



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

EFFECTO DE LA AGITACIÓN MECÁNICA EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE EXTRACTO DE MALTA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

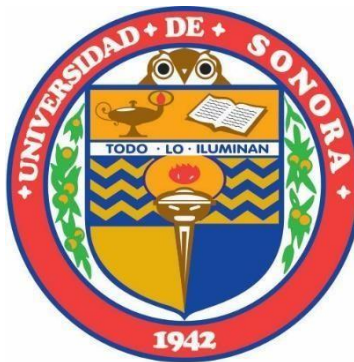
RUBÉN FIGUEROA ACEDO

DIRECTOR: ABRAHAM ROGELIO MÁRTIN GARCÍA

Hermosillo, Sonora

Agosto, 2019

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Rubén Figueroa Acedo

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

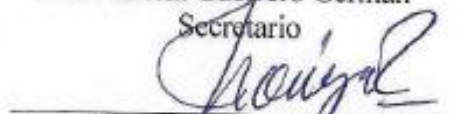
12-Ago-2019
Fecha


Dr. Abraham Rogelio Martín García
Presidente

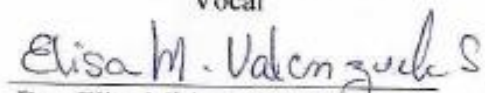
12-Ago-2019
Fecha


Dra. Patricia Guerrero Germán
Secretario

12-Ago-2019
Fecha


Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez
Vocal

12-Ago-2019
Fecha


Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

09 de Agosto de 2019.

Por la presente se hace constar que el estudiante: **Rubén Figueroa Acedo**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.


DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCÍA

COORDINADOR

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

POSGRADO EN
CIENCIAS DE
LA INGENIERÍA:
INGENIERÍA QUÍMICA

RESUMEN

Tradicionalmente la fermentación etanogénica es llevada a cabo sin agitación mecánica, tomando casi el 80% del tiempo del proceso, debido a la posibilidad de que los agitadores y el estrés hidrodinámico generado dañasen la levadura generando subproductos no deseados. Para satisfacer la demanda de este producto, una alternativa puede ser la implementación de agitación mecánica durante la etapa de fermentación, reduciendo el tiempo necesario para llegar a la conversión requerida. En el presente trabajo se realizaron tres casos de agitación a 0, 150 y 200 rpm, a temperatura constante de 20°C y pH de 4.5. Se empleó un medio complejo de extracto de malta como sustrato (14°Bx y una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (S-04). Lo anterior con el objetivo de evaluar la rapidez de consumo de sustrato y la generación de etanol bajo condiciones de agitación; obteniéndose consumos de maltosa que oscilaron entre 0.7 y 2.7 g/(L-h) y producción de etanol entre 0.4 y 0.58 g/(L-h); obteniéndose concentraciones finales de etanol en el rango de 30 a 40 g/L en un lapso de 80 horas de fermentación. La concentración máxima de etanol alcanzada para cada caso fue de 24.6 g / L, 34.6 g / L y 43.5 g / L para 0, 150 y 200 rpm respectivamente. El análisis del peso seco mostró que hay un ligero aumento en la generación de biomasa, probablemente debido a una mayor absorción de O₂ disuelto en las primeras etapas de la fermentación. El tiempo total de fermentación se redujo a medida que aumentó la agitación mecánica.

ABSTRACT

Traditionally, ethanologenic fermentation is carried out without mechanical agitation, taking almost 80% of the process time, due to the possibility that agitators and generated hydrodynamic stress could damage the yeast producing unwanted by-products. To meet the demand for this product, an alternative may be the implementation of mechanical agitation during the fermentation stage, reducing the time needed to reach the required conversion. In the present work there are three cases of agitation at 0, 150 and 200 rpm, at constant temperature of 20°C and pH of 4.5. A complex medium of malt extract was used as a substrate (14°Bx) and a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (S-04). The above with the objective of evaluating the speed of substrate consumption and the generation of ethanol under agitation conditions; obtaining maltose consumption ranging between 0.7 and 2.7 g / (L-h) and ethanol production between 0.4 and 0.58 g / (L-h); obtaining final results of ethanol in the range of 30 to 40 g / L within 80 hours of fermentation. The maximum concentration of ethanol achieved for each case were 24.6 g/L, 34.6 g/L and 43.5 g/L for 0, 150 and 200rpm respectively. Dry weight analysis showed there's a slight increase in biomass generation, probably due to enhanced uptake of dissolved O₂ in early stages of fermentation. Overall fermentation time was reduced as mechanical agitation increased.



TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-------------------------------|
| RESUMEN..... | VI |
| ABSTRACT | V |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE TABLAS | XII |
| NOMENCLATURA | ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO. |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 1 |
| 1.1. Introducción | 1 |
| 1.2. Justificación | 3 |
| 1.3. Objetivo General | 4 |
| 1.4. Objetivos Específicos | 4 |
| CAPÍTULO 2 | 5 |
| ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS | 5 |
| 2.1. Bioetanol como Biocombustible | 5 |
| 2.2. Materia Prima para la Producción de Etanol | 6 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3. Fuentes de Azúcares Fermentables | 8 |
| 2.3.1. Caña de azúcar | 8 |
| 2.3.2. Remolacha dulce..... | 8 |
| 2.3.1. Sorgo dulce | 9 |
| 2.4. Fuentes de Almidón | 9 |
| 2.4.1. Maíz..... | 9 |
| 2.4.2. Trigo | 10 |
| 2.5. Fuentes de Material Lignocelulósico | 10 |
| 2.5.1. Celulosa..... | 11 |
| 2.5.2. Hemicelulosa | 12 |
| 2.5.3. Lignina..... | 12 |
| 2.6. Fermentación | 13 |
| 2.7. Crecimiento Microbiológico por Lotes | 14 |
| 2.8. Saccharomyces Cerevisiae | 16 |
| 2.8.1. Ciclo de vida de Saccharomyces cerevisiae..... | 17 |
| 2.8.2. Efecto de oxígeno..... | 17 |
| 2.8.3. Efecto del dióxido de carbono | 17 |
| 2.8.4. Efecto del pH..... | 18 |
| 2.8.5. Efecto de la temperatura | 18 |
| CAPÍTULO 3 | 19 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 3.1. Activación de Levadura | 19 |
| 3.2. Preparación del Medio de Fermentación | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Parámetros Adimensionales del Sistema Biorreactor | 23 |
| 3.4. Preparación del Biorreactor | 24 |
| 3.5. Seguimiento de la Fermentación | 25 |
| 3.6. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia | 26 |
| 3.7. Análisis de Peso Seco de la Muestra | 28 |
| CAPÍTULO 4 | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 30 |
| 4.1. Parámetros Adimensionales del Sistema..... | 30 |
| 4.2. Fermentación Tradicional (sin agitación)..... | 31 |
| 4.3. Fermentación con agitación mecánica (150RPM) | 32 |
| 4.4. Fermentación con agitación mecánica (200RPM) | 34 |
| 4.4. Comparación entre los Sistemas de Fermentación | 35 |
| 4.4.1. Consumo de glucosa..... | 35 |
| 4.4.2. Consumo de maltosa..... | 36 |
| 4.4.3. Generación de biomasa..... | 37 |
| 4.4.4. Generación de etanol | 38 |
| 4.5. Parámetros de Fermentación..... | 39 |
| CAPÍTULO 5 | 42 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 42 |
| 5.1. Conclusiones | 42 |

| | |
|----------------------------|----|
| 5.2. Recomendaciones | 43 |
| CAPÍTULO 6 | 44 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Producción global de etanol (adaptado de Maitah et al, 2019) ----- | 3 |
| Figura 2 Estructura química de la celulosa----- | 12 |
| Figura 3 Curva típica de crecimiento microbiano (adaptada de Schuler y Kargi) 14 | |
| Figura 4 Levadura comercial <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> deshidratada.----- | 19 |
| Figura 5 Medio complejo de extracto de malta----- | 21 |
| Figura 6 Diagrama de flujo para la preparación del medio de fermentación. ----- | 22 |
| Figura 7 Principales relaciones geométricas en un reactor----- | 23 |
| Figura 8 Biorreactor MultiGen New Brunswick alimentado con el medio de fermentación.----- | 24 |
| Figura 9 Trampa de aire utilizada durante los experimentos.----- | 25 |
| Figura 10 Diagrama de flujo de los muestreos realizados para monitorear la fermentación----- | 26 |
| Figura 11 Muestras refrigeradas que se utilizaron para el análisis de HPLC y peso seco. ----- | 27 |
| Figura 12 Equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia Varian ProStar 210 utilizado en el análisis de carbohidratos. ----- | 28 |
| Figura 13 Liofilizador Labconco FreeZone 4.5 utilizado para el análisis de peso seco. ----- | 29 |
| Figura 14 Concentraciones de carbohidratos y productos correspondientes al caso 1 ----- | 32 |
| Figura 15 Concentraciones de carbohidratos y productos correspondientes al caso 2 ----- | 33 |
| Figura 16 Concentraciones de carbohidratos y productos correspondientes al caso 3 ----- | 35 |
| Figura 17 Consumo de glucosa para los tres casos ----- | 36 |
| Figura 18 Consumo de maltosa para los tres casos ----- | 37 |
| Figura 19 Generación de biomasa para los tres casos----- | 38 |
| Figura 20 Generación de etanol para los tres casos----- | 39 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Productividad teórica de etanol de diferentes fuentes (adaptada de Balat et al, 2008)----- | 7 |
| Tabla 2 Parámetros adimensionales del reactor----- | 30 |
| Tabla 3 Sistema de ecuaciones que describen el problema ----- | 40 |
| Tabla 4 Valores de rapidez específica de crecimiento, consumo de glucosa, maltosa y producción de etanol y acetaldehído obtenido para los tres casos ---- | 41 |

AGRADECIMIENTO

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional a durante la realización de este trabajo, por haber sido un ejemplo de paciencia y perseverancia a lo largo de mi vida, gracias.

A mi directo de tesis Dr. Abraham Rogelio Martín García por haber tenido la paciencia necesaria para guiarme durante el desarrollo de este trabajo, a pesar de los obstáculos y contratiempos que se llegaron a presentar.

A los miembros de mi jurado de tesis, cuyas observaciones fueron indispensables para culminar el trabajo.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

El uso de combustibles fósiles, petróleo, carbón y gas natural, son la fuente de la mayor parte de energía globalmente. Los combustibles fósiles no son una fuente renovable de energía, y las reservas globales están comprometidas si se siguen consumiendo a la velocidad actual (Agencia Internacional de Energía, 2013). La quema de combustibles fósiles es una de las mayores fuentes de gases de efecto invernadero, cuyo impacto al cambio climático y al calentamiento global está bien documentado y proyectado. En un intento para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, y de reemplazar a los combustibles fósiles, se están desarrollando fuentes alternativas de energía. La creciente demanda energética, la escasez de reservas de combustibles convencionales y subsidios relacionados continúan siendo factores clave para la diversificación de fuentes de energía y su migración gradual hacia las energías renovables (Agencia Internacional de Energía 2015). Las energías renovables incluyen a la solar, nuclear, hidrotérmica, geotérmica, eólica y de biomasa, las cuales han crecido rápidamente en los últimos años, permitiendo avances en tecnología e infraestructura.

A la energía derivada de la conversión de materiales renovables y/o sustancias de origen animal o vegetal (biomasa) a energía o compuestos energéticos se le denomina bioenergía. La bioenergía moderna utiliza procesos más eficientes y conversiones más altas comparado con la forma tradicional que involucra quemar residuos de maderas, paja, o estiércol (Gurung y Oh, 2013). El interés atraído hacia la bioenergía se puede atribuir a la abundante cantidad disponible de biomasa, a la disponibilidad de

infraestructura y procesos, y a que la biomasa es la materia prima que permite la producción a gran escala de biocombustibles líquidos (Guo et al, 2015).

Los biocombustibles son combustibles líquidos o gaseosos que se derivan de la biomasa. Entre los biocombustibles líquidos se encuentran el bioetanol, biobutanol, biodiésel y biopropanol, mientras que el biometano y el biohidrógeno son los biocombustibles gaseosos más comunes.

El bioetanol es el biocombustible líquido más producido en el mundo. Como un combustible de transporte, se puede utilizar mezclado con gasolina (gasohol) o de manera pura. La fermentación alcohólica es uno de los bioprocesos más añejados y bien diseñados que existen (Swana et al, 2011). Con una producción global sobrepasando los 100 billones de litros en el 2016 (Asociación de Combustibles Renovables, 2016), se espera que el etanol se convierta en el biocombustible más económico de las próximas décadas.

El bioetanol es producido mediante la degradación microbiológica de substratos ricos en carbohidratos realizada por levaduras, hongos o bacterias. La levadura más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*, en pequeña escala y a escala industrial. *S. cerevisiae* produce etanol como uno de sus principales productos de fermentación. Esta levadura es capaz de operar en un amplio rango de pH, y puede tolerar altos niveles de etanol y otros compuestos que pueden ser inhibidores, comparada con otros microorganismos fermentadores (Almeida et al, 2007; Lin et al, 2012).

La producción de etanol de primera generación utiliza como materia prima cultivos comestibles tales como: la caña de azúcar, maíz, trigo, arroz y sorgo. La mayoría de las plantas productoras de etanol alrededor del mundo son de primera generación. Los materiales lignocelulósicos y desechos de la agricultura son utilizados para generar etanol de segunda generación, mientras que, la generación de biocombustibles de tercera generación utiliza algas como materia prima (Jambo et al, 2016).

Como se muestra en la siguiente figura, globalmente, Estados Unidos y Brasil combinados producen alrededor del 85% del etanol, sin embargo, se emplean diferentes

procesos. Mientras que en Brasil se utiliza la caña de azúcar, en Estados Unidos se utiliza el grano de maíz.

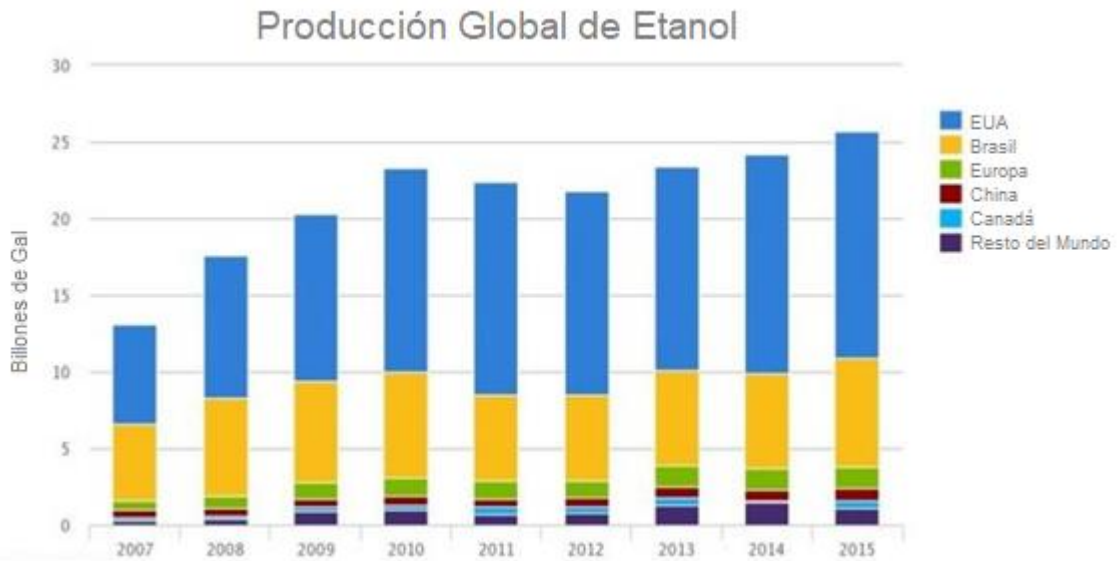


Figura 1 Producción global de etanol (adaptado de Maitah et al, 2019)

1.2. Justificación

Durante la fermentación tradicional, la única fuente de agitación se da por el arrastre que se produce por la generación de CO_2 . Este es provocado debido a la diferencia de presión entre los extremos del reactor. La falta de agitación durante las primeras etapas de la fermentación mantiene obstaculizada la homogenización del medio, la disponibilidad del sustrato en todos los puntos del volumen de reacción. Se piensa que la implementación de agitación mecánica durante la fermentación dañaría a la levadura y afectaría su desempeño, lo que resultaría en un rendimiento menor y en la generación de compuestos no deseados. En el presente trabajo se presenta un estudio para evaluar la fermentación etanolgénica mediante el uso de levadura *S. Cerevisiae* bajo condiciones de agitación mecánica.

1.3. Objetivo General

Estudiar el efecto de la agitación mecánica en el desempeño de generación de etanol y la cantidad de subproductos no deseados a partir de malta por *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica.

1.4. Objetivos Específicos

- Definir los parámetros adimensionales del sistema en estudio.
- Evaluar la producción de etanol sin agitación mecánica.
- Evaluar la producción de etanol con agitación mecánica a distintas velocidades.
- Comparar los resultados obtenidos en los dos casos.
- Determinar las concentraciones finales de los subproductos no deseados.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Bioetanol como Biocombustible

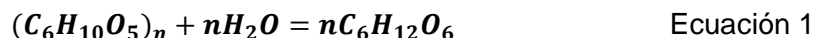
El bioetanol es un biocombustible líquido que es producido a partir de biomasa por medio de un proceso de fermentación. A diferencia de la gasolina, el etanol se puede quemar completamente, convirtiéndolo en un combustible más limpio. Éste puede ser usado puro como combustible o mezclado como potenciador. El bioetanol es un combustible oxigenado, lo que significa que facilita la oxidación de hidrocarburos, provocando una disminución en la emisión de monóxido de carbono y distintos compuestos aromáticos (Sánchez y Cardona, 2008). Se ha comprobado que su uso limita las emisiones de partículas en ciertos tipos de motores (Agarwal, 2007). A pesar de que el bioetanol tiene una densidad energética relativamente baja, éste tiene un número más alto de octanos (113) que la gasolina (87-93) (Asociación de Combustibles Renovables, 2017). Con esto, y otras propiedades deseables, tales como, altas velocidades de flama, rango de flamabilidad amplio y calor de vaporización superior (Balat y Oz, 2008) comparado con la gasolina, el etanol puede mejorar la eficiencia de la mezcla, y mejorar su idoneidad para utilizarse en motores modernos que operan a razones de compresión más altas (Balat et al, 2018; Masum et al, 2013). En mezclas de baja proporción de etanol, éste reduce las emisiones de gases de efecto invernadero en un 3-4% comparado con el uso exclusivo de gasolina. El etanol puede ser mezclado con gasolina hasta un 10-15% (E10 o E15) sin que el motor requiera modificaciones (Moriarty y Yanowitz, 2015). Por otro lado, existen motores flexibles que pueden trabajar con mezclas desde 0-100% de etanol. Además de los beneficios medioambientales, el uso del bioetanol como combustible apoya la economía basada en la agricultura y funge como facilitador

energético en países con un déficit de reservas de combustibles fósil (Goldemberg, 2008).

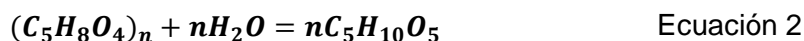
2.2. Materia Prima para la Producción de Etanol

En la producción de bioetanol, es comúnmente empleado el uso de cultivos ricos en azúcares fermentables (caña de azúcar, sorgo dulce o remolacha dulce), o materia prima que sea rica en polisacáridos que, subsecuentemente, son hidrolizados para proveer de azúcares fermentables al proceso de producción de etanol. Lo último puede dirigirse a cultivos enfocados al almidón (maíz, trigo, arroz), o también materiales que contengan complejos de celulosa, hemicelulosa y/u otros polisacáridos (biomasa lignocelulósica). Las reacciones bioquímicas que se pueden encontrar en la conversión de biomasa a bioetanol se muestran a continuación (Cardona y Sánchez 2007; Guo et al, 2015; Sánchez y Cardona 2008).

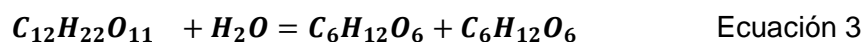
Hidrólisis del almidón, celulosa o polisacáridos similares, en hexosas (glucosa, fructosa):



Hidrólisis de la hemicelulosa en pentosas (xilosa, arabinosa):



Hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa mediante *Saccharomyces Cerevisiae*, gracias a la acción de la enzima invertasa:



En la conversión de hexosas a etanol se tiene un rendimiento máximo teórico de 0.511 gramos de etanol por gramo de glucosa utilizado. En la industria de primera generación, el proceso de producción de etanol opera a aproximadamente el 90% del rendimiento teórico máximo (Gombert y van Marris,2015).

Tabla 1 Productividad teórica de etanol de diferentes fuentes (adaptada de Balat et al, 2008)

| Materia Prima | Productividad de Bioetanol (L/ton) |
|----------------------|---|
| Caña de azúcar | 70 |
| Remolacha dulce | 110 |
| Sorgo dulce | 60 |
| Papa | 110 |
| Maíz | 360 |
| Arroz | 430 |
| Cebada | 250 |
| Trigo | 340 |
| Biomasa Celulósica | 280 |

2.3. Fuentes de Azúcares Fermentables

La mayoría del etanol producido en el mundo proviene de cultivos azucareros, la conversión de sacarosa a etanol es más directa que el proceso de convertir el almidón en etanol. El disacárido sacarosa se puede hidrolizar mediante enzimas invertasa, que son secretadas por la levadura para producir azúcares fermentables, glucosa y fructosa. A nivel industrial los cultivos utilizados son la caña de azúcar, la remolacha dulce y el sorgo dulce (Cardona y Sánchez, 2007).

2.3.1. Caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un cultivo C4 y es la fuente más importante de la industria del etanol en países tropicales y subtropicales. Es utilizada en la producción de etanol como jugo de caña o como melaza, un subproducto no cristalino de la purificación de la sacarosa. El jugo de caña de azúcar tiene un contenido de entre 12-17% de azúcares fermentables, de los cuales más del 90% es sacarosa. Este jugo también contiene nutrientes orgánicos y minerales en pequeñas cantidades que son aprovechados durante el crecimiento de microorganismos.

2.3.2. Remolacha dulce

La remolacha dulce (*Beta vulgaris*) es una planta que crece en condiciones climáticas templadas, particularmente común en países europeos. Requiere entre 35-40% menos agua y fertilizantes que la caña de azúcar. El jugo extraído de la remolacha dulce, así como sus subproductos de la industria del azúcar, melazas de remolacha, son fuentes de azúcares fermentables para la producción de etanol. El jugo de la remolacha contiene 16.5% de sacarosa, y alrededor del 85-90% de sus azúcares son fermentables, el jugo puede ser utilizado inmediatamente una vez ajustado el pH, convirtiéndolo en un sustrato conveniente (Ogbonna et al, 2001; Balat et al, 2008; Zabed et al, 2014).

2.3.1. Sorgo dulce

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor L*) es un cultivo capaz de crecer en condiciones climáticas templadas y tropicales. El grano del cultivo, así como el jugo del tallo, pueden ser utilizados para la producción de etanol. El jugo de sorgo dulce contiene azúcares fermentables de entre 13-17%, de los cuales del 10-14% son sacarosa (Akbulunt, 2008). El jugo también contiene nutrientes en pequeñas cantidades que potencian el crecimiento celular y el metabolismo de la levadura (Cao et al, 2006). El sorgo dulce posee algunas ventajas cuando es comparado con otra materia prima de biocombustibles, tales como, alta eficiencia fotosintética, alta tolerancia a la sequía y a temperaturas frías, requiere niveles bajos de nitrógeno y fertilizantes, alta asimilación de carbono y ciclos cortos de cosecha. Además, posee el porcentaje de extracción de tallo más alta (71.9%) (Kim et al, 2011) de entre todos los cultivos azucareros, y el cultivo que, aprovechándolo en su totalidad, puede tener un rendimiento de hasta 8000Lha⁻¹ convirtiéndolo en materia prima prometedora para la producción de bioetanol (Barcelos et al 2016; Kumar et al, 2013).

2.4. Fuentes de Almidón

El almidón es una larga cadena polimérica formada por unidades de D-glucosa, la cual es hidrolizada para obtener un jarabe idóneo para la producción de etanol, un proceso común en Estados Unidos y Europa (Balat et al, 2008). El maíz y el trigo son los principales aportadores de almidón. Otras fuentes ricas en almidón usadas en la producción de etanol son la papa, el arroz y la cebada.

2.4.1. Maíz

El maíz (*Zea mays L*) es un zacate gigante C4 nativo de México, y es el grano más cosechado en América (Matsuoka et al, 2002). El tallo de la planta contiene azúcares, los cuales al madurar se acumulan en el grano en forma de almidón. El grano rico en almidón es procesado ya sea mediante la molienda seca, la cual tiene como objetivo lograr el máximo retorno de etanol, o molienda húmeda, la cual produce otros

subproductos útiles antes del etanol. Ambos procesos utilizan la enzima amilasa para romper la compleja red del almidón en glucosa, la cual es usada posteriormente para producir bioetanol. Estados Unidos es el mayor productor de etanol en el mundo, del cual el 95% es producido a partir de almidón de maíz (Asociación de Combustibles Renovables, 2017).

2.4.2. Trigo

El trigo (*Triticum aestivum*) es un zacate que es cosechado por su grano, y es el cultivo comestible más producido en el mundo en términos de área. El grano del trigo usado para el proceso de etanol es secado alrededor de un 14% de contenido de humedad, molido en una harina rica en almidón, la cual es hidrolizada enzimáticamente para generar glucosa, que posteriormente pasa a fermentar y convertirse en etanol, similar al proceso de molienda del maíz.

2.5. Fuentes de Material Lignocelulósico

Como la generación de etanol de primera generación utiliza cultivos comestibles, su disponibilidad se encuentra restringida. Los desechos de la agricultura y residuos forestales, arboles de crecimiento rápido y cultivos energéticos, que conjuntamente representan la fuente de recursos renovables más grande del mundo, constituyen la biomasa lignocelulósica disponible para producción de bioetanol (Balat et al, 2008; Guo et al, 2015).

Actualmente las fuentes de materiales lignocelulósicos comerciales más comunes usadas en la producción de etanol son subproductos o desechos del mismo proceso de fuentes azucareras o del almidón, y su utilización sirve para mejorar el rendimiento general de la planta (Mortimer y Elsayed, 2004). En algunas plantas, se utilizan parcialmente para reemplazar a los combustibles fósiles usados para proveer de energía a ciertos procesos, reduciendo las emisiones. Tales desechos incluyen bagazo de la caña de azúcar y sorgo dulce, paja de trigo, pulpa de remolacha y los desechos del maíz (Cardona et al, 2010; Kaparaju et al, 2009; Dasgupta et al, 2013).

Una de ventaja estratégica de los materiales lignocelulósicos ha sido el uso de suelos de baja calidad que no son idóneos para el cultivo de comestibles, para sembrar zacates ricos en celulosa y árboles. Cultivos energéticos perenes y zacates pueden lograr altos rendimientos de etanol a bajo costo. La biomasa de árboles de rápido crecimiento como el eucalipto, el pino y otros híbridos pueden generar partículas de madera ricas en celulosa y hemicelulosa (Balat et al, 2008; Bomgardner, 2013).

2.5.1. Celulosa

La celulosa es el polímero orgánico estructural principal en la pared de las células vegetales y se encuentra en estructuras fibrosas altamente ordenadas. Consiste en unidades de β D-glucosa unidas entre sí mediante enlaces β -1,4 glucosídicos. Debido a este enlace, la celobiosa se ha establecido como unidad repetitiva en cadenas de celulosa. Los enlaces de hidrógeno localizados entre moléculas de celulosa permiten que las cadenas adyacentes lineales se condensen para formar una sola estructura extremadamente larga y delgada. La glucosa anhidra, la cual es formada mediante la eliminación del agua de cada unidad de glucosa, es polimerizada en largas cadenas de celulosa que pueden contener entre 5000-10000 unidades de glucosa. A la unidad básica de repetición del polímero de celulosa que consiste de la unión de dos unidades de glucosa anhidra, es llamada celobiosa (Mohan et al, 2006). El grado de polimerización de la celulosa silvestre se encuentra en el rango de 7000-15000. La estructura cristalina de la cadena de celulosa le brinda una fuerza a la tensión considerable con flexibilidad mínima e insolubilidad en el agua; por lo tanto, es bastante resistente al ataque biológico y a la mayoría de los solventes, lo cual es una limitación importante para la hidrólisis de la pared celular. Por lo que únicamente, la D-glucosa fermentable puede ser producida únicamente por el rompimiento del enlace β -1,4 glucosídico, ya sea mediante un ácido o una enzima.

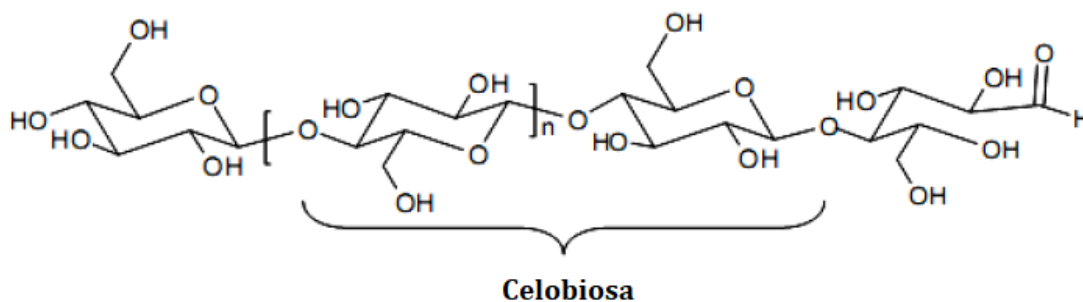


Figura 2 Estructura química de la celulosa

2.5.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la pared celular de la planta, que consiste en un 20-35% del material de la planta. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa está compuesta por diferentes monosacáridos, como pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa) y ácido urónico. La columna vertebral de la hemicelulosa puede ser un homo o hetero polímero con ramificaciones cortas y ocasionalmente enlaces glucosídicos (Gray et al, 2006). En contraste con la celulosa, la hemicelulosa es un polímero que se hidroliza fácilmente debido a su naturaleza ramificada y no forma agregados aun cuando se encuentra cocrystalizada en la cadena de celulosa. La hemicelulosa más importante en los cereales es el xilano.

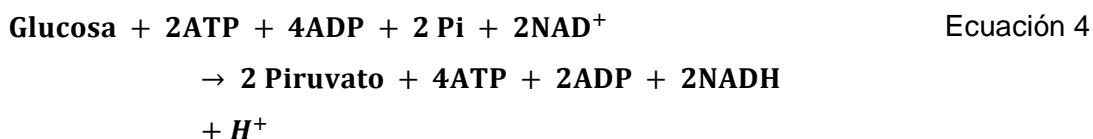
2.5.3. Lignina

La lignina es un polímero fenólico hidrofóbico heterogéneo y una de sus funciones principales es la de “pegar” las fibras de celulosa en las plantas. Es el segundo biopolímero más abundante en el planeta y en conjunto con la celulosa confieren soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiológico y al estrés oxidativo (Perez et al, 2002). Es un polímero entrecruzado complejo de compuestos fenólicos y altamente recalcitrante hacia la degradación química y biológica. Dentro de su

complicada red, la lignina tiene un impacto considerable en otros enlaces existentes. El efecto más importante es el de potenciar la fuerza del enlace de hidrogeno entre polisacáridos. Este tipo de protección reduce exitosamente la oportunidad de penetración de enzimas y sirve como una barrera efectiva para plagas y enfermedades.

2.6. Fermentación

La generación de etanol comienza con la glucólisis, también conocida como la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). La glucólisis está compuesta de tres etapas, activación de glucosa, división de hexosa y extracción de energía (Yang, 2008).



En la mayoría de los microorganismos, el producto final sería ácido láctico bajo condiciones anaerobias, sin embargo, en el caso de microorganismos etanolgénicos, el piruvato es convertido en acetaldehído al reducir una molécula de CO_2 del piruvato y después el acetaldehído es reducido a etanol a través de la reacción redox entre el NADH y NAD^+ . Esta ruta metabólica es menos eficiente que la TCA, pero puede efectuarse en ausencia de oxígeno. Sin embargo, los microorganismos etanolgénicos pueden formar etanol en presencia de oxígeno, cuando la concentración de glucosa es mayor al máximo que se puede consumir en el ciclo TCA (ciclo de Krebs), denominado efecto Crabtree.

La generación de etanol puede llevarse a cabo como proceso en lotes o continuo. La opción idónea para el proceso dependerá de las propiedades cinéticas del microorganismo elegido, de las enzimas presentes y de la naturaleza del sustrato.

2.7. Crecimiento Microbiológico por Lotes

Cuando un medio líquido es inoculado con un microorganismo, éstos comienzan a consumir selectivamente los nutrientes disueltos del medio y lo convierten en biomasa. Una curva de crecimiento típica incluye las siguientes fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte, como se muestran en la siguiente figura:

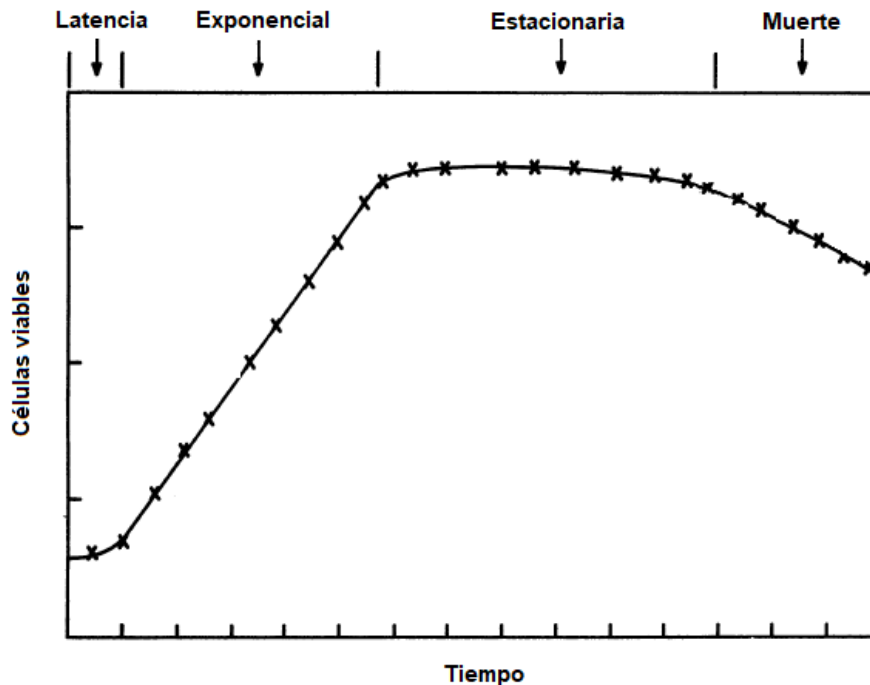


Figura 3 Curva típica de crecimiento microbiano (adaptada de Schuler y Kargi)

La fase de latencia ocurre inmediatamente después de la inoculación y es el periodo de adaptación de las células al nuevo ambiente, los microorganismos reorganizan sus constituyentes moleculares cuando son transferidos. Dependiendo de la composición de los nutrientes, nuevas enzimas son sintetizadas, la síntesis de otras enzimas es reprimida y la maquinaria interna de las células es adaptada a las nuevas condiciones. Durante esta fase, la masa celular puede aumentar un poco, sin un incremento en la densidad poblacional. Se pueden presentar varias fases de latencia cuando el medio contiene más de una fuente de carbono. A este fenómeno se le denomina crecimiento diaúxico y es ocasionado por el cambio en las rutas metabólicas en pleno ciclo de crecimiento. Una vez que una fuente de carbono es agotada, las células adaptan sus actividades metabólicas para utilizar la segunda fuente de carbono.

La fase exponencial también conocida como logarítmica, presenta las células adaptadas a las condiciones del medio. Al término de la fase de latencia, las células comienzan a multiplicarse rápidamente y la masa celular y el número de células aumenta exponencialmente con respecto al tiempo. En este periodo se presenta el crecimiento balanceado, en el cual todos los componentes celulares crecen a la misma rapidez. Durante este periodo la rapidez específica de crecimiento no depende de los nutrientes del medio ya que se encuentran en exceso.

Durante la fase estacionaria, la rapidez neta de crecimiento es cero (no hay división celular) o cuando el crecimiento celular es igual a la rapidez de muerte celular. A pesar de que la rapidez neta de crecimiento es cero durante la fase estacionaria, las células siguen metabólicamente activas y produciendo metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son productos asociados al crecimiento mientras que los metabolitos secundarios son no asociados al crecimiento. La producción de algunos metabolitos es potenciada durante la fase estacionaria debido a la desregulación metabólica. Durante la fase estacionaria pueden presentarse algunas situaciones:

1. La concentración total de masa celular puede mantenerse constante, pero el número de células viables disminuya.

2. Lisis celular puede presentarse y la masa celular disminuye. Una segunda fase de crecimiento puede ocurrir y las células viables pueden crecer a partir de los productos lisados de otras células (crecimiento crítico).
3. No hay crecimiento celular, pero pueden tener un metabolismo activo para producir metabolitos secundarios. La regulación celular cambia cuando la concentración de ciertos metabolitos están bajos.

La fase de muerte (o descenso) sigue de la estacionaria. La muerte celular se puede presentar desde la fase estacionaria y una clara línea entre estas dos fases no siempre es posible. A menudo las células muertas lisan y los nutrientes intracelulares son liberados al medio y usados por organismos vivos durante la fase estacionaria. Al final de la fase estacionaria, debido al agotamiento de nutrientes o acumulación de productos tóxicos, la fase de muerte comienza. El etanol es un ejemplo de un producto inhibitorio para el crecimiento de levaduras y tóxico alcanzando la concentración requerida.

2.8. *Saccharomyces cerevisiae*

La *Saccharomyces cerevisiae* es una de las más de mil especies de levadura que existen. Es un organismo unicelular eucariota, especializada en crecer donde hay azúcares y es fácilmente aislada de la superficie de frutas, plantas y el suelo. Puede tolerar concentraciones de etanol altas hasta un 20% del medio de fermentación (Lin y Tanaka, 2006). La célula de levadura es redonda-ovalada con un diámetro de alrededor de 5-10 μm , la mayoría de las levaduras se reproducen por medio de gemación, el número máximo de generaciones que se encuentra en células que están activas es de aproximadamente 25, y el tiempo de doblado de las células ronda los 90 minutos en las condiciones más favorables de crecimiento. *S. cerevisiae* es facultativa, es decir, que puede crecer en condiciones anaeróbicas o aerobias (Walker, 1998). Tiene una alta productividad y rendimiento de etanol y puede soportar concentraciones de 10-15% de etanol en el medio de fermentación.

2.8.1. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es un organismo unicelular eucariota que se reproduce sexual y asexualmente, mediante meiosis y gemación (mitosis), respectivamente. La levadura tiene dos tipos de apareamiento llamados "a" y "α". Cuando crecen en un medio rico, dos células haploides con diferentes tipos de apareamiento se combinan para formar una célula diploide. La meiosis y la formación de esporas pueden ser entonces, inducidas por la alternación de condiciones de cultivo. Las células haploides solo son capaces de aparearse con contras células haploides del tipo contrario (una "a" solo puede aparearse con una "α" y viceversa) para producir una célula diploide estable. Las células diploides, usualmente al presentárseles condiciones de estrés como el agotamiento de nutrientes, pueden someterse a meiosis para producir cuatro esporas haploides: dos esporas "a" y dos esporas "α". Todo este proceso toma alrededor de 24 horas para completarse (Houston et al, 2004; Dehkhoda, 2008).

2.8.2. Efecto de oxígeno

La *Saccharomyces cerevisiae* no puede permanecer viva más de 4 o 5 generaciones sin oxígeno (Tuite y Oliver, 1991). La oxidación completa del azúcar a dióxido de carbono y agua dará una producción celular óptima. En condiciones de altas concentraciones de oxígeno disuelto, la fermentación de los azúcares a etanol se inhibe, este efecto se llama efecto Pasteur. La respiración libera más energía que la fermentación y, por lo tanto, es el proceso preferido. Durante muchos años, el "efecto Pasteur" fue un tema importante en bioquímica. El efecto Pasteur se define como una "inhibición de la actividad" de la vía de fermentación por respiración; Además, el efecto Pasteur es una inhibición de la vía de fermentación por un producto final de la utilización de glucosa aeróbica.

2.8.3. Efecto del dióxido de carbono

El dióxido de carbono produce un efecto inhibitor en el crecimiento de la levadura y en la producción de etanol en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Chen y Gutmanis, 1976). Puede afectar la permeabilidad y composición de la membrana celular de la

levadura y también cambiar el equilibrio en la reacción carboxilación/descarboxilación en las rutas metabólicas (Tuite y Oliver, 1991).

2.8.4. Efecto del pH

El medio de cultivo para levadura requiere un pH menor al de la fermentación. Se ha recomendado utilizar un pH de 3.5-4.5 para reducir el riesgo de contaminación bacteriana durante el periodo de cultivo, pero los valores de pH no deben ser menores a 3.5 porque la actividad de la enzima invertasa se ve afectada. El pH recomendado para la fase de fermentación se recomienda de 4.5-5 (Tuite y Oliver, 1991).

2.8.5. Efecto de la temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento máximo de células de levadura depende de la variedad utilizada y generalmente varía entre 28-35°C. Sin embargo, el límite de tolerancia para *S. cerevisiae* es de 40°C ya que por encima de esta temperatura se ocasionan fallas en la síntesis de ácidos grasos.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Activación de Levadura

Se llevó a cabo la preparación del inoculo de levadura con una relación de 90% Agua destilada y 10% de la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* en peso, tomando 10mL de agua destilada y aumentando su temperatura con ayuda de una placa de calentamiento hasta llegar a 30°C, para posteriormente agregar 1g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* deshidratada, como se muestra en la figura, y agitar manualmente por aproximadamente 5 minutos hasta que su completa incorporación.

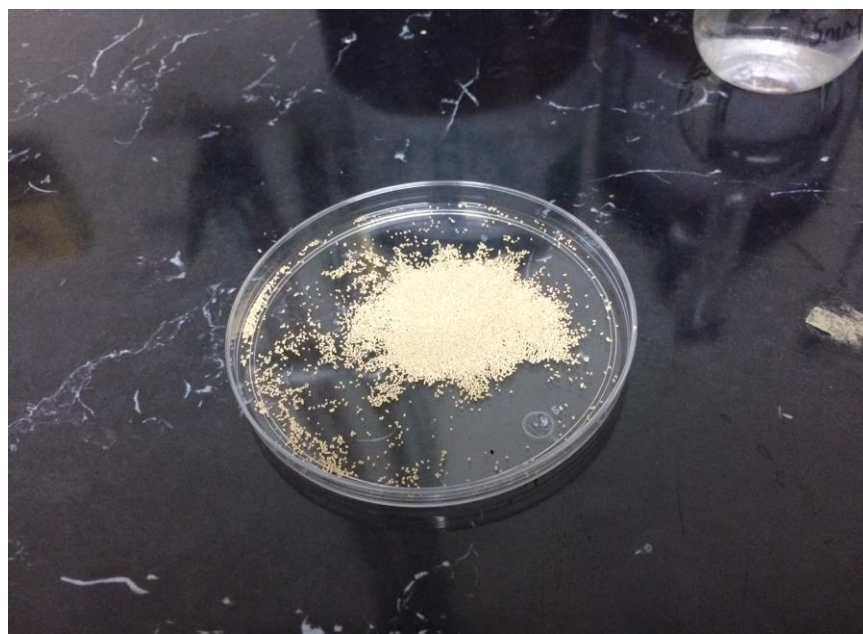


Figura 4 Levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* deshidratada.

3.2. Preparación del Medio de Fermentación

El medio utilizado es un medio complejo de extracto de malta comercial producto del secado por aspersión de la maceración de cebada, el cual está constituido principalmente de tres carbohidratos, glucosa, maltosa y maltotriosa. Además, este medio contiene polisacáridos no fermentables, minerales y proteínas que reúnen las demandas de crecimiento de la levadura.

Siguiendo las instrucciones de preparación del medio de fermentación, primeramente, en un vaso de precipitado de 2 L, se agregó 1 L de agua destilada, para después subir la temperatura de manera gradual con ayuda de una placa de calentamiento y agitación magnética constante, una vez alcanzada una temperatura de aproximadamente 70°C se comenzó a agregar el medio de fermentación a disolver poco a poco cuidando la disolución del mismo sin dar paso a precipitaciones debido a la naturaleza parcialmente hidrofóbica del medio, hasta llegar a una concentración de 14 grados Brix, la cual se monitoreó con ayuda de un refractómetro a la vez que se agregaba extracto de malta al recipiente.

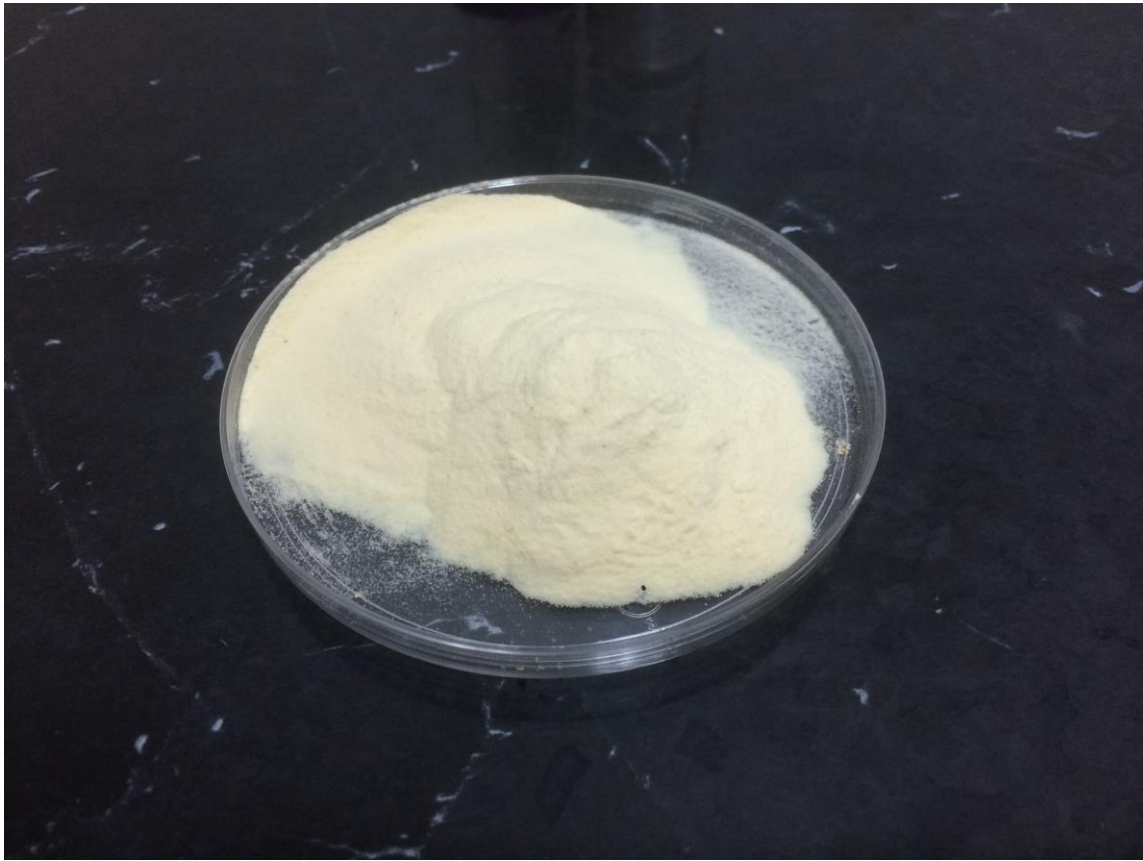


Figura 5 Medio complejo de extracto de malta

Una vez que el medio alcanzó la concentración de 14 grados Brix se continuó con la elevación de la temperatura hasta alcanzar su punto de ebullición, se dejó ebullicir durante 12 minutos, se retiró el vaso de precipitado a un lugar a temperatura ambiente de manera rápida para evitar el derrame del medio. Las pérdidas de agua por evaporación y ebullición del medio de fermentación se compensaron con agua destilada para mantener el mismo volumen de 1L. Concluida esta primera etapa se dejó enfriar hasta que la solución llegara a temperatura ambiente lo cual sucedía en aproximadamente 1 hora. La metodología seguida se muestra en el siguiente diagrama de flujo:

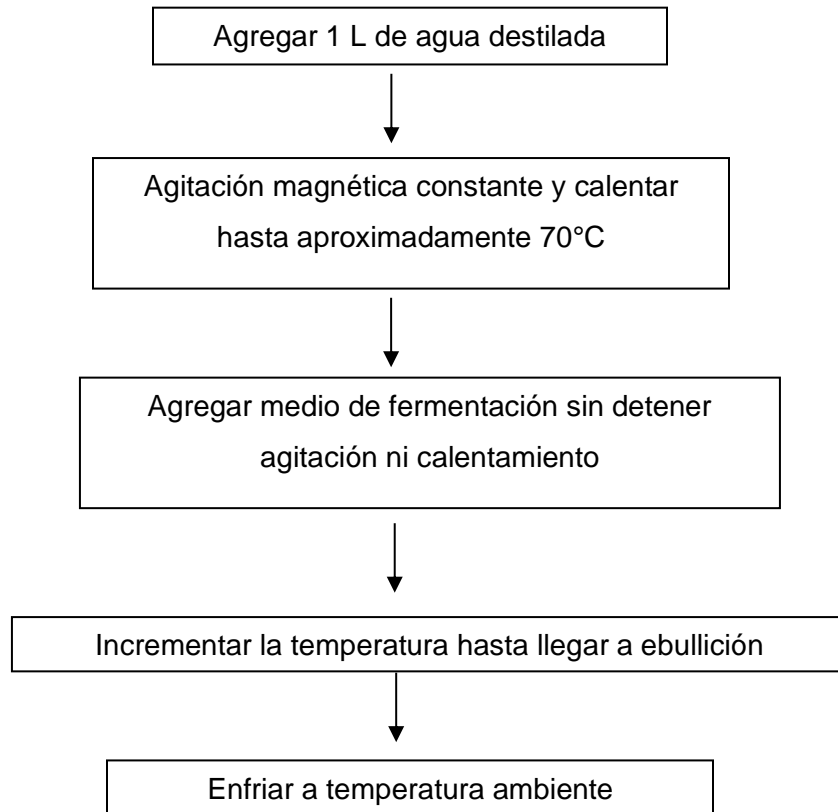


Figura 6 Diagrama de flujo para la preparación del medio de fermentación.

3.3. Parámetros Adimensionales del Sistema Biorreactor

Para lograr el mezclado perfecto es recomendado seguir relaciones de las dimensiones de recipientes donde ha sido logrado el régimen de mezclado perfecto. Esto es mediante la aplicación del principio de similitud geométrica al volumen de reacción. El volumen de reacción representa solo el 75% del volumen total de un reactor, en la mayoría de los casos, siendo el diámetro calculado en base al volumen de reacción necesario. Donde los principales parámetros son: altura del líquido (H), diámetro del tanque (D_T), diámetro del agitador (D_A), altura del agitador con respecto al fondo del tanque (E), número de deflectores (R), ancho del deflector (J), ancho del aspa del agitador (W) y longitud del aspa del agitador (L).

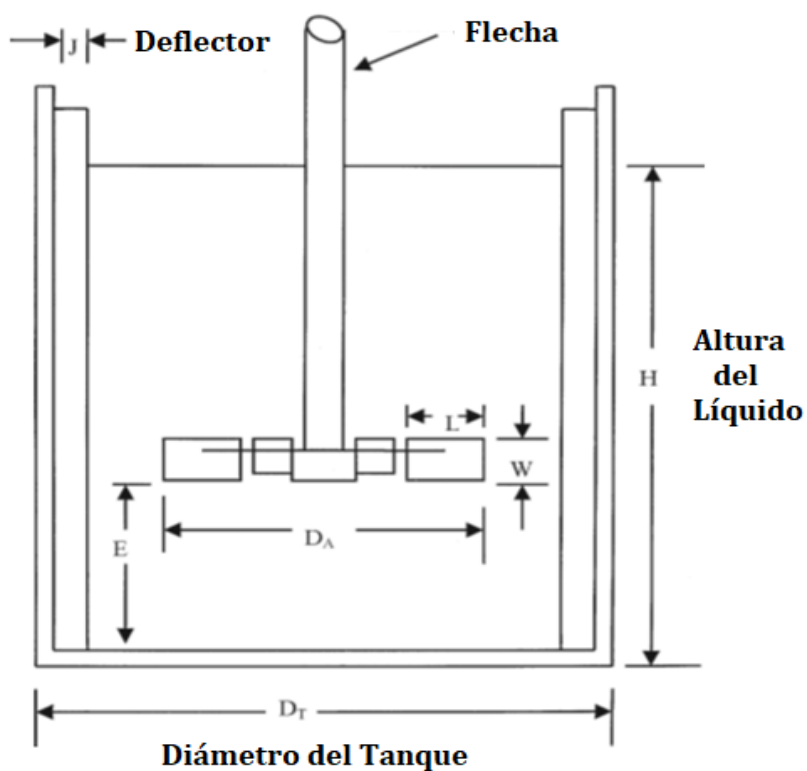


Figura 7 Principales relaciones geométricas en un reactor

3.4. Preparación del Biorreactor

Se utilizó un biorreactor Multi Gen de la marca New Brunswick de 2L con control de temperatura integrado, sistema de aireación para la oxigenación del medio de fermentación y un sistema de agitación mecánica equipado con una turbina tipo Rushton de seis paletas. El interior del biorreactor cuenta con cuatro deflectores a cada 90°. Una vez montado completamente, estéril y listo para funcionar, se vertió dentro del reactor el medio de fermentación a temperatura ambiente y se puso en marcha el enfriamiento para comenzar el descenso de la temperatura hasta 20°C, posteriormente se promovió la oxigenación del mismo mediante la activación del sistema de aireación integrado en el fermentador durante 5 minutos hasta llevarlo a saturación. Transcurrido el tiempo minutos se pasó a agregar la levadura rehidratada.



Figura 8 Biorreactor MultiGen New Brunswick alimentado con el medio de fermentación.

El sistema en estudio se mantuvo a temperatura constante de 20°C durante los tres casos de agitación (0, 150 y 200rpm). Se utilizó una trampa de aire de tipo “S” para permitir la salida de dióxido de carbono del biorreactor sin permitir la entrada de aire desde el exterior.



Figura 9 Trampa de aire utilizada durante los experimentos.

3.5. Seguimiento de la Fermentación

Para monitorear la evolución de la fermentación se llevaron a cabo muestreos cada 12 horas. En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se tomó una muestra representativa del medio de 1 mL, para después agitar en un baño ultrasónico durante 3 minutos para desgasificar la solución, una vez transcurrido el tiempo estipulado se pasó a centrifugar a 13,000 RPM durante 2 minutos para precipitar sólidos suspendidos y la biomasa

contenida. Ya que culminó la operación de centrifugado se procedió a separar el sobrenadante del precipitado, dejando ambas muestras en incubación a 2°C para su posterior estudio. El diagrama de flujo se muestra en la figura 8.

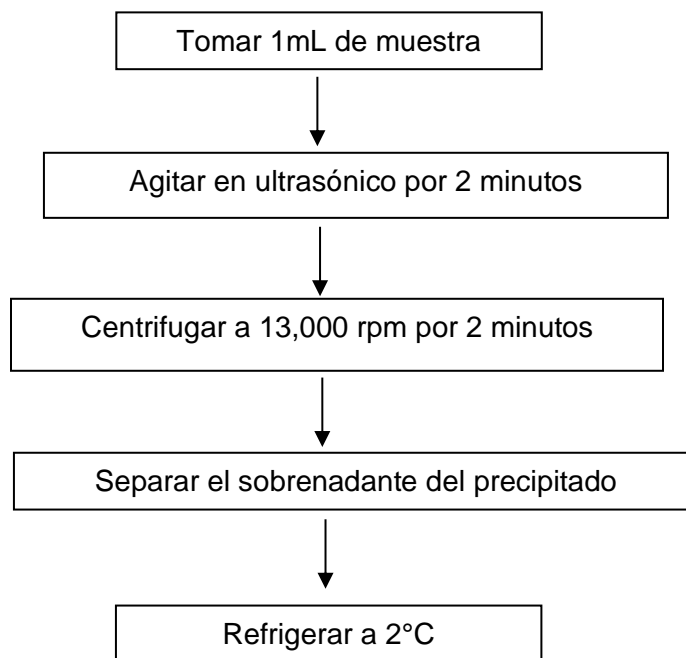


Figura 10 Diagrama de flujo de los muestreos realizados para monitorear la fermentación

3.6. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

El progreso de la fermentación fue estudiado mediante el desarrollo de las concentraciones de carbohidratos y etanol. Las muestras fueron analizadas en un Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) Varian Pro-Star 210 con sistema de bombeo integrado, detectores de infrarrojo, índice de refracción

(RI detector Varian ProStar 356) y UV-VIS (dado que son sustancias que absorben la radiación).

Para la realización de la presente investigación, el sistema HPLC trabajó con una columna Agilent Technologies HI-PLEX H (300x7.7mm) contenida en ella una fuerte resina de intercambio iónico que se usa predominantemente para la separación de carbohidratos y ácidos orgánicos. Esta columna utiliza un mecanismo de separación para el análisis de azúcares simples, alcoholes, oligosacáridos. La columna operó a una temperatura controlada de 67°C con un flujo de 0.76 mL/min de agua grado HPLC como fase móvil.

Para poder comenzar con el análisis, se tomaron las muestras de sobrenadante, para después filtrarlas apoyado de una jeringa con filtro de 20µm (Whatman), dando un baño sónico de 1 minuto para remover lo que queda de remanente de dióxido de carbono disuelto en la muestra y finalmente inyectar 30µL a la columna de HPLC. Se analizaron las concentraciones de los carbohidratos glucosa y maltosa (ya que la levadura utilizada es incapaz de metabolizar los trisacáridos), y de los productos etanol, acetaldehído y ácido acético.

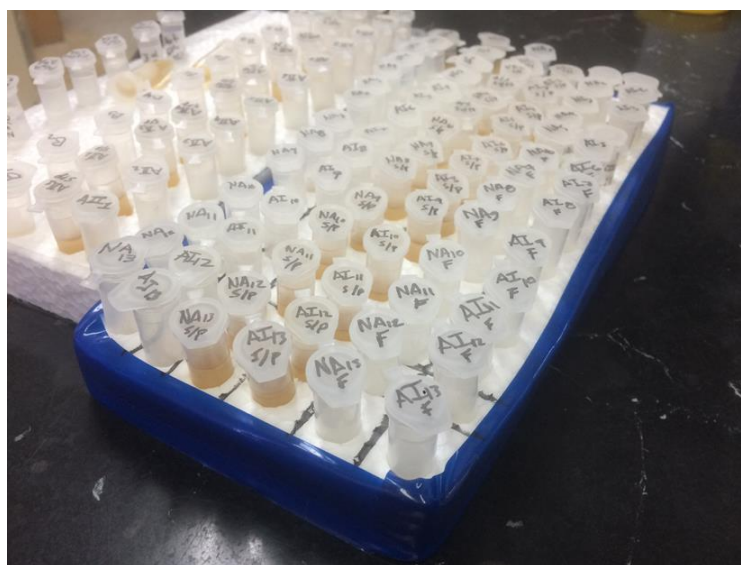


Figura 11 Muestras refrigeradas que se utilizaron para el análisis de HPLC y peso seco.



Figura 12 Equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia Varian ProStar 210 utilizado en el análisis de carbohidratos.

3.7. Análisis de Peso Seco de la Muestra

Se tomó como base del análisis el precipitado de la muestra. Inicialmente se hidrató con 1 mL de agua destilada para después re suspender con ayuda de un agitador vortex durante 1 minuto. Posteriormente se introdujo la muestra agitada en una centrifuga para volver a precipitar los sólidos suspendidos a 13,000 rpm durante 2 minutos, volviendo a tener la muestra precipitada, se volvió a separar el sobrenadante y se repitió el procedimiento completo de hidratación, agitación, centrifugado y separación en tres ocasiones, asegurando la mínima cantidad de alcohol y azucares presentes residuales que pudieran alterar la masa seca. Subsecuentemente la muestra fue sumergida en

nitrógeno líquido hasta su congelación, para finalizar liofilizándola durante 12 horas en un liofilizador Labconco FreeZone 4.5 hasta obtener un peso constante y transcurrido ese tiempo tomar la lectura del peso correctamente.



**Figura 13 Liofilizador Labconco FreeZone 4.5
utilizado para el análisis de peso seco.**

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos la fermentación tradicional (sin agitación) y los casos con agitación mecánica (100 y 200RPM).

4.1. Parámetros Adimensionales del Sistema

Los parámetros adimensionales obtenidos mediante las relaciones geométricas que permitirían un futuro escalamiento de esta configuración se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 2 Parámetros adimensionales del reactor

| | | |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| $\frac{D_A}{D_T} = 0.5$ | $\frac{H}{D_T} = 0.9$ | $\frac{J}{D_T} = 0.17$ |
| $\frac{E}{D_A} = 0.8$ | $\frac{W}{D_A} = 0.2$ | $\frac{L}{D_A} = 0.3$ |

4.2. Fermentación Tradicional (sin agitación)

Se realizó una fermentación sin agitación mecánica de un medio complejo de extracto de malta a 14°Bx, utilizando una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor con un volumen de 1L. En la siguiente figura se observa el comportamiento que siguieron los carbohidratos glucosa y maltosa, y los productos etanol, acetaldehído y ácido acético.

Del análisis de HPLC se muestra que el carbohidrato que se encuentra en mayor proporción es la maltosa con un valor de 170.2 g/L mientras que la glucosa está presente con 16.1 g/L. Se observa un consumo acelerado de maltosa alrededor de las 40h que coincide con el crecimiento celular acelerado correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, mostrando un comportamiento de generación de producto asociado al crecimiento celular. El valor máximo de etanol obtenido mediante esta configuración fue de 26.9 g/L a 120h de fermentación. La cantidad de acetaldehído remanente al final del experimento fue de 3.8 g/L.

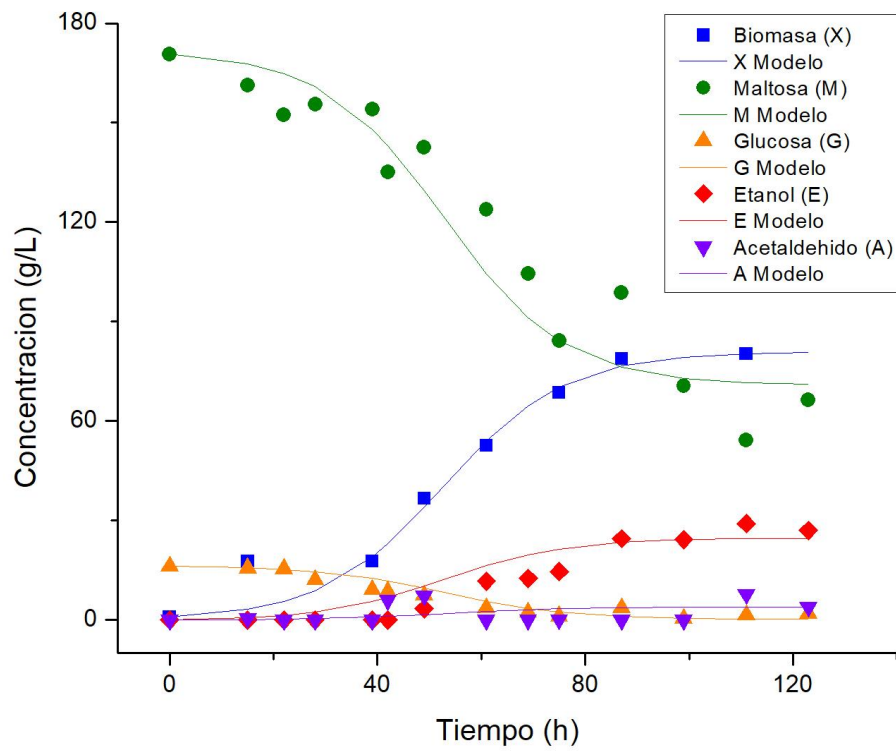


Figura 14 Concentraciones de carbohidratos y productos correspondientes al caso 1

4.3. Fermentación con Agitación Mecánica (150rpm)

Se realizó uno de los casos de fermentación con agitación mecánica, el correspondiente a 150rpm, donde se utilizó la misma cantidad del medio complejo de extracto de malta a 14°Bx, utilizando una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor con un volumen de 1L. En la siguiente figura se observa el comportamiento que siguieron los carbohidratos glucosa y maltosa, y los productos etanol, acetaldehído y ácido acético.

Del análisis de HPLC se muestra que los carbohidratos se encuentran en la misma proporción que el caso anterior con un valor inicial de maltosa y glucosa de 170.2 g/L y 16.2 g/L respectivamente. Se observa un consumo acelerado de maltosa alrededor de las 25h que coincide con el crecimiento celular acelerado correspondiente a la fase

exponencial de crecimiento, se observa que el efecto de la agitación mecánica acorta la duración de la fase de latencia, haciendo que el crecimiento celular de la fase exponencial se inicie antes, en comparación con el caso anterior. El valor máximo de etanol obtenido mediante esta configuración fue de 34.9 g/L a 120h de fermentación. La cantidad de acetaldehído remanente al final del experimento fue de 0.0 g/L, lo que se puede deber a que la cantidad de acetaldehído extracelular fue re metabolizado por la levadura debido a la dispersión homogénea dentro del reactor.

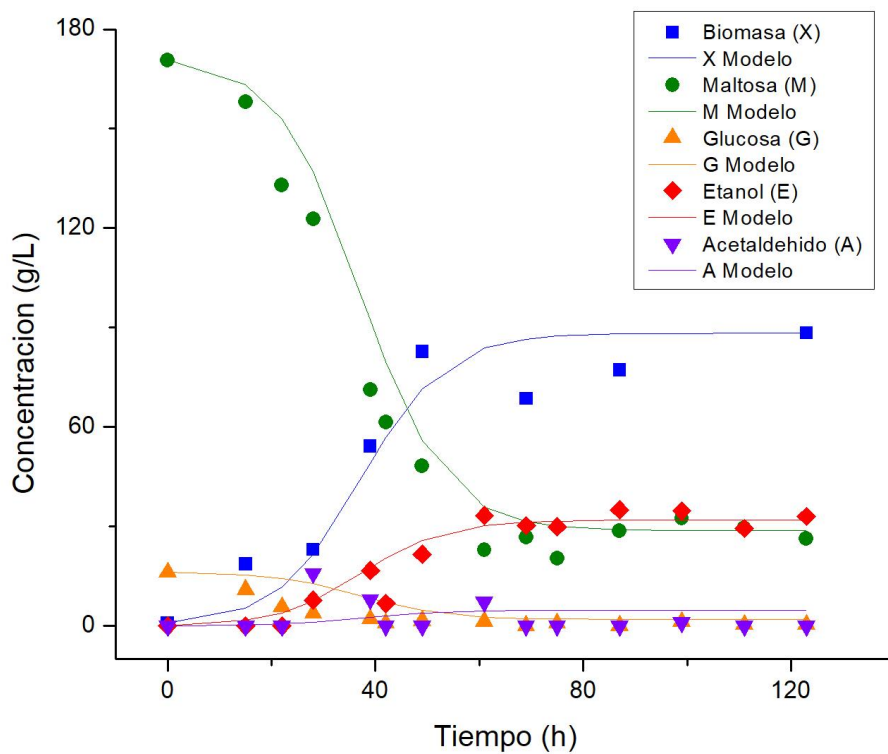


Figura 15 Concentraciones de carbohidratos y productos correspondientes al caso 2

4.4. Fermentación con Agitación Mecánica (200rpm)

Se realizó el segundo caso de fermentación con agitación mecánica, el correspondiente a 200rpm, donde se utilizó la misma cantidad del medio complejo de extracto de malta a 14°Bx, utilizando una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor con un volumen de 1L. En la siguiente figura se observa el comportamiento que siguieron los carbohidratos glucosa y maltosa, y los productos etanol, acetaldehído y ácido acético.

Del análisis de HPLC se muestra que los carbohidratos se encuentran en prácticamente la misma proporción que el caso anterior con un valor inicial de maltosa y glucosa de 170.1 g/L y 16.5 g/L respectivamente.

Se observa que existe un ligero aumento en el consumo de maltosa alrededor de antes de la marca de las 25h, como en el caso de agitación mecánica a 150RPM, que coincide con el crecimiento celular acelerado correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, se observa que el efecto de la agitación mecánica acorta aun un poco más la duración de la fase de latencia, haciendo que el crecimiento celular de la fase exponencial se inicie antes, en comparación con el caso anterior de agitación mecánica a 150RPM.

El valor máximo de etanol obtenido mediante esta configuración fue de 43.5 g/L a 120h de fermentación. La cantidad de acetaldehído remanente al final del experimento fue de 0.0 g/L, lo que se puede deber, nuevamente, a que la cantidad de acetaldehído extracelular presente en el volumen del reactor fue re metabolizado por la levadura debido a la dispersión homogénea dentro del reactor.

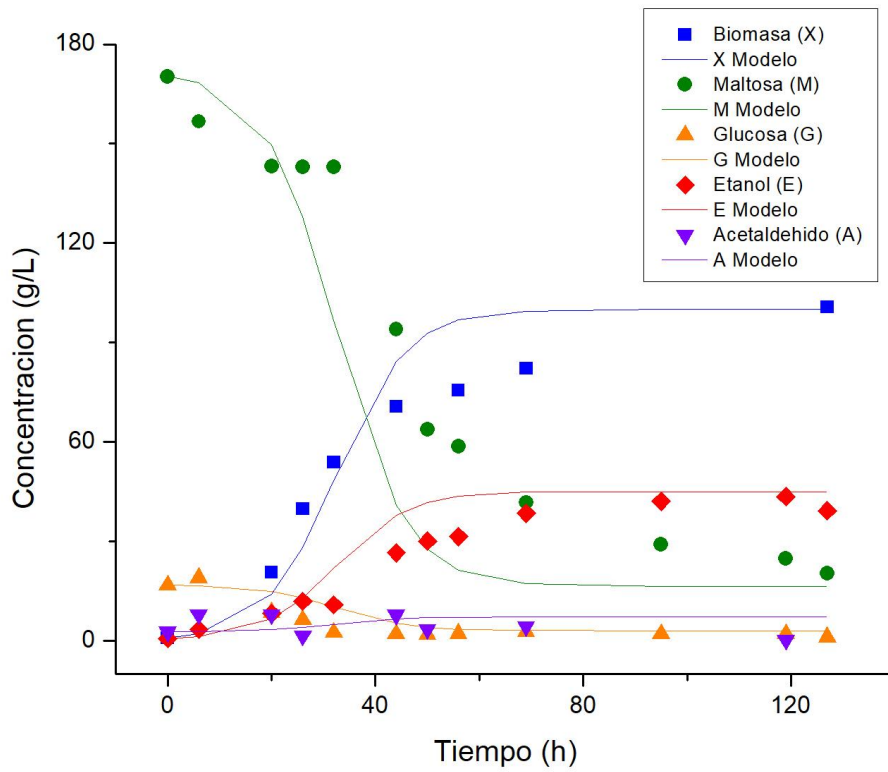


Figura 16 Concentraciones de carbohidratos y productos correspondientes al caso 3

4.4. Comparación entre los Sistemas de Fermentación

4.4.1. Consumo de glucosa

En la siguiente figura se muestran los consumos de glucosa para el caso de referencia de fermentación tradicional sin agitación mecánica y los dos casos con agitación mecánica (150 y 200 RPM). Para el caso sin agitación mecánica, se puede observar que la concentración de glucosa baja de los 5 g/L alrededor de las 50h. Mientras que para los casos con agitación mecánica ésta se consigue alrededor de las 25h.

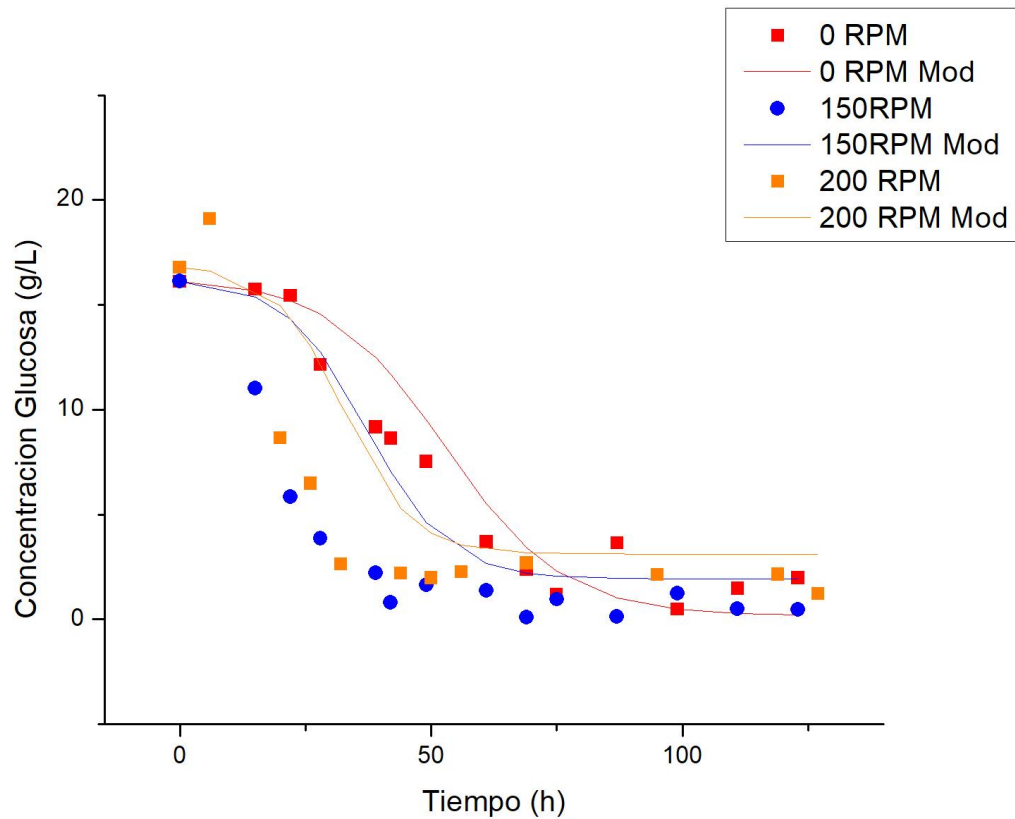


Figura 17 Consumo de glucosa para los tres casos

4.4.2. Consumo de maltosa

A continuación, se muestran los consumos de maltosa para el caso de referencia de fermentación tradicional sin agitación mecánica y los dos casos con agitación mecánica (150 y 200 RPM). En la siguiente figura, para el caso sin agitación mecánica, se puede observar que el consumo de maltosa se mantiene constante, con un valor de 129 g/L al transcurrir 50h del experimento. Mientras que para el caso con agitación mecánica a 150RPM y 200 RPM se tienen concentraciones que rondan los 60 g/L. El comportamiento entre los dos casos con agitación mecánica es bastante parecido.

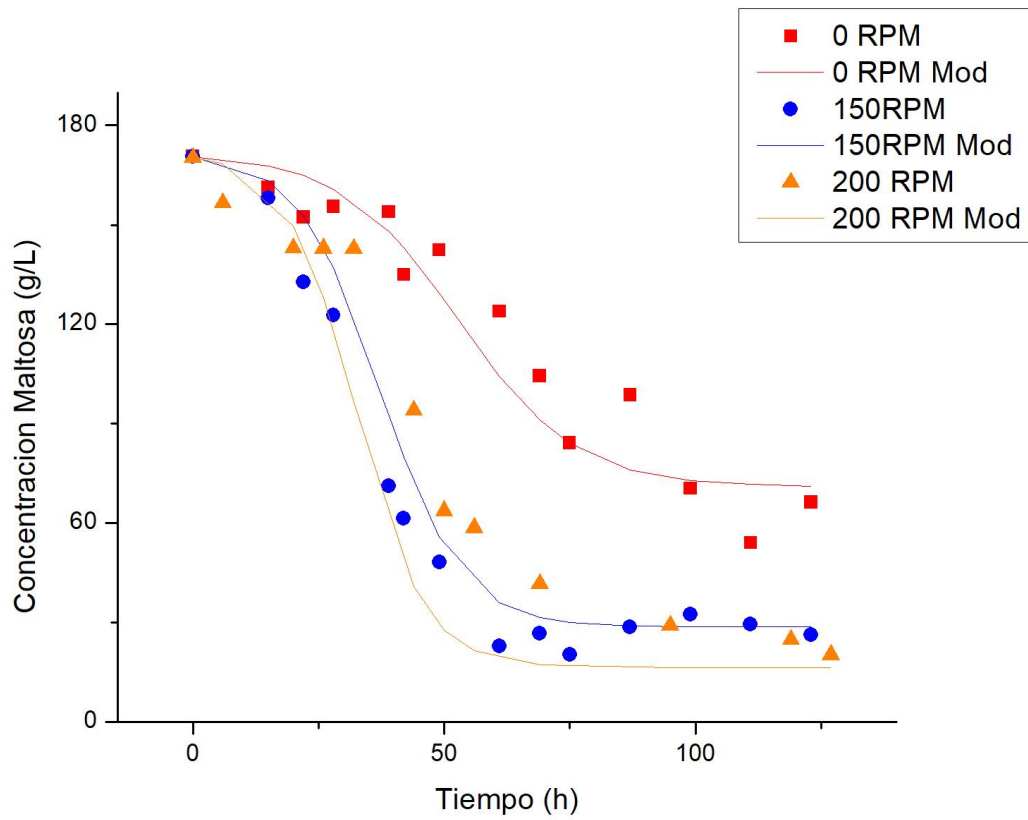


Figura 18 Consumo de maltosa para los tres casos

4.4.3. Generación de biomasa

En la siguiente figura se muestran los valores obtenidos mediante el análisis de peso seco. El primer caso, sin agitación mecánica, muestra una fase de latencia de aproximadamente 25h, donde comienza el crecimiento acelerado llegando a la fase exponencial de crecimiento. Para los casos con agitación mecánica, la fase de latencia es de menor duración, siendo para el caso con agitación mecánica de 200 RPM ligeramente más corto que el caso a 150 RPM. El crecimiento acelerado en el periodo inicial puede ocasionar un mayor aprovechamiento del oxígeno disuelto en el medio,

ocasionando un aumento en la cantidad de biomasa presente. Lo anterior se ve reflejado en el valor máximo alcanzado por cada configuración.

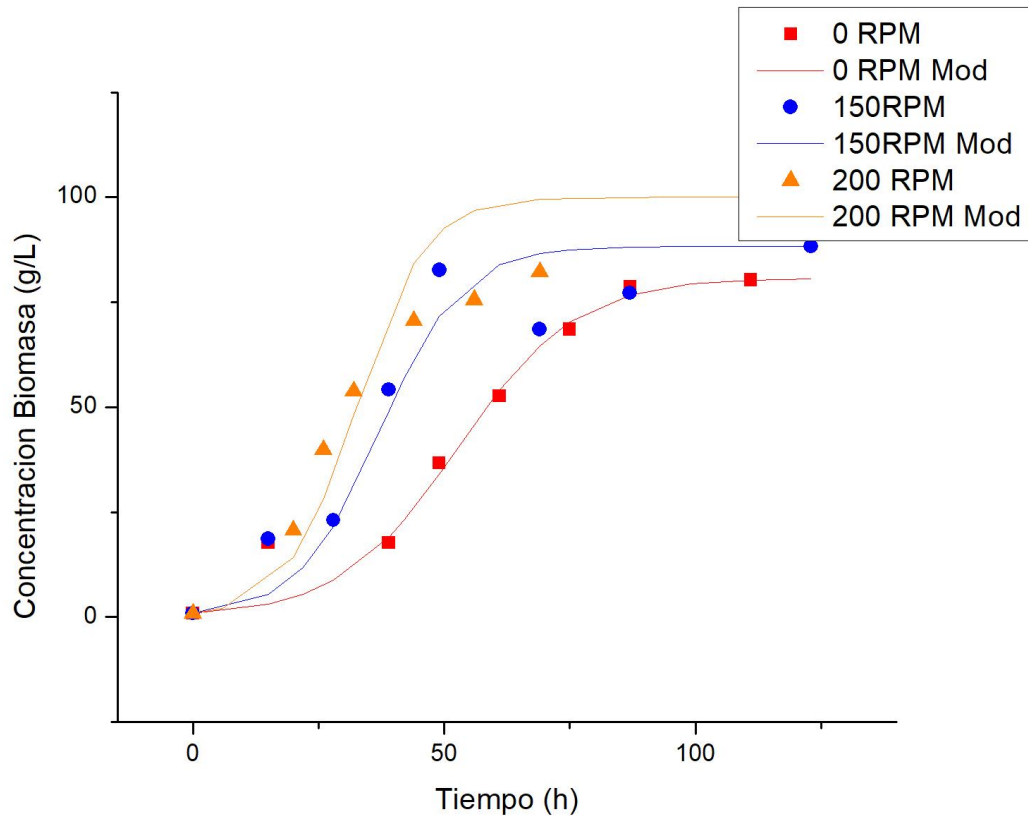


Figura 19 Generación de biomasa para los tres casos

4.4.4. Generación de etanol

A continuación, se muestra la generación de etanol en cada configuración. Para el primer caso, la generación de etanol no es detectable hasta alrededor de las 50h donde aparece el primer valor de concentración de etanol de 3.3 g/L. Para el caso con agitación mecánica de 150 RPM, el etanol aparece hasta transcurridas 25h con una concentración de 7.5 g/L. El caso con agitación mecánica a 200 RPM es el que genera etanol de manera más rápida, con una concentración de 3.2 g/L transcurridas alrededor de 6h. El valor máximo de etanol conseguido dentro de las 120h del experimento para el caso sin

agitación fue de 24.6 g/L. Para el caso con agitación mecánica a 150RPM fue de 34.6 g/L. Y para el caso con agitación mecánica a 200RPM fue un máximo de 43.5 g/L.

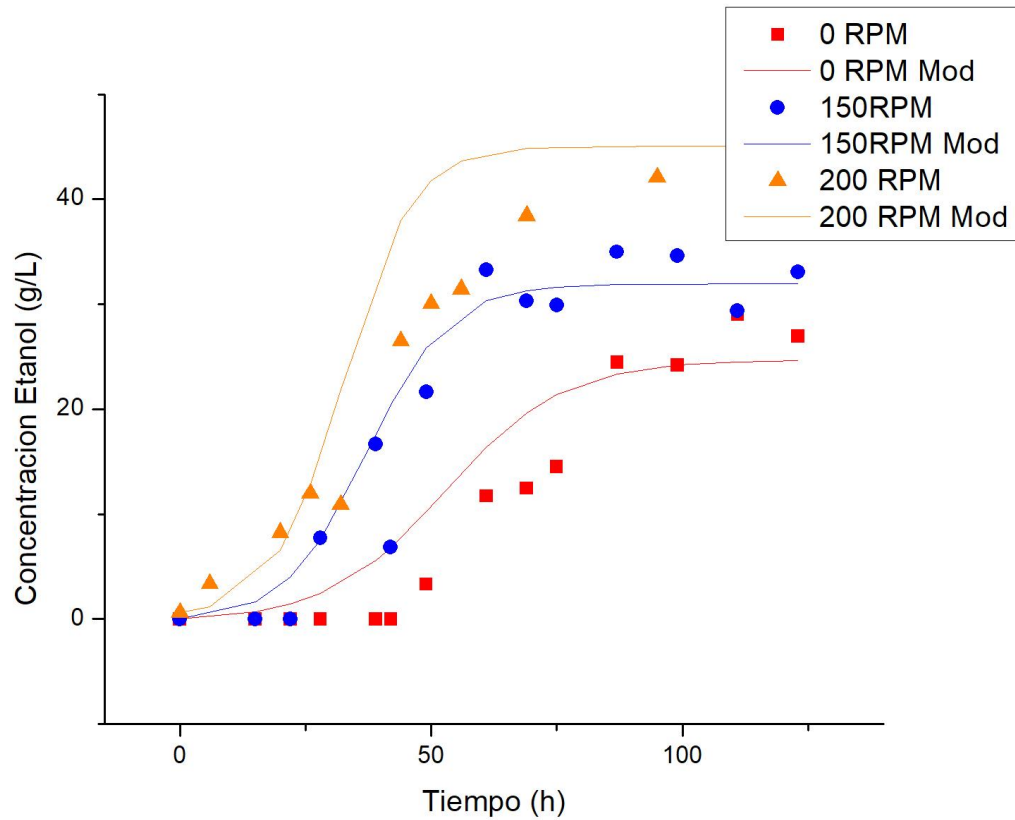


Figura 20 Generación de etanol para los tres casos

4.5. Parámetros de Fermentación

Se planteó el siguiente sistema de ecuaciones para obtener los valores correspondientes de rapidez específica de crecimiento para cada configuración:

Tabla 3 Sistema de ecuaciones que describen el problema

| Significado | Ecuación |
|-------------------------------|---|
| Consumo de sustrato (glucosa) | $\frac{dG}{dt} = -\mu_G * X(1 - X/X_\infty)$ |
| Consumo de sustrato (maltosa) | $\frac{dM}{dt} = -\mu_M * X(1 - X/X_\infty)$ |
| Generación de biomasa | $\frac{dX}{dt} = \mu_{net} * X(1 - X/X_\infty)$ |
| Producción de etanol | $\frac{dE}{dt} = \mu_E * X(1 - X/X_\infty)$ |
| Producción de acetaldehído | $\frac{dAA}{dt} = \mu_{AA} * X(1 - X/X_\infty)$ |

Al resolver este sistema de ecuaciones, se obtuvieron los valores de la rapidez específica de crecimiento para cada configuración, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4 Valores de rapidez específica de crecimiento, consumo de glucosa, maltosa y producción de etanol y acetaldehído obtenido para los tres casos

| RPM | μ_G (h⁻¹) | μ_M (h⁻¹) | μ_{net} (h⁻¹) | μ_E (h⁻¹) | μ_{AA} (h⁻¹) | X_∞ (g) |
|------------|--|--|--|--|---|----------------------------------|
| 0 | 0.017 | 0.106 | 0.085 | 0.026 | 0.004 | 80.6 |
| 150 | 0.020 | 0.200 | 0.123 | 0.045 | 0.006 | 81.3 |
| 200 | 0.020 | 0.225 | 0.145 | 0.065 | 0.006 | 88.3 |

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En esta investigación fue posible lograr el objetivo general de estudiar el efecto de la agitación mecánica en el desempeño de generación de etanol y subproductos no deseados mediante un trabajo experimental y se concluyó lo siguiente.

La fase de latencia se vio reducida a la mitad, de alrededor de 50h de duración en el caso tradicional sin agitación mecánica, a aproximadamente 25h, en los casos con agitación mecánica, permitiendo que la fase de crecimiento exponencial inicie antes en los casos antes mencionados. En un periodo más temprano en la fermentación. Ocasionando un consumo más acelerado de sustrato.

La generación de biomasa se ve ligeramente favorecida en los casos con agitación mecánica, aprovechando el oxígeno disuelto que se encuentra en las etapas tempranas de la fermentación, obteniéndose concentraciones mayores de biomasa para los casos con agitación mecánica de 100.1 g/L y 89.3 g/L para 150 RPM y 200 RPM respectivamente, mientras que para el caso sin agitación la biomasa llegó a 80.1 g/L. El daño celular parece no ser significativo ya que no hubo disminución en el crecimiento celular.

La pronta fase exponencial generó un consumo acelerado de sustrato, que ocasionó la detección de etanol en 42h para el caso sin agitación mecánica, 28h para el caso con agitación mecánica a 150RPM y en 6h para el caso con agitación mecánica a 200RPM.

Asimismo, las concentraciones máximas alcanzadas de etanol fueron mayores en los casos con agitación obteniéndose valores de 43.5 g/L y 34.6 g/L para los casos 200 y 150 RPM respectivamente, comparados con el máximo obtenido sin agitación mecánica que fue de 24.6 g/L.

En las etapas tempranas de la fermentación, la agitación mecánica redujo el tiempo entre 20 y 30%. Se alcanzó un 76.9% de conversión en el caso 3.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda complementar este trabajo con otros casos de agitación mecánica, esto para llegar a obtener la magnitud de agitación óptima para la generación de etanol. Probar con otros parámetros distintos a los estudiados en este trabajo.

A pesar de que no haya daño fisiológico aparente a las células, se recomienda hacer un estudio más profundo, que permita cuantificarla viabilidad de las células de levadura durante y después del proceso de fermentación.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, Avinash Kumar. 2007. "Biofuels (Alcohols and Biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines." *Progress in Energy and Combustion Science* 33(3):233–71.

Almeida, João RM et al. 2007. "Increased Tolerance and Conversion of Inhibitors in Lignocellulosic Hydrolysates by *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82(4):340–49.

Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review." *Bioresource Technology* 101(13):4851–61.

Bai, F. W., W. A. Anderson, and M. Moo-Young. 2008. "Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks." *Biotechnology Advances* 26(1):89–105.

Balat, Mustafa, Havva Balat, and Cahide Öz. 2008. "Progress in Bioethanol Processing." *Progress in Energy and Combustion Science* 34(5):551–73.

Barcelos, Carolina A., Roberto N. Maeda, Lídia Maria M. Santa Anna, and Nei Pereira. 2016. "Sweet Sorghum as a Whole-Crop Feedstock for Ethanol Production." *Biomass and Bioenergy* 94:46–56.

Bomgardner, MM. 2013. "Seeking Biomass Feedstocks That Can Compete." *Chemical and Engineering News* 91(31):11–15.

Bothast, R. J. and M. A. Schlicher. 2005. "Biotechnological Processes for Conversion of Corn into Ethanol." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(1):19–25.

Ram B, G.; Demirbas, A. Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants; Cambridge University Press, 2010. pp 85-115.

Cao, JF, BP Gao, and WB Gu. 2006. "Study on Producing Alcohol Fermentation Conditions by Sweet Sorghum Juice." *Acta Agriculturae Boreali Occidentalis Sinica* 15(3):201–3.

Cardona, C. A., J. A. Quintero, and I. C. Paz. 2010. "Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives." *Bioresource Technology* 101(13):4754–66.

Cardona, Carlos A. and Óscar J. Sánchez. 2007. "Fuel Ethanol Production: Process Design Trends and Integration Opportunities." *Bioresource Technology* 98(12):2415–57.

Chum, Helena L., Ethan Warner, Joaquim E. A. Seabra, and Isaias C. Macedo. 2014. "A Comparison of Commercial Ethanol Production Systems from Brazilian Sugarcane and US Corn." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8(2):205–23.

Dasgupta, Diptarka et al. 2013. "Design and Optimization of Ethanol Production from Bagasse Pith Hydrolysate by a Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces* Sp. IPE453 Using Response Surface Methodology." *SpringerPlus* 2(1):159.

Goldemberg, J. and J. Goldemberg. 2007. "Ethanol for a Sustainable Energy Future." *Science (Washington)* 315(5813):808–10.

Goldemberg, José. 2008. "The Brazilian Biofuels Industry." *Biotechnology for Biofuels* 1(1):6.

Gombert, Andreas K. and Antonius J. A. van Maris. 2015. "Improving Conversion Yield

of Fermentable Sugars into Fuel Ethanol in 1st Generation Yeast-Based Production Processes.” *Current Opinion in Biotechnology* 33:81–86.

Guo, Mingxin, Weiping Song, and Jeremy Buhain. 2015. “Bioenergy and Biofuels: History, Status, and Perspective.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42:712–25.

International Energy Agency. 2013. “Resources to Reserves 2013 - Oil, Gas and Coal Technologies for the Energy Markets of the Future.” *IEA Publications, Paris, France* 1–270.

International Energy Agency. 2015. “World Energy Outlook.” *IEA Publications, Paris, France* 1–12.

International Energy Agency. 2016. “Key World Energy Statistics.” *IEA Publications, Paris, France* 1–80.

Jambo, Siti Azmah et al. 2016. “A Review on Third Generation Bioethanol Feedstock.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 65:756–69.

Kaparaju, Prasad, María Serrano, Anne Belinda Thomsen, Prawit Kongjan, and Irini Angelidaki. 2009. “Bioethanol, Biohydrogen and Biogas Production from Wheat Straw in a Biorefinery Concept.” *Bioresource Technology* 100(9):2562–68.

King, D., O. R. Inderwildi, and A. Williams. 2010. “The Future of Industrial Biorefineries.” *World Economic Forum, Geneva, Switzerland* 1–40.

Kumar, CG, RN Rao, P.Srinivasa Rao, and A. Kamal. 2013. “Assessing Sweet Sorghum Juice and Syrup Quality and Fermentation Efficiency.” *Developing a Sweet Sorghum Ethanol Value Chain* 172–92.

Liang, Lei et al. 2008. “Study of Sugarcane Pieces as Yeast Supports for Ethanol Production from Sugarcane Juice and Molasses.” *Journal of Industrial Microbiology*

& *Biotechnology* 35(12):1605–13.

Lin, Yan and Shuzo Tanaka. 2006. "Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects." *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:627–42.

Lin, Y., W. Zhang, C. Li, K. Sakakibara, and S. Tanaka. 2012. "Factors Affecting Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces Cerevisiae* BY4742." *Biomass and Bioenergy* 47:395–401.

Luo, Lin, Ester Van Der Voet, and Gjalt Huppes. 2009. "An Energy Analysis of Ethanol from Cellulosic feedstock–Corn Stover." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (13):2003–2011.

Renewable Fuels Association. 2016. "World Fuel Ethanol Production." *Analysis of Public and Private Estimates*. Retrieved July 7, 2017

Moriarty, Kristi and Janet Yanowitz. 2015. "E15 and Infrastructure E15 and Infrastructure." *National Renewable Energy Laboratory (NREL)* (May):1–52.

Refaat, A. A. 2012. "Biofuels from Waste Materials." *Comprehensive Renewable Energy* 5:217–261, Elsevier Ltd.

Renewable Fuels Association. 2017. "Building Partnerships and Growing Markets: Ethanol Industry Outlook 2017." 1–40.

Rose, D. 1975. "Physical Responses of Yeast Cells to Osmotic Shock." *Journal of Applied Bacteriology* 38(2):169–75.

Sánchez, Óscar J. and Carlos A. Cardona. 2008. "Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks." *Bioresource Technology* 99(13):5270–95.

Schuler, M.; Kargi, F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*; Prentice Hall: New York, 2001; pp 155-165.

Swana, Jeffrey, Ying Yang, Mohsen Behnam, and Robert Thompson. 2011. "An

Analysis of Net Energy Production and Feedstock Availability for Biobutanol and Bioethanol." *Bioresource Technology* 102(2):2112–17.

Tan, Li et al. 2015. "Production of Ethanol from Raw Juice and Thick Juice of Sugar Beet by Continuous Ethanol Fermentation with Flocculating Yeast Strain KF-7." *Biomass and Bioenergy* 81:265–72.

World Energy Council. 2016. "World Energy Resources." *London, United Kingdom* 1:22–23.

Zabed, Hossain et al. 2014. "Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice." *The Scientific World Journal*.