido para cada concentración, estos valores son altos debido a que los litros de etanol obtenidos se alejan de la cantidad en litros del etanol teórico, esto puede deberse a que la cepa utilizada en estos ensayos (*Saccharomyces cerevisiae* silvestre) no es usada para la producción de alcohol y por ende presenta bajos rendimientos.

Tabla 23. Comparación etanol obtenido vs etanol teórico a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.

Concentración (g/L)	Melaza (Kg)	Etanol Obtenido (L)	Etanol Teórico (L)	% Rendimiento
180	0.540	0,135	0,178	75,84
200	0.660	0,165	0,218	75,69
250	0.825	0,195	0,272	71,69

Figura 38. Comparación Etanol Obtenido vs Etanol Teórico a diferentes concentraciones para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre.



Como se observa en la figura 33 la concentración de azúcar de 180 g/L produce una cantidad de etanol más cercana a la teórica en comparación con las otras dos concentraciones, a pesar de que la concentración de 180 g/L muestra un

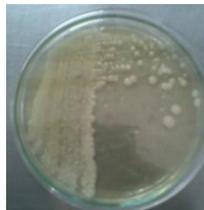


rendimiento alto y disminución en los costos de la materia prima que la de 200 g/L, el aumento en el porcentaje de alcohol de esta concentración justifica el incremento del costo de la materia prima, teniendo en cuenta que 30 Kg de melaza tiene un valor de \$20.000, conociendo que la diferencia entre estas concentraciones es de 20 g esto equivale a un aumento de \$13,33 de materia prima. La concentración de 180 g/L comparada con la de 250 g/L presenta un rendimiento mayor pero la concentración de 250 g/L produce dos grados de alcohol más que la de 180 g/L con lo cual el aumento en la materia prima que es de \$46,67 es justificado. Como se concluye en el análisis de la figura 32 la concentración óptima para los siguientes ensayos será de 250 g/L.

6.6. SACCHAROMYCES CEREVISIAE ATCC 9763 (ver Anexo 4).

6.6.1. Identificación macroscópica de colonias *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Al hacer siembras por agotamiento en agar OGY se obtuvieron las siguientes colonias aisladas.

Figura 39. Identificación macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.



(Autores)

Descripción Macroscópica:

Colonias blancas, cremosas, brillantes, bordes redondos y convexas.

6.6.2 Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a una concentración de 250g/L de azúcares reductores y determinación del porcentaje de etanol.



6.6.2.1 Concentración de 250g/L.

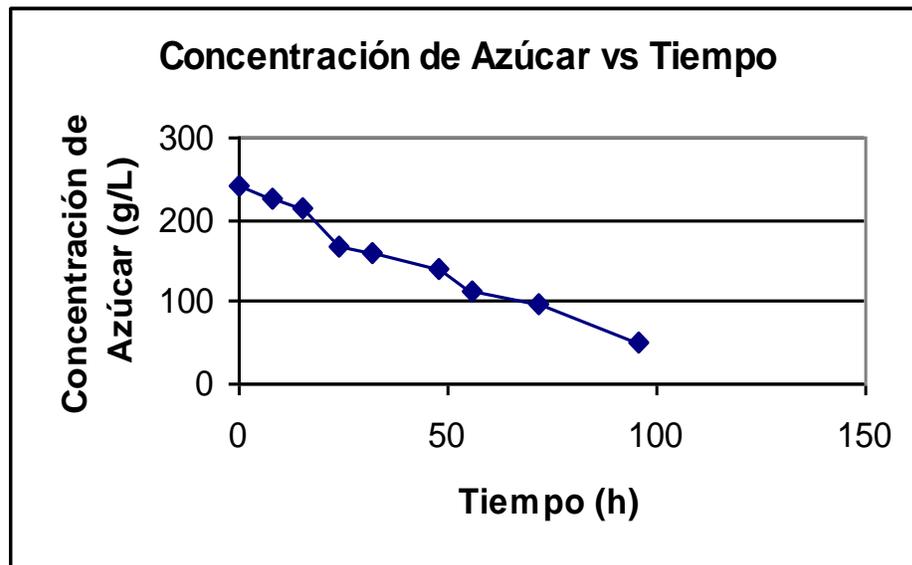
- Ensayo 1

Absorbancia = 0.155

Tabla 24. Ensayo 1 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	242,86	0,684	1/4000
8	225,11	0,635	1/4000
15	215,33	0,608	1/4000
24	168,59	0,479	1/4000
32	160,98	0,458	1/4000
48	141,41	0,404	1/4000
56	111,7	0,322	1/4000
72	98,66	0,286	1/4000
96	49,38	0,15	1/4000

Figura 40. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %



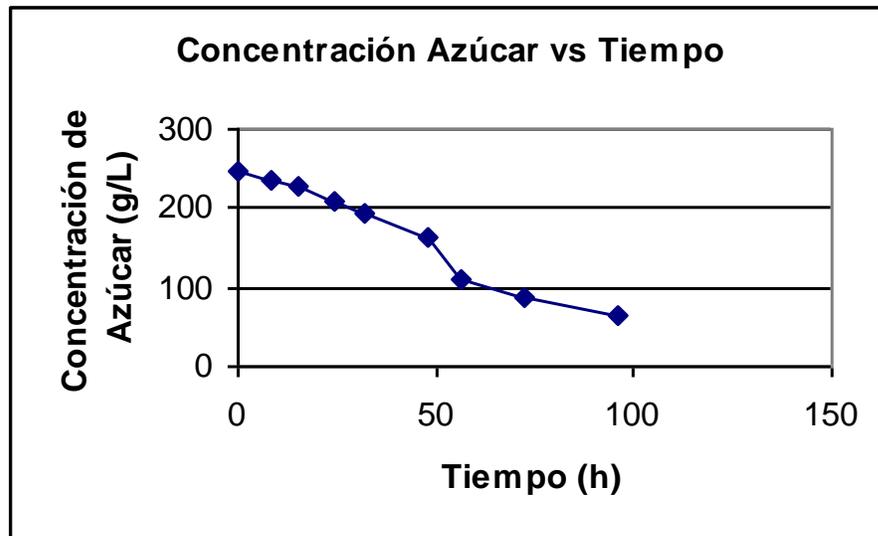
- **Ensayo 2**

Absorbancia = 0.186

Tabla 25. Ensayo 2 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	247,21	0,696	1/4000
8	234,89	0,662	1/4000
15	228,01	0,643	1/4000
24	210,62	0,595	1/4000
32	195,16	0,552	1/4000
48	163,51	0,465	1/4000
56	108,8	0,314	1/4000
72	85,98	0,251	1/4000
96	64,6	0,192	1/4000

Figura 41. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %

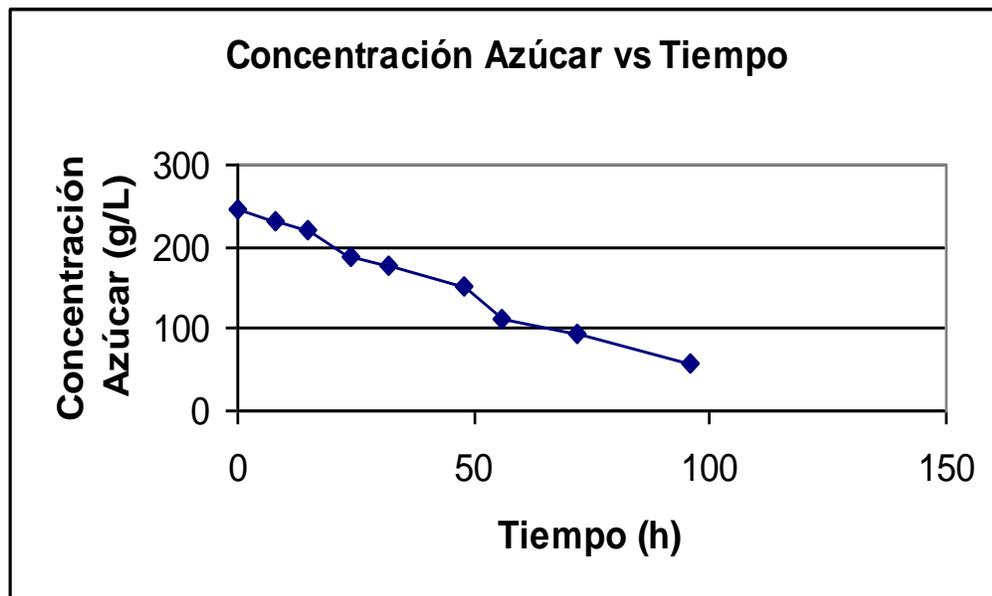


- Promedio Concentración 250 g/L

Tabla 22. Promedio concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)
0	245,035
8	230
15	221,67
24	189,605
32	178,07
48	152,46
56	110,25
72	92,32
96	56,99

Figura 42. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Como muestra la gráfica 42 la concentración de azúcares disminuye con respecto al tiempo de una manera aproximadamente lineal durante todo el proceso de fermentación, por lo que se puede afirmar que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 tolera porcentajes de azúcares superiores a las concentraciones óptimas (10% - 18% de azúcares) en comparación a la cepa ya



estudiada; considerando además que el inóculo usado se encontraba en fase exponencial por lo que no se observa un retraso en el crecimiento (fase de latencia) y éste se inicia inmediatamente. Este comportamiento de tolerancia puede deberse a que esta cepa es utilizada para la producción de alcohol. A las 15 h de montado el ensayo el proceso de fermentación se hizo visible ya que se observó producción de gas y espuma. El tiempo de fermentación aumento a 96 h, puesto que a las 72 h aún se presentaba producción de CO₂ constante, el cual se observó por la presencia de espuma y gas, llegando a las 96 h a una degradación de 56,99 g/L de azúcares, además a esta hora del proceso, los nutrientes necesarios se van agotando ya que es un cultivo cerrado, frenando así el proceso de fermentación, iniciando la fase de estacionaria.

Ya que la caída de azúcares para este ensayo tiene un comportamiento más lineal que en los ensayos anteriores se puede concluir que esta cepa solo requiere de un periodo de acondicionamiento previo de 4 días en el medio mínimo de sales enriquecido con melaza para obtener un inóculo en fase exponencial, por lo tanto la disminución de azúcar con respecto al tiempo es mayor.

Al determinar el porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 250 g/L se obtuvo es siguiente resultado

Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %

El porcentaje de alcohol obtenido en este ensayo es mayor que los anteriores, por lo que la cepa presenta mayor tolerancia a niveles mayores de alcohol, lo que indica que la inhibición en el transporte de algunas sustancias y enzimas importantes para las células es menor en comparación a la cepa silvestre y la fluidez del etanol del interior al medio exterior posiblemente es mayor por ello le permite tolerar altas concentraciones de este, lo cual se refleja en el aumento del porcentaje de alcohol



6.6.2.2 Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación a una concentración de 250 g/L. El Fermentado obtenido se destilo en una columna fraccionada, y esta muestra fue corrida por cromatografía de gases en el equipo KONIK HRGC-3000 C (ver Anexo 5).

Como se observa en el cromatograma obtenido para la muestra, el tiempo de retención de 0.925 minutos presenta cercanía con el tiempo de retención presentado para el etanol absoluto 1.083 minutos (ver figura 29), y se aleja del presentado por el metanol absoluto 0.600 minutos (ver figura 30), con lo que podemos concluir la presencia de etanol en la muestra, tanto por el tiempo de retención como por la temperatura de ebullición del fermento y la ausencia de otros compuestos orgánicos, puesto que en el cromatograma no se observan picos importantes y teniendo en cuenta que el detector FID es sensible para este tipo de compuestos.

6.7. SACCHAROMYCES CEREVISIAE ATCC 9080 (ver Anexo 6).

6.7.1. Identificación macroscópica de colonias *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080. Al hacer siembras por agotamiento en agar OGY se obtuvieron las siguientes colonias aisladas.

Figura 43. Identificación macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080.



(Autores)

Descripción Macroscópica:

Colonias blancas, cremosas, brillantes, bordes redondos y planas.



6.7.2 Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a una concentración de 250 g/L de azúcares reductores y determinación del porcentaje de etanol.

6.7.2.1 Concentración de 250 g/L.

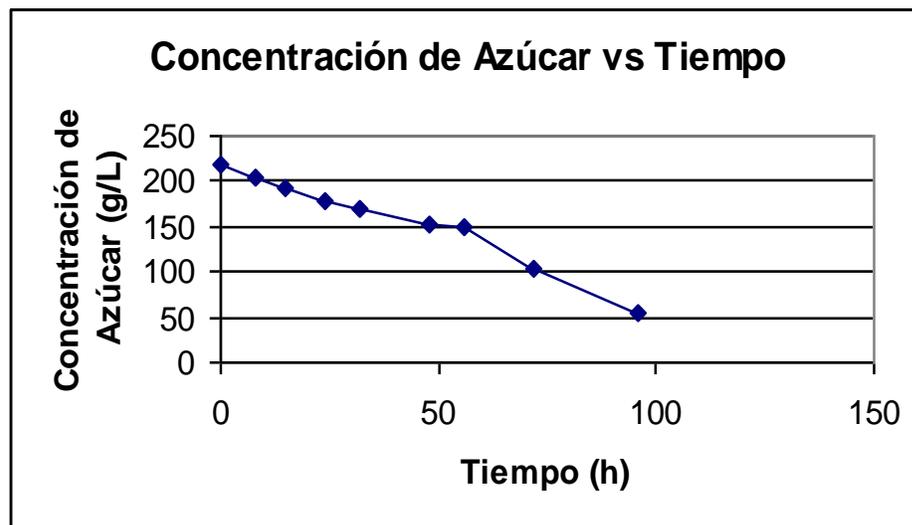
- Ensayo 1

Absorbancia = 0.255

Tabla 27. Ensayo 1 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	217,86	0,615	1/4000
8	204,46	0,578	1/4000
15	193,22	0,547	1/4000
24	179,09	0,508	1/4000
32	170,4	0,484	1/4000
48	152,64	0,435	1/4000
56	149,02	0,425	1/4000
72	103,73	0,3	1/4000
96	55,18	0,166	1/4000

Figura 44. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.





Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %

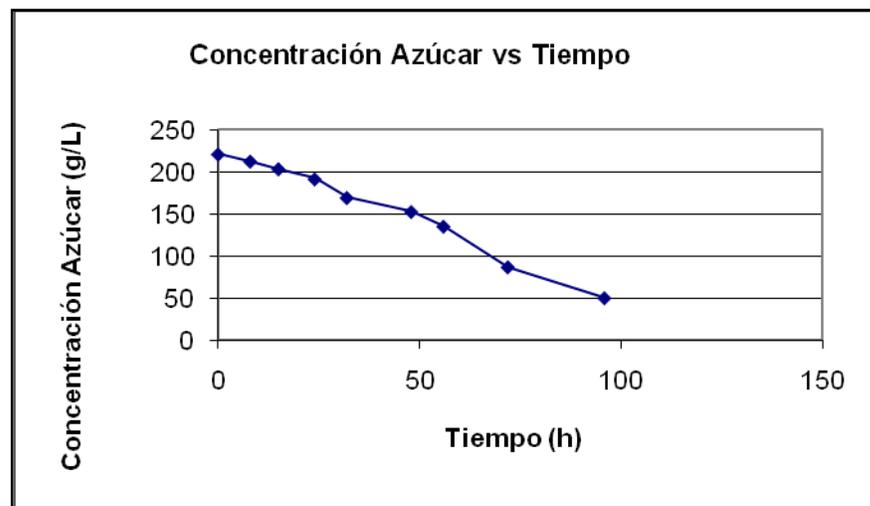
- Ensayo 2

Absorbancia = 0.162

Tabla 28. Ensayo 1 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	220,76	0,623	1/4000
8	212,43	0,6	1/4000
15	203,37	0,575	1/4000
24	191,41	0,542	1/4000
32	169,31	0,481	1/4000
48	152,64	0,435	1/4000
56	135,25	0,387	1/4000
72	87,07	0,254	1/4000
96	50,47	0,153	1/4000

Figura 45. Seguimiento azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %

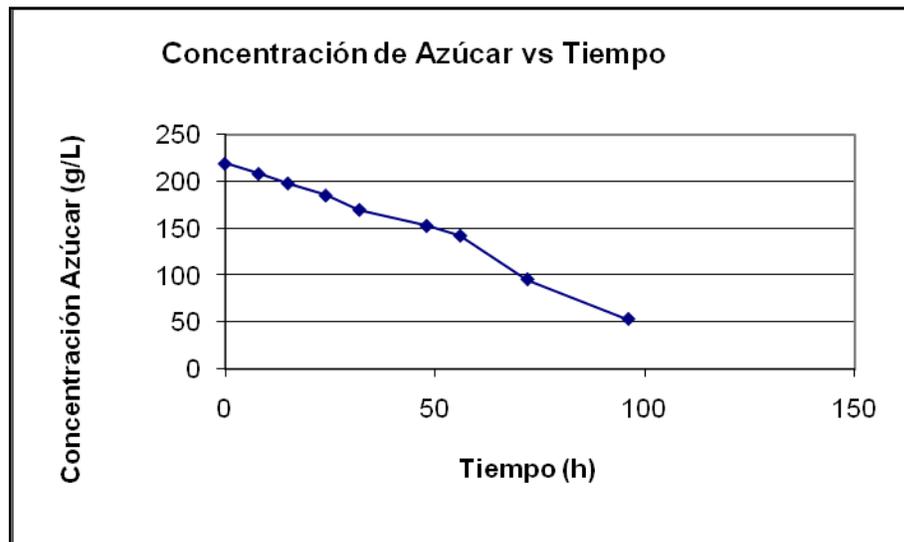


- Promedio concentración 250 g/L

Tabla 29. Promedio concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)
0	219,31
8	208,445
15	198,295
24	185,25
32	169,855
48	152,64
56	142,135
72	95,4
96	52,825

Figura 46. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



En la gráfica anterior se observa que para esta cepa y al igual que la anterior la caída de los azúcares es aproximadamente lineal, esto puede deberse a que esta cepa es utilizada en la producción de alcohol, por lo cual se ve que no presenta fase de latencia durante el proceso de fermentación si no que entra en fase exponencial, por lo que durante todo el proceso la caída de los azúcares es



notoria, el porcentaje de alcohol aumenta trayendo consecuencias importantes para los procesos vitales de la célula y posteriormente ocasionando su muerte.

El tiempo de fermentación aumento a 96 h, puesto que a las 72 h aún se presentaba producción de CO₂ constante el cual se observó por la producción de espuma y en el recipiente de recolección del gas, llegando hasta una degradación de 52,825 g/L de azúcares, por lo que la cepa debe presentar mayor tolerancia a niveles mayores de alcohol. Al parecer no se generaron procesos de inhibición de la respiración celular de la levadura, ya que la degradación de los azúcares se presentó durante todo el proceso de fermentación.

Al determinar el porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 250 g/L se obtuvo es siguiente resultado.

$$\text{Porcentaje de etanol (\%v/v)} = 8 \%$$

Se obtuvo para este ensayo el mismo porcentaje de alcohol que para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, por lo que se puede considerar que sus características genéticas son similares y como resultado su comportamiento en el proceso fermentativo es similar. Posiblemente el proceso se freno debido al porcentaje de alcohol generado, produciendo alteraciones en el funcionamiento de la membrana celular posiblemente afectando la fluidez del etanol al exterior.

6.7.2.2 Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación. El Fermentado obtenido se destiló en una columna fraccionada, y esta muestra fue corrida por cromatografía de gases en el equipo KONIK HRGC-3000 C (ver Anexo 7).

Al comparar el tiempo de retención obtenido para la muestra, de 1,013 minutos con el tiempo de retención para el etanol absoluto 1.083 minutos (ver figura 29), podemos verificar la presencia de etanol en la muestra y al compararlo con el del metanol se observa que los tiempos de retención se alejan (ver figura 30), con lo



que podemos concluir la ausencia de metanol y de otros compuestos orgánicos , puesto que en el cromatograma no se observan picos importantes teniendo en cuenta que el detector FID es sensible para compuestos orgánicos.

6.8. *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 (ver Anexo 8).

6.8.1. Identificación macroscópica de colonias *Candida utilis* ATCC 9950. Al hacer siembras por agotamiento en agar OGY se obtuvieron las siguientes colonias aisladas.

Figura 47. Identificación macroscópica de *Candida utilis* ATCC 9950.



(Autores)

Descripción Macroscópica:

Colonias blancas, cremosas, brillantes, húmedas de bordes redondos y planas.

6.8.2 Seguimiento de azúcares reductores para la fermentación de melaza a una concentración de 250 g/L de azúcares reductores y determinación del porcentaje de etanol.

6.8.2.1 Concentración de 250 g/L.

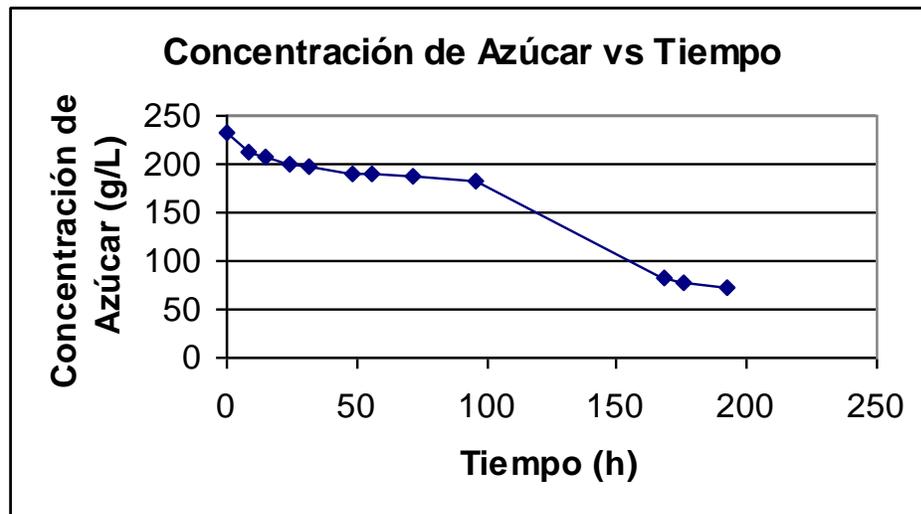
Absorbancia = 0.195



Tabla 30. Ensayo 1 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	232,36	0,655	1/4000
8	211,7	0,598	1/4000
15	206,47	0,583	1/4000
24	199,75	0,565	1/4000
32	196,49	0,556	1/4000
48	191,05	0,541	1/4000
56	190,69	0,54	1/4000
72	187,43	0,531	1/4000
96	181,63	0,515	1/4000
168	81,99	0,24	1/4000
176	78,01	0,229	1/4000
192	73,3	0,216	1/4000

Figura 48. Seguimiento de azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %

- **Ensayo 2**

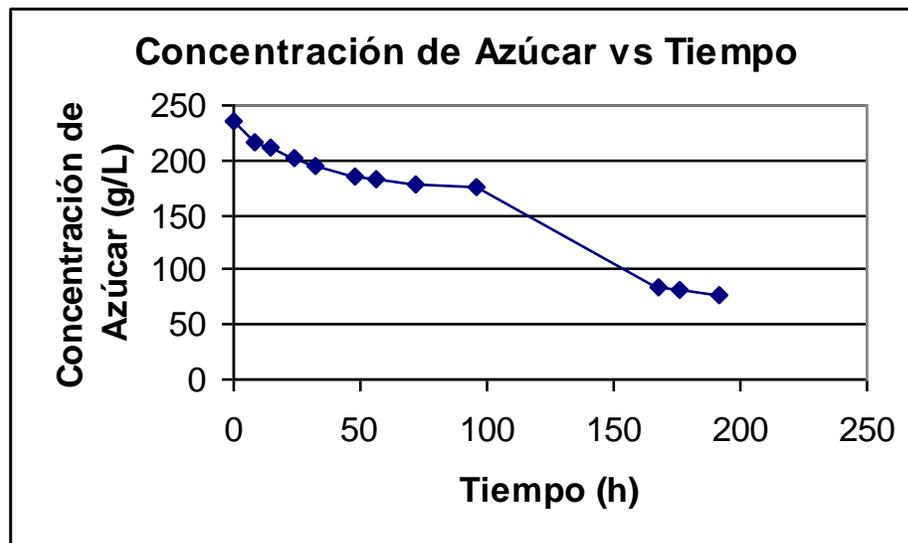
Absorbancia = 0.203



Tabla 31. Ensayo 2 concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Absorbancia	Factores de dilución
0	235,98	0,665	1/4000
8	215,33	0,608	1/4000
15	211,34	0,597	1/4000
24	201,92	0,571	1/4000
32	195,4	0,553	1/4000
48	185,62	0,526	1/4000
56	181,63	0,515	1/4000
72	177,28	0,503	1/4000
96	175,47	0,498	1/4000
168	83,8	0,245	1/4000
176	80,54	0,236	1/4000
192	76,2	0,224	1/4000

Figura 49. Seguimiento de azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %

6.8.2.2 Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación. El Fermentado obtenido se destiló en una columna fraccionada, y esta muestra fue



corrida por cromatografía de gases en el equipo KONIK HRGC-3000 C (ver Anexo 9).

El tiempo de retención obtenido para este destilado, fue de 0,983 minutos lo cual indica la presencia de etanol (ver figura 29) en la muestra puesto que los tiempos de retención obtenidos en ambos cromatogramas son similares, así como también se puede descartarse la presencia de metanol puesto que el tiempo de retención está alejado del presentado por el metanol (ver figura 30).

También se puede concluir que no hay otros compuestos orgánicos, puesto que en el cromatograma no se observan picos importantes teniendo en cuenta que el detector FID es sensible este tipo de compuestos.

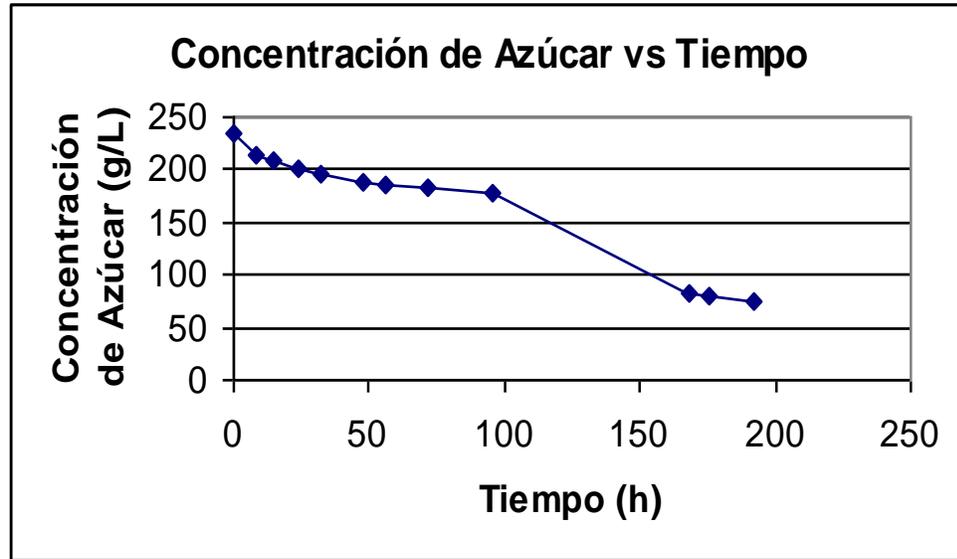
- **Promedio concentración 250 g/L**

Tabla 32. Promedio concentración 250 g/L.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)
0	234,17
8	213,515
15	208,905
24	200,835
32	195,945
48	188,335
56	186,16
72	182,355
96	178,55
168	82,895
176	79,275
192	74,75



Figura 50. Promedio azúcares reductores durante el proceso de fermentación a 250 g/L.



En la gráfica anterior se muestra el seguimiento de azúcares reductores para los ensayos realizados en el estudio de la levadura *Candida utilis* ATCC 9950, como se observa en la misma y a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080, durante las primeras 96 horas del ensayo los azúcares del medio no habían sido degradados de manera considerable, es decir, que la fase de latencia de la levadura se prolongó hasta las 96 h, tiempo en el cual el proceso de fermentación para las otras cepas ya había culminado; esto puede deberse a que *Candida utilis* presenta una fase de latencia más larga, es decir, que requiere más tiempo para adaptarse al medio lo que indica que el tiempo de acondicionamiento previo a la fermentación no fue suficiente por lo cual al entrar al proceso todavía estaba cursando dicha fase, a las 96 horas empezó su fase exponencial por lo que los azúcares en el medio se degradaron de manera más rápida y de forma lineal al igual que para las cepas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080, esto ocurrió hasta las 168 horas, tiempo en el cual las levaduras entraron en fase estacionaria por lo que la caída de azúcares en el medio es casi constante, a las 192 horas termina el proceso de fermentación, puesto que desaparece la espuma, la producción de gas, llegando hasta un valor de azúcares reductores totales de



74.75 g/L en promedio, una concentración mayor a la presentada por las cepas anteriores lo cual indica que degradaron menor cantidad de azúcar pero produjeron igual cantidad de alcohol.

Al determinar el Porcentaje de alcohol obtenido para la concentración de 250 g/L se obtuvo es siguiente resultado.

Porcentaje de etanol (%v/v) = 8 %
--

En promedio, la cepa *Candida utilis* ATCC 9950, produjo un porcentaje de alcohol del 8 % (V/V), igual al producido por las cepas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080. Probablemente el proceso de fermentación para estas levaduras fue frenado por la cantidad de alcohol producida la cual afecta la fluidez de la membrana de las células e inhibe la producción de algunas enzimas citoplasmáticas importantes para sus proceso vitales, puesto que al determinar la cantidad de azúcar final en el medio fue de 74,75 g/L, es decir, que todavía tenían los azúcares necesarios para continuar la fermentación.

6.9. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA *S. CEREVISIAE* SILVESTRE, ATCC 9763, ATCC 9080 Y *C. UTILIS* ATCC 9950 A UNA CONCENTRACIÓN DE 250 g/L.

6.9.1. Comparación consumo de azúcares reductores totales.

Tabla 33. Comparación consumo de azúcares para cada una de las levaduras estudiadas.

Microorganismo	Consumo Total de Azúcares g/L		Promedio (g/L)	Desviación Estándar (g/L)
	Ensayo 1	Ensayo 2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	183,33	142,75	163,04	28,69
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	193,48	182,61	188,05	7,69
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	162,68	170,29	166,49	5,38
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	159,06	159,78	159,42	0,51



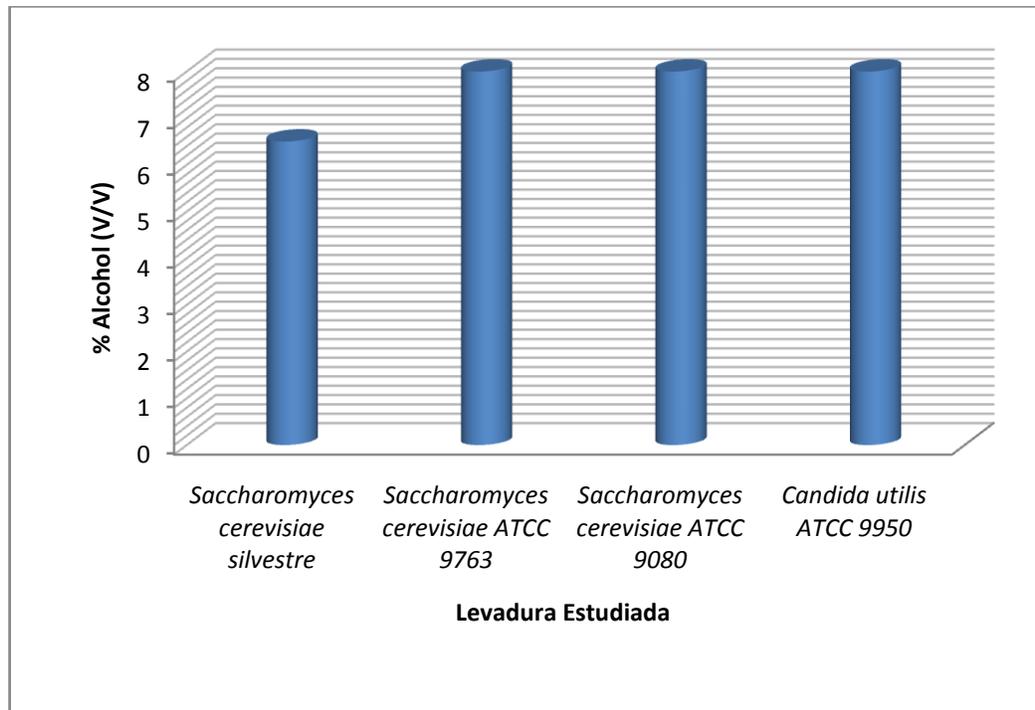
La cepa con menor consumo de azúcar fue *Candida utilis* con un valor de 159.42 g/L produciendo con esta cantidad de azúcar el mismo porcentaje de alcohol que las otras dos cepas, además de presentar la menor desviación estándar lo cual indica la reproducibilidad de los ensayos, no obstante se debe tener en cuenta que esta cepa presenta una fase de latencia más larga lo cual implica un aumento en el tiempo de fermentación. La cepa con mayor consumo de azúcares reductores totales fue la *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, con un valor de 188.05 g/L en promedio, pero presenta un buen porcentaje de alcohol y un tiempo corto durante el proceso de fermentación. *Saccharomyces cerevisiae* silvestre presenta un bajo consumo de azúcares reductores totales pero un bajo porcentaje de alcohol, por lo que no es un microorganismo apto para la fermentación alcohólica. Para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 es la cepa con menor consumo de azúcares y buen porcentaje de alcohol, reuniendo así dos de las características importantes para un microorganismo potencial en un proceso de fermentación alcohólica.

6.9.2. Comparación porcentaje de etanol obtenido.

Tabla 34. Comparación % etanol obtenido para cada una de las levaduras estudiadas.

Microorganismo	% Alcohol obtenido (V/V)		Promedio (% V/V)	Desviación Estándar (% V/V)
	Ensayo 1	Ensayo 2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	6	7	6,5	0,71
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	8	8	8	0,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	8	8	8	0,00
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	8	8	8	0,00

Figura 51. Comparación % etanol obtenido para cada una de las levaduras estudiadas.



En la gráfica anterior se presenta la comparación del porcentaje de alcohol obtenido para cada una de las levaduras estudiadas, como era de esperarse *Saccharomyces cerevisiae silvestre* (Levapan), presenta el menor porcentaje de alcohol puesto que esta cepa no es utilizada para la fermentación alcohólica mostrando un valor de 6,5% V/V; para las otras levaduras estudiadas el porcentaje de alcohol obtenido fue el mismo mostrando un valor de 8 %, un valor esperado puesto que estas levaduras son certificadas para este tipo de procesos.

6.9.3. Comparación de los rendimientos obtenidos.



Tabla 35. Porcentajes de rendimiento obtenidos.

Microorganismo	% Rendimiento		Promedio	Desviación Estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	66,18	77,21	71,69	7,80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	88,24	88,24	88,24	0,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	88,24	88,24	88,24	0,00
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	88,24	88,24	88,24	0,00

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080 y *Candida utilis* ATCC 9950 presentan un rendimiento del 88.24 % el cual es bueno para procesos de fermentación a escala industrial, y *Saccharomyces cerevisiae* silvestre presenta un rendimiento inferior de 71.69 % por no ser una cepa usada en procesos de fermentación.

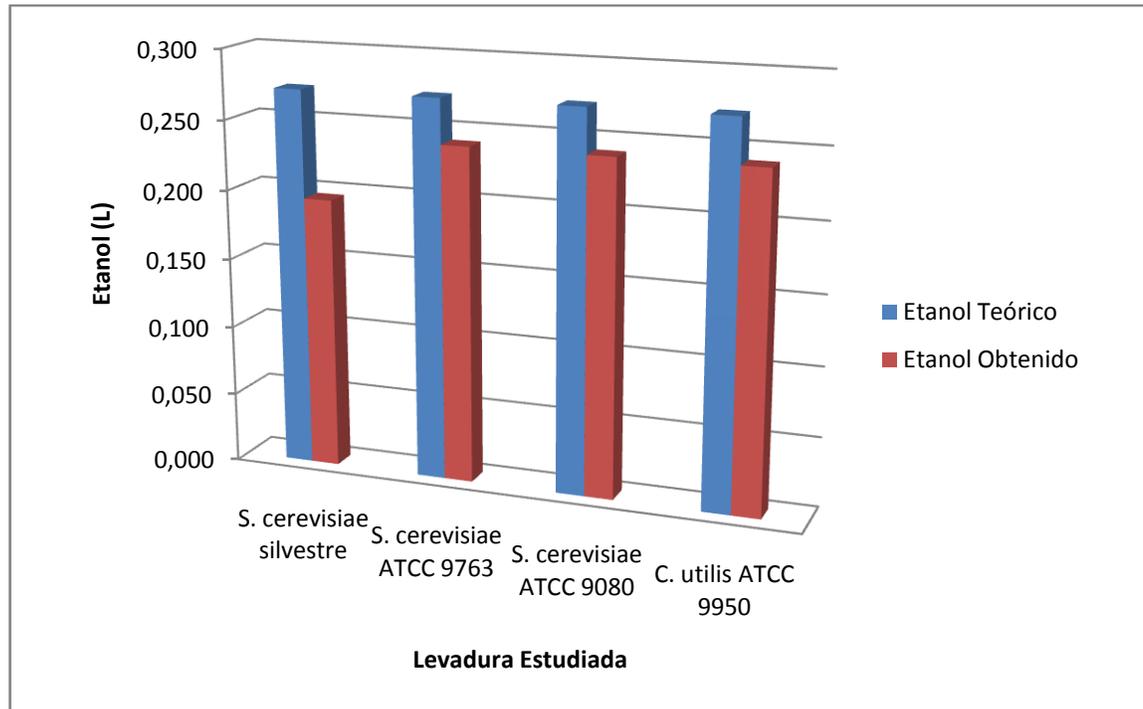
6.9.4. Comparación del etanol obtenido vs etanol teórico.

Tabla 36. Comparación etanol obtenido vs etanol teórico en (L).

Microorganismo	% Alcohol Obtenido (V/V)		Alcohol Obtenido (L)		Alcohol Teórico (L)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestre	6	7	0,180	0,210	0,272
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	8	8	0,240	0,240	0,272
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	8	8	0,240	0,240	0,272
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	8	8	0,240	0,240	0,272



Figura 52. Comparación Etanol Obtenido vs Etanol Teórico.



En la gráfica anterior se presentan los rendimientos obtenidos para cada una de las cepas estudiadas, la de menor rendimiento es la cepa *Saccharomyces cerevisiae* silvestre por tener la menor capacidad fermentativa, y las otras cepas evaluadas presentan el mismo porcentaje de rendimiento puesto que produjeron el mismo porcentaje de alcohol.

6.10. ANÁLISIS DE AMBIENTE Y COLORACIÓN DE GRAM.

6.10.1. Coloración de Gram. Al realizar la coloración de Gram para las muestras seleccionadas se encontraron bacilos Gram (+) y Gram (-) provenientes de la materia prima (melaza), ya que al realizar la tinción a cada una de las colonias que crecieron, en el análisis microbiológico de la melaza (aerobios mesófilos, mohos y levaduras) se encontró la presencia de estos bacilos.

Debido a que el medio mínimo de sales enriquecido con melaza era esterilizado antes del proceso de fermentación, se realizaron tinciones a éste encontrando así



la presencia de bacilos Gram (+) y Gram (-) termoresistentes, confirmando que estos provienen de la materia prima y no de contaminaciones externas.

6.10.2. Análisis de ambiente. Debido a las contaminaciones encontradas en las tinciones realizadas durante el proceso de fermentación, se realizaron análisis de ambiente para aerobios mesófilos, mohos y levaduras al lugar en donde se tenía el montaje del biorreactor, para confirmar que la presencia de los bacilos encontrados en el medio fuera de la melaza y no del ambiente.

Una vez realizado dicho análisis se encontró el crecimiento tanto de aerobios mesófilos como de mohos y levaduras. Realizando tinción al crecimiento bacteriano obtenido en el agar Plate Count, observándose la presencia de estreptococos y la ausencia total de bacilos.



7. CONCLUSIONES

- Se encontró que para el método del fenol-ácido sulfúrico (método Dubois), la longitud de onda de máxima absorbancia para el compuesto coloreado era de 490,5 nm, en comparación con reportes bibliográficos los cuales reportaban una longitud de onda de 492 nm.
- El método utilizado para la determinación de azúcares reductores (método Dubois), es efectivo para el seguimiento de estos, puesto que no presenta interferencias bajo la presencia de proteínas en comparación con otros métodos utilizados en este tipo de investigaciones, no obstante es usado para determinar concentraciones bajas de azúcares por lo que a las muestras es necesario realizarles varias diluciones sucesivas, para que entren en el rango de la curva patrón, con lo cual se pueden presentar factores de error.
- La melaza utilizada cumple con la norma NTC 607 que reglamenta el azúcar crudo en Colombia garantizando el buen estado microbiológico de la materia prima, puesto que no se halló una norma específica para la melaza.
- El montaje utilizado para el biorreactor permitió el seguimiento y control de las variables que hay que tener en cuenta en un proceso de fermentación (agitación, pH, temperatura y consumo de azúcares) generando las condiciones óptimas para llevar a cabo la fermentación.
- Para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre a una concentración de 180 y 200 g/L, requirió de 48 h para fermentar el medio, produciendo en promedio un porcentaje de alcohol de 4,5 y 5,5 % (V/V) respectivamente, esto como



consecuencia de que al final de la fermentación la concentración de azúcares ya era muy baja frenando así el proceso.

- El tiempo de inoculación previo a la fermentación para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre a concentraciones de 180 y 200 g/L no fue suficiente, puesto que en las graficas del seguimiento de azúcares reductores de estos ensayos se observa un periodo de latencia lo que indica que el inóculo no entra al proceso fermentativo en fase exponencial, requiriendo así de un mayor tiempo de acondicionamiento.
- Debido a los resultados obtenidos para las concentraciones de 180 y 200 g/L para *Saccharomyces cerevisiae* silvestre en cuanto al tiempo de inoculación, para la concentración de 250 g/L se aumentó dicho tiempo, disminuyendo así la fase de latencia en el proceso de fermentación. Para este ensayo el tiempo total para el proceso fue de 72 h, obteniendo un porcentaje de alcohol de 6,5% (V/V), el incremento de este tiempo se debe al aumento de la concentración de azúcares.
- Para las concentraciones evaluadas con *Saccharomyces cerevisiae* silvestre la concentración de 250 g/L fue la que presentó mayor porcentaje de alcohol con un valor de 6,5 % (V/V), un valor no muy alto teniendo en cuenta que esta cepa no es utilizada para la producción de alcohol. Por haber sido la concentración de 250g/L la que presentó mayor porcentaje de alcohol esta concentración será usada para el estudio de las otras cepas.
- El tiempo de acondicionamiento del inóculo óptimo previo a la fermentación para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y 9080, fue de 4 días; para que la fase de latencia en el proceso no sea tan larga.



- El tiempo de fermentación total para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y 9080 es de 96 h, produciendo alcohol en un porcentaje de 8% (V/V); esto se debe a que son cepas certificadas para la producción de etanol.
- Con base en los resultados obtenidos para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y 9080, se puede concluir que estas cepas presentan características similares tales como el tiempo de inoculación, tolerancia a altas concentraciones de azúcar, alcohol y tiempo de fermentación.
- El tiempo de fermentación total para *Candida utilis* ATCC 9950 fue de 192 horas, el doble del presentado para las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080 que fue de 96 h, lo cual se debe a que *Candida utilis*, tiene una fase de latencia mayor a la presentada por las cepas anteriores.

Esto la hace menos eficiente en procesos de fermentación, puesto que 96 horas adicionales generan un aumento en los costos de la producción lo cual no es rentable a la hora de realizar una fermentación a escala industrial, además teniendo en cuenta que el rendimiento obtenido para esta cepa es el mismo que para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080.

- En conclusión los resultados obtenidos para las cepas evaluadas indican que en el proceso de fermentación de melaza de caña es más rentable utilizar *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y ATCC 9080, puesto que presentan el mayor porcentaje de alcohol y menor tiempo de fermentación.



• 8. RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y para una nueva investigación se recomienda:

- Realizar la curva de crecimiento de las cepas a estudiar, para determinar con precisión las fases de ésta, y así determinar el tiempo óptimo de inoculación previo a la fermentación y el tiempo total del proceso.
- Estudiar el proceso de fermentación de melaza sin la adición previa de otros nutrientes, para evaluar la importancia de estos en el medio.
- Evaluar una concentración mayor a 250 g/L de azúcares reductores para determinar el límite de tolerancia a la concentración de azúcar y alcohol.
- Emplear otro sustrato rico en azúcares, que sea un subproducto o un desecho de un proceso industrial.



BIBLIOGRAFÍA

Biocombustible Biodiesel-Bioetanol. 2007. I Seminario-Taller Biocombustibles Biodiesel-Bioetanol 2007 Bogotá-Colombia. Virtual Pro.

Briceño, Carlos O., Calero, Claudia Ximena. 2004. Etanol como Combustible para Vehículos. Carta Trimestral 1 de 2004 – CENICAÑA.

Cadena Agroindustrial. (2004). Etanol: Análisis de Estudio de Cadena Etanol. Nicaragua.

Cenicaña. 2007. Producción de Etanol Combustible. Informe Anual

Grupo Manuelita. 2007. Quienes Somos, Historia: El Etanol en el Mundo, El Etanol en Colombia. Disponible en: http://www.manuelita.com/html/sitio/index.php?view=vistas/es_ES/pagina_219.php#2

Departamento de Microbiología y Genética Universidad de Salamanca. Prácticas de Microbiología. Disponible en: <http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf>

Fajardo C., Erika E., Sarmiento F., Sandra C. 2008. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyce cereviseae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogota 2008.

Konik Instruments.1992. Manual del usuario cromatógrafo de gases HRGC-3000C. Segunda edición. Diciembre 1992.



Lehninger, Albert. 1981. Las bases moleculares de la estructura y función celular. p: 409-437

Levtona, Fabiola. (2006). Revista Ciencia y Tecnología: Energías "Alternativas": el Etanol.

Leveau Y.J., Bouix M. 2000. Microbiología Industrial, los microorganismos de interés industrial. Editorial ACRIBIA, S.A. p: 3-88, 529-559.

Madigan T., Michael, Martinko M., Jhon, Parker, Jack. Brock Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall. Décima edición. p: 957-985

Mancheno Gnecco, José. 2004. El precio de la melaza continua creciendo. Nota técnica Sucromiles S.A

Meade P., George. 1986. Manual del Azúcar de Caña. Montaner y Simón S.A Barcelona. p: 305-325

Mikkelsen R., Susan, Cortón, Eduardo. 2004. Spectroscopic Methods for Matrix Characterization. Bioanalytical Chemistry. Chapter 1. p: 11-12.

Prescott Cate, Samuel, Cecil Gordon, Dunn. 1992. Microbiología Industrial. Aguilar Madrid. p: 110-158

Ríos del Risco, Carlos A., Fajardo, Mario, Pérez M., Juan Carlos. 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.

Skoog, Douglas A., Holler, James, Nieman, Timothy A. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. Quinta edición. Capítulo 27. p: 759.



Tomasso, Mauricio. 2004. Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química

Universidad Nacional de Colombia .2000. Laboratorio de Operaciones Unitarias. Guías Fermentación II.

Vázquez H. J, Dacosta. O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. INGENIERÍA investigación y tecnología VIII. 4. 249-259.2007.

Recursos Electrónicos:

http://www.n-t.ru/tp/nr/mk_p02.jpg. Consultado el 11 de julio de 2009



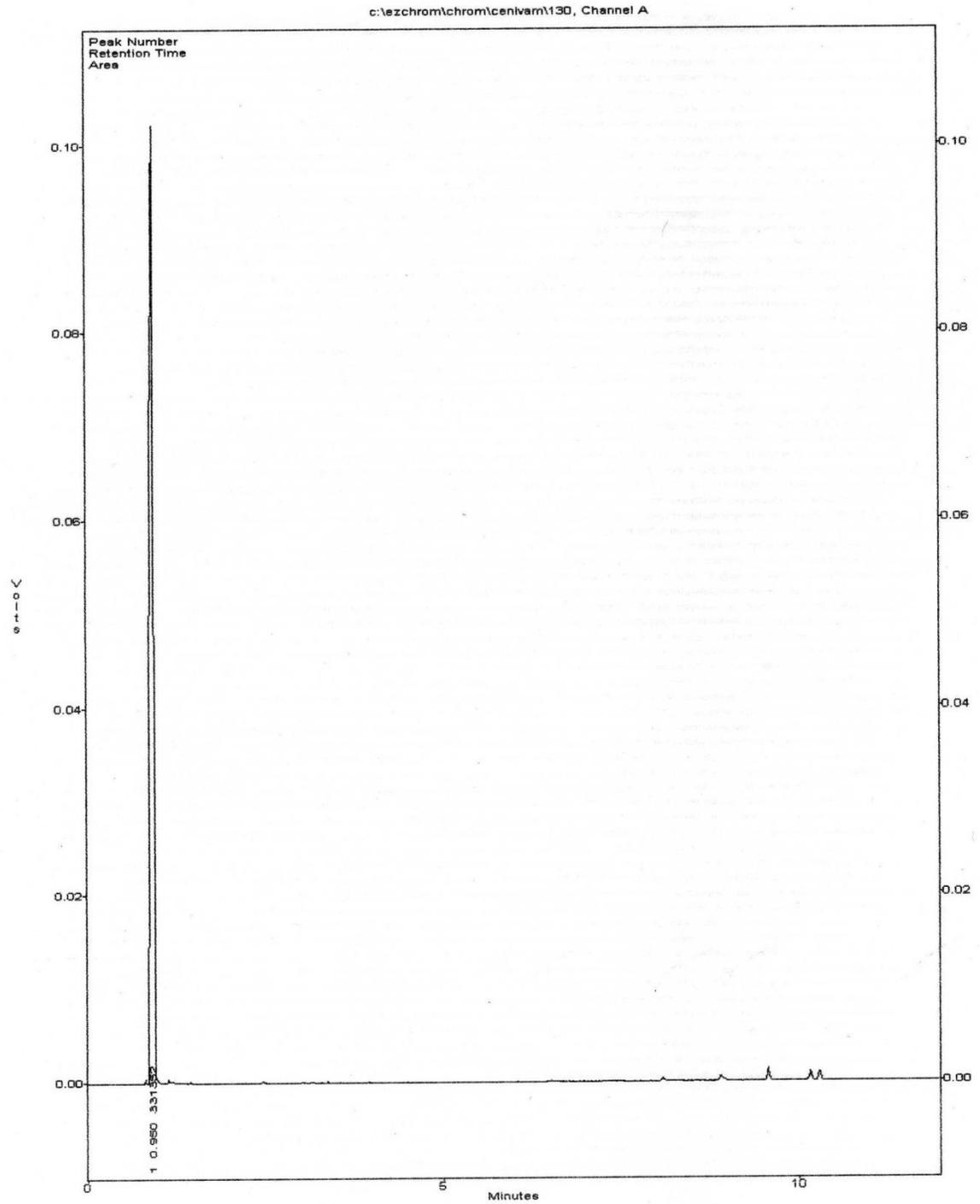
ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo preparado para levaduras.

Compuesto	Composición (g/L)
Azúcares reductores totales	20, 40, 50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.96
KH_2PO_4	0.02
Extracto de levadura	6.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
pH = 4.0 ajustado con ácido láctico	

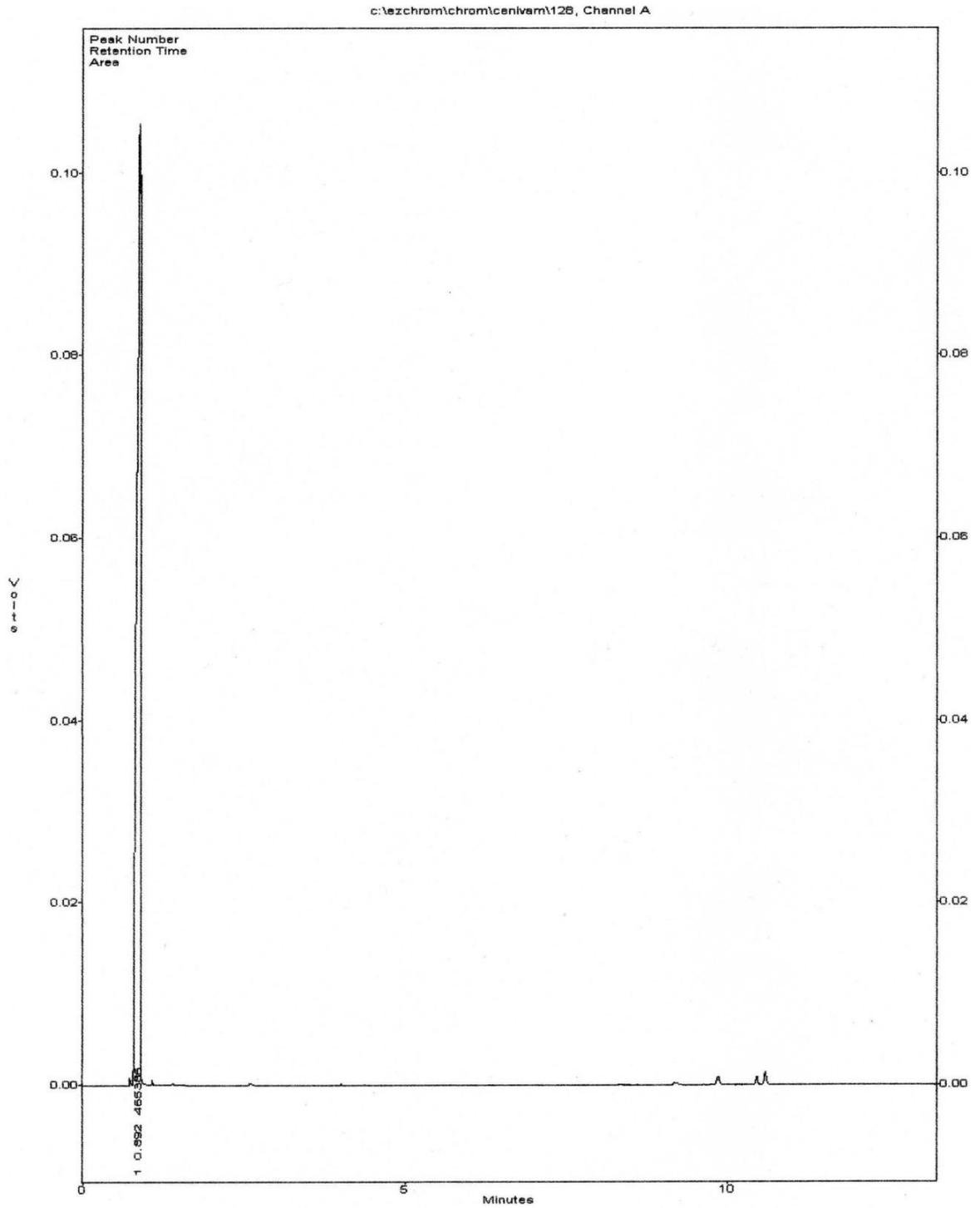


Anexo 2. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación para una concentración de 200g/L.



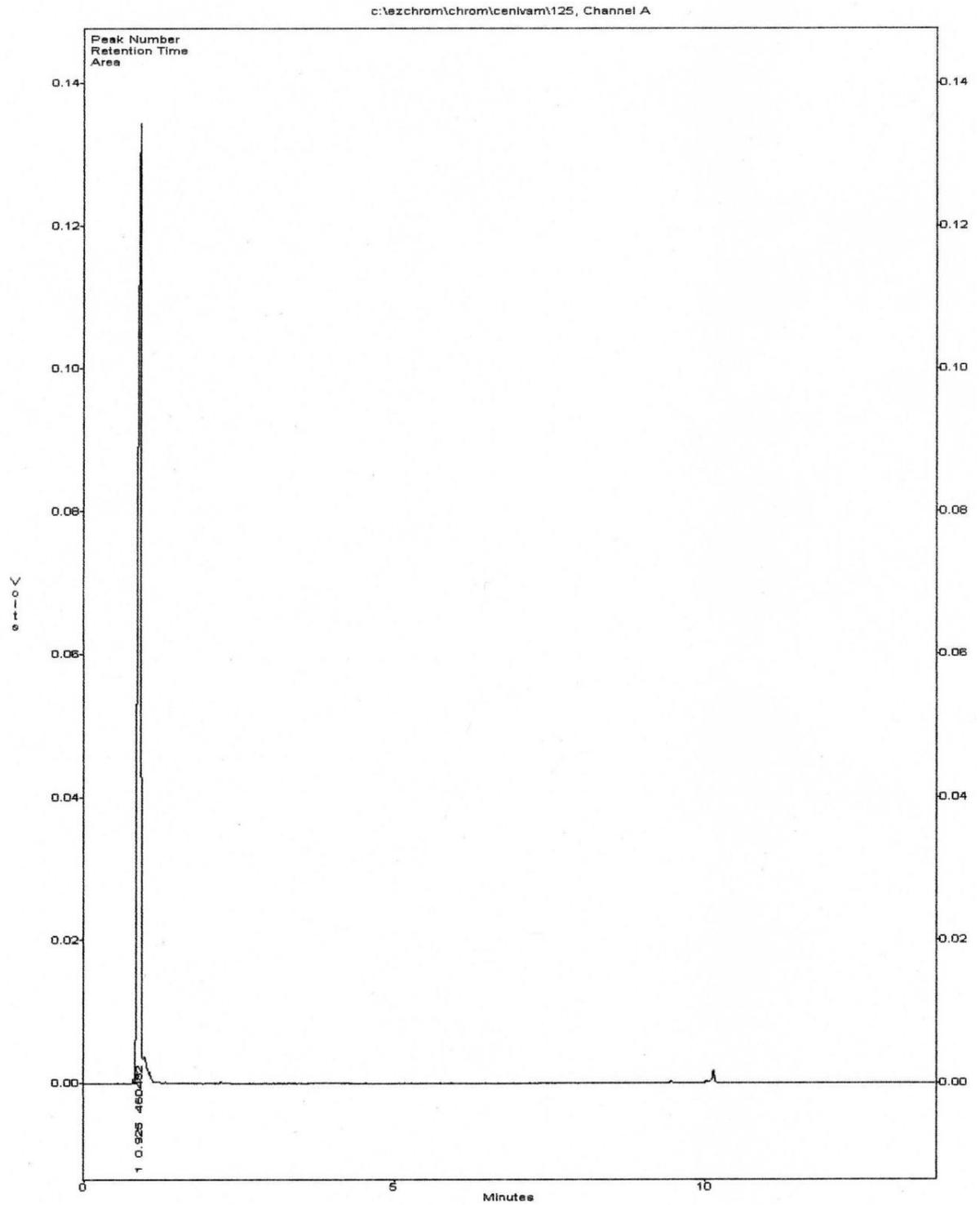


Anexo 3. Cromatograma para etanol obtenido en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L.





Anexo 5. Cromatograma obtenido para el etanol en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L.



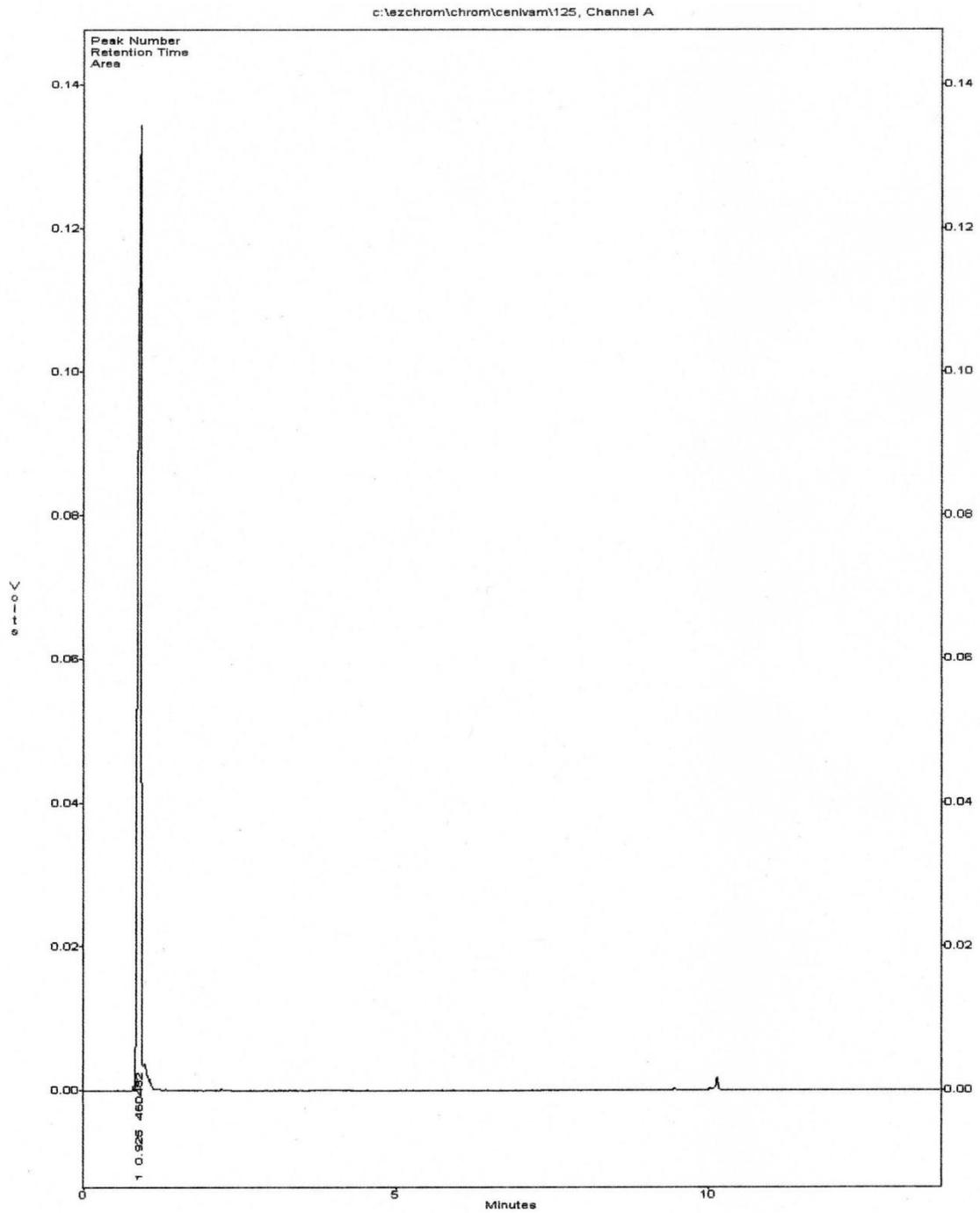


Anexo 6. Ficha técnica de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080.

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release																																																								
Specifications	Additional Information																																																							
Microorganism Name: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Catalog Number: 0900 Lot Number: 90021 Reference Number: ATCC® 9080™* Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 Expiration Date: 2010/04	Release Information: Quality Control Technologist: Theresa Iverson Release Date: 2008-08-22 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.																																																							
Performance																																																								
Macroscopic Features: Large, circular, convex, entire edge, cream, smooth, opaque.	Medium: SAB DEX EMMONS																																																							
Microscopic Features: Gram positive, ovoid, budding yeast cells.	Method: Gram Stain																																																							
Vitek YBC	Other Features/Challenges: Results																																																							
<table border="0"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: center;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Galactose</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Lactose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Sucrose</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Maltose</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Cellobiose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>α-Methyl-D-Glucoside</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Xylose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Arabinose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Trehalose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Melezitose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Raffinose</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>N-Acetyl-D-Glucosamine</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Xylitol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Dulcitol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Adonitol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Palatinose</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Glycerol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Sorbitol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Erythritol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Melibiose</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Cyclohexamide</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Glucose</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Inositol</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Nitrate</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>2-Keto-D-Gluconate</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Urea</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	Galactose	+	Lactose	-	Sucrose	+	Maltose	+	Cellobiose	-	α-Methyl-D-Glucoside	+	Xylose	-	Arabinose	-	Trehalose	-	Melezitose	-	Raffinose	+	N-Acetyl-D-Glucosamine	-	Xylitol	-	Dulcitol	-	Adonitol	-	Palatinose	+	Glycerol	-	Sorbitol	-	Erythritol	-	Melibiose	-	Cyclohexamide	-	Glucose	+	Inositol	-	Nitrate	-	2-Keto-D-Gluconate	-	Urea	-	 AUTHORIZED SIGNATURE	
Phenotypic Features	Results																																																							
Galactose	+																																																							
Lactose	-																																																							
Sucrose	+																																																							
Maltose	+																																																							
Cellobiose	-																																																							
α-Methyl-D-Glucoside	+																																																							
Xylose	-																																																							
Arabinose	-																																																							
Trehalose	-																																																							
Melezitose	-																																																							
Raffinose	+																																																							
N-Acetyl-D-Glucosamine	-																																																							
Xylitol	-																																																							
Dulcitol	-																																																							
Adonitol	-																																																							
Palatinose	+																																																							
Glycerol	-																																																							
Sorbitol	-																																																							
Erythritol	-																																																							
Melibiose	-																																																							
Cyclohexamide	-																																																							
Glucose	+																																																							
Inositol	-																																																							
Nitrate	-																																																							
2-Keto-D-Gluconate	-																																																							
Urea	-																																																							
Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.																																																								
The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.																																																								
© 2009 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303		DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml																																																						



Anexo 7. Cromatograma obtenido para el etanol en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L.





Anexo 9. Cromatograma obtenido para el etanol en el proceso de fermentación para una concentración de 250g/L.

