



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

## TESIS

*Presentada para obtener el grado de*

*MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS*

*por*

Jonás Martínez Limón

Ingeniero Biotecnólogo

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON CÉLULAS INMOVILIZADAS**

**Dirigida por:**

Dr. Enrique Durán Páramo

México, D.F. a 2 de Diciembre de 2010

# Acta de revisión



SIP-14

## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13 horas del día 25 del mes de Noviembre del 2010, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON CÉLULAS INMOVILIZADAS.

Presentada por el alumno:

MARTÍNEZ  
Apellido paterno

LIMÓN  
Apellido materno

JONÁS  
Nombre(s)

Con registro: 

A	0	8	0	6	4	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

  
DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO

  
DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO


  
DR. RAMÓN VILLANUEVA ARCE

  
DR. MARÍA DEL CARMEN OLIVER SALVADOR

  
DR. LUIS FERNÁNDEZ LINARES

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
DR. EDGAR SALGADO MANJARREZ

  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

## Carta de cesión de derechos



### INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

*CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F. el día 24 del mes de noviembre del año 2010, el que suscribe Jonás Martínez Limón alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A080644, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Enrique Durán Páramo y cede los derechos del trabajo intitulado *Producción de bioetanol en cultivo sumergido con células libres e inmovilizadas de bacterias y levaduras*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [jml\\_chivigon@hotmail.com](mailto:jml_chivigon@hotmail.com) o [eduran@ipn.mx](mailto:eduran@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Jonás Martínez Limón

## Declaración de originalidad

Yo **Jonás Martínez Limón** declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.



---

Ing. Jonás Martínez Limón



---

Vo. Bo. Dr. Enrique Durán Páramo

## Agradecimientos

Le agradezco a Dios por permitirme realizar y finalizar este sueño, el cual había anhelado desde hace mucho tiempo y también por todas sus bendiciones.

Le agradezco a mi familia por todo su apoyo, comprensión, amor y tiempo, para la realización de este sueño, y además por todas sus aportaciones y críticas. Principalmente a mi mamá, Gisela y Diana, porque siempre han sido el motor que me mueve durante estos años difíciles de mi vida, gracias por su amor y comprensión y guía.

Le agradezco también a mi padre, que sé que está con Dios y cuida de todos nosotros, por todos y cada uno de los consejos que me dijo cuando vivía y que ahora entiendo porque los decía.

A mis compañeros, amigos y profesores de la maestría por todo su apoyo, principalmente Benjamín y Luis por darme la oportunidad de compartir esta etapa con ellos y no solamente eso, sino también por creer en mí y compartir sus vidas conmigo.

Le doy las gracias al Dr. Enrique Durán Páramo, por todas sus enseñanzas, por permitirme trabajar con él durante todos estos años y por todo su tiempo y dedicación para estar al pendiente de mí y del trabajo.

Al Dr. Ramón Villanueva Arce, al Dr. Gustavo Valencia del Toro, al Dr. Luis Fernández Linares y la Dra. María del Carmen Oliver Salvador, por tomarse el tiempo para revisar mi tesis y asesorarme en el proyecto. También al Dr. Fabián Robles Martínez que me apoyó en gran manera para la realización de esta tesis.

Además agradezco el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN) y al mismo Instituto Politécnico Nacional.

También se agradece al departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (Agricultural Research Service Culture Collection, NRRL) por la donación de las cepas.

*"El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños"*

Eleanor Roosevelt

## Resumen

Hoy en día, la eficiencia en la producción de etanol se ha incrementado de manera estable, ya que es considerado como un producto de alto valor agregado. Sin embargo, el uso del etanol como aditivo de combustible, solo podría ser considerado si se reducen los costos en la producción de etanol; por ello, la propuesta de trabajo está relacionada con el uso de cultivos mixtos con células de *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* libres e inmovilizadas en alginato de calcio. La hidrólisis ácida realizada con ácido sulfúrico al 5% de la muestra de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) permitió obtener la mayor concentración de azúcares fermentables maltosa y glucosa (74.9 g/L y 125.6 g/L, respectivamente). Para la hidrólisis enzimática, la muestra que produjo mayor concentración de azúcares fermentables maltosa y glucosa fue la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con 75.9 g/L y 48.6 g/L respectivamente. Se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, utilizando hidrolizado enzimático de yuca como fuente de carbono, las cuales fueron de 30-40 °C y pH de 5 y de 30-40 °C y pH de 8.5, respectivamente. Además, se determinaron las condiciones óptimas de producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, las cuales fueron de 40 °C y pH de 5-8.5 y de 40 °C y pH de 8.5, respectivamente. Para llevar a cabo la fermentación con células libres en cultivo mixto se usó en un reactor agitado de 2 L, con agitación de 100 rpm, pH inicial de 8.5 y 40 °C; fue inoculado primero con *Zymomonas mobilis* y 12 h después *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose una producción de etanol de 13.08 g/L, y un rendimiento de 0.5773 (gprod/gsubst). La fermentación con células inmovilizadas en cultivo mixto se llevó a cabo en un reactor agitado de 0.5 L, con agitación de aproximadamente 100 rpm, pH inicial de 8.5 y temperatura de 40 °C; fue inoculado primero con *Zymomonas mobilis* y 8 h después *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose una producción de etanol de 8.42 g/L y un rendimiento de 0.4097 (gprod/gsubst). Con estos resultados podemos decir que la inmovilización tuvo un efecto positivo en la producción de biomasa, sin embargo la producción de etanol se ve disminuida en un 35%. Por eso es recomendable probar nuevos sistemas de cultivo usando células libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.

## Abstract

Nowadays, the efficiency in the ethanol production has been increased of stable way, since it is considered like a product of high added value. Nevertheless, the use of the ethanol like fuel additive could only be considered if the costs in the ethanol production are reduced; for this reason, the work proposal is related to the use of mixed cultures with cells free and immobilized of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate. The realized acid hydrolysis with sulfuric acid to 5% of cassava sample (*Manihot esculenta* Crantz) allowed obtaining the greater fermentable sugar concentration maltose and glucose (74.9 g/L and 125.6 g/L, respectively). For enzymatic hydrolysis, the sample of which produced major fermentable sugar concentration maltose and glucose was the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with 75.9 g/L and 48.6 g/L respectively. The optimal conditions of growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* were determined, using enzymatic hydrolysate of cassava like carbon source, which was of 30-40 °C and pH of 5 and 30-40 °C and pH of 8.5, respectively. In addition, the optimal conditions of ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* were determined, which was of 40 °C and pHs of 5-8.5 and 40 °C and pH of 8.5, respectively. In order to carry out the fermentation with free cells in mixed culture it was used in a shaken reactor of 2 L, with agitation of 100 rpm, 40 °C and initial pH of 8.5; it was inoculated first with *Zymomonas mobilis* and 12 h later *Saccharomyces cerevisiae*, obtaining a ethanol production of 13.08 g/L, and a yield of 0.5773 (gprod/gsubst). The fermentation with immobilized cells in mixed culture was carried out in a shaken reactor of 0.5 L, with agitation of approximately 100 rpm, initial pH of 8.5 and 40 °C of temperature; it was inoculated first with *Zymomonas mobilis* and 8 h later *Saccharomyces cerevisiae*, obtaining a ethanol production of 8.42 g/L and a yield of 0.4097 (gprod/gsubst). With these results we can say that immobilization had a positive effect in the biomass production, nevertheless the ethanol production is fallen in a 35 %. For that reason he is recommendable to prove new systems of culture using free, immobilized and co-immobilized cells of *S. cerevisiae* and *Z. mobilis*.

# Contenido

Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tablas .....	xii
I. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.1.1. Biocombustibles.....	2
1.1.2. Biocombustibles líquidos.....	4
1.1.3. Producción de etanol por fermentación.....	6
1.1.4. <i>Zymomonas mobilis</i> .....	9
1.1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
1.1.6. Sustratos para producción de etanol.....	13
1.1.7. Inmovilización celular.....	15
1.1.8. Producción de etanol con células inmovilizadas.....	16
1.1.9. Producción de etanol con células co-inmovilizadas.....	18
1.2. Objetivos.....	22
1.2.1. Generales.....	22
1.2.2. Específicos.....	22
1.3. Justificación.....	23
II. Materiales y métodos.....	24
2.1. Sustratos.....	24
2.1.1. Preparación de la harina.....	24
2.2. Hidrólisis.....	24
2.2.1. Hidrólisis ácida.....	24
2.2.2. Hidrólisis enzimática.....	25
2.3. Microorganismos y medio de cultivo.....	26
2.3.1. Mantenimiento.....	26
2.3.2. Producción de etanol.....	27
2.4. Estimación de la concentración de biomasa libre por peso seco.....	27
2.5. Técnica de inmovilización celular por atrapamiento.....	28
2.6. Estimación de la concentración de biomasa inmovilizada por peso seco.....	29



2.7.	Determinación de azúcares del caldo de cultivo.....	30
2.7.1.	Determinación de glucosa y maltosa del caldo de fermentación por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución). ....	30
2.7.2.	Cuantificación de azúcares reductores por el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico). ....	31
2.8.	Determinación por HPLC de ácidos orgánicos y alcoholes (etanol) del caldo de fermentación. ....	33
2.9.	Diseño experimental y análisis de resultados.....	34
III.	Resultados y discusión .....	38
3.1.	Hidrólisis. ....	38
3.1.1.	Hidrólisis ácida. ....	38
3.1.2.	Hidrólisis enzimática.....	39
3.2.	Determinación del pH y temperatura óptimos.....	41
3.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NRRL-6673).....	41
3.2.2.	<i>Zymomonas mobilis</i> (NRRL-14234).....	48
3.3.	Fermentación en cultivo sumergido mixto. ....	56
3.3.1.	Producción de bioetanol con células libres.....	57
3.3.2.	Producción de bioetanol con células inmovilizadas independientemente. ....	59
IV.	Conclusiones.....	62
V.	Perspectivas.....	63
VI.	Bibliografía.....	64
VII.	Anexos. ....	67
7.1.	Gráficas para la caracterización cinética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	67
7.2.	Algoritmos para determinar los coeficientes de regresión múltiple por el método matricial.....	73
7.3.	Gráficas para la caracterización cinética de <i>Zymomonas mobilis</i> . ....	74

## Índice de Figuras

Figura 1. Biocombustibles: desde la materia prima hasta el uso final. -----	2
Figura 2. Demanda de energía primaria por fuentes, 2005. -----	3
Figura 3. Tendencias en el consumo de biocombustibles para el transporte. -----	4
Figura 4. Conversion de materias primas agrícolas en biocombustibles líquidos. -----	5
Figura 5. Ruta metabólica de fermentación de etanol (EMP) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . -----	8
Figura 6. Estrés ambiental en <i>S. cerevisiae</i> durante la fermentación de etanol. -----	9
Figura 7. Ruta metabólica de fermentación de etanol (ED) en <i>Zymomonas mobilis</i> .-----	11
Figura 8. Métodos de inmovilización celular. -----	16
Figura 9. Sistema de inmovilización celular. -----	29
Figura 10. Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). -----	31
Figura 11. Representación geométrica del diseño $3^2$ .-----	35
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 30°C y pH 5. -----	42
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 30°C y pH 6.8. -----	42
Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 30°C y pH 8.5. -----	43
Figura 15. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 30°C. -----	44
Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para determinar la temperatura y pH óptimos de crecimiento. -----	46
Figura 17. Gráfica de superficie de respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para determinar la temperatura y pH óptimos de producción. -----	48
Figura 18. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 30°C y pH 5. -----	49
Figura 19. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 30°C y pH 6.8.-----	50
Figura 20. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 30°C y pH 8.5.-----	50

Figura 21. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 30°C.-----	52
Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta de <i>Zymomonas mobilis</i> para determinar la temperatura y pH óptimos de crecimiento.-----	53
Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta de <i>Zymomonas mobilis</i> para determinar la temperatura y pH óptimos de producción. -----	55
Figura 24. Fermentación en biorreactor de 2L con células libres de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i> en cultivo mixto.-----	57
Figura 25. Fermentación en biorreactor de 2L con células libres en cultivo mixto de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i> .-----	58
Figura 26. Fermentación en biorreactor de 0.5L con células inmovilizadas de manera independiente en cultivo mixto de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i> .-----	59
Figura 27. Fermentación en biorreactor de 0.5L con células inmovilizadas de manera independientes en cultivo mixto de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i> . -----	60
Figura 28. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 35°C y pH 5.-----	67
Figura 29. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 35°C y pH 6.8. -----	68
Figura 30. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 35°C y pH 6.8. -----	68
Figura 31. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 35°C y pH 8.5. -----	69
Figura 32. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 35°C. -----	70
Figura 33. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 40°C y pH 5.-----	70
Figura 34. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 40°C y pH 6.8. -----	71
Figura 35. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 40°C y pH 8.5. -----	71
Figura 36. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a 40°C. -----	72
Figura 37. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 35°C y pH 5. -----	74

Figura 38. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 35°C y pH 6.8.-----	75
Figura 39. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 35°C y pH 6.8.-----	75
Figura 40. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 35°C y pH 8.5.-----	76
Figura 41. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 35°C.-----	77
Figura 42. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 40°C y pH 5. -----	77
Figura 43. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 40°C y pH 6.8.-----	78
Figura 44. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 40°C y pH 8.5.-----	78
Figura 45. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> a 40°C.-----	79

## Índice de Tablas

Tabla 1. Rendimientos de los biocombustibles para diferentes materias primas y países. -----	7
Tabla 2. Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>Zymomonas</i> en medio líquido. -----	10
Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>Zymomonas</i> en medio líquido. -----	10
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo para el mantenimiento. -----	26
Tabla 5. Composición del medio de cultivo para la producción de etanol. -----	27
Tabla 6. Diluciones para la curva patrón de azúcares reductores (glucosa o maltosa). -----	33
Tabla 7. Hidrólisis ácida de yuca ( <i>Yucca schidigera</i> ), yuca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) y makal ( <i>Xanthosoma yucatanensis</i> ). -----	38
Tabla 8. Hidrólisis enzimática de yuca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) y makal ( <i>Xanthosoma yucatanensis</i> ). -----	40
Tabla 9. Datos linealizados de las cinéticas de <i>S. cerevisiae</i> realizadas a 30°C. -----	44
Tabla 10. Velocidades específicas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> ( $h^{-1}$ ). -----	45
Tabla 11. Rendimiento de producto en base al sustrato ( $Y_p/s$ ) (g prod/g sust) de <i>S. cerevisiae</i> . -----	47
Tabla 12. Datos linealizados de las cinéticas de <i>Z. mobilis</i> realizadas a 30°C. -----	51
Tabla 13. Velocidades específicas de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> ( $h^{-1}$ ). -----	51
Tabla 14. Rendimiento de producto en base al sustrato ( $Y_p/s$ ) (g prod/g sust) de <i>Z. mobilis</i> . -----	54
Tabla 15. Parámetros óptimos de crecimiento y producción de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i> . -----	56
Tabla 16. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 35°C con <i>S. cerevisiae</i> . -----	69
Tabla 17. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 40°C con <i>S. cerevisiae</i> . -----	72
Tabla 18. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 35°C con <i>Z. mobilis</i> . -----	76
Tabla 19. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 40°C con <i>Z. mobilis</i> . -----	79

## I. INTRODUCCIÓN.

Una de las áreas donde la Biotecnología ha tenido mayor impacto hoy en día, no solo desde el punto de vista tecnológico, sino económico y social, es la producción de nuevos combustibles.

Hace 25 años Brasil, EU y recientemente en 1998 Canadá, eran los únicos países que producían grandes cantidades de bioetanol, a partir de azúcar de caña y de maíz. En la actualidad, la eficiencia en la producción de etanol se ha incrementado de manera estable, ya que es considerado como un producto de alto valor agregado (Wheals, Basso, Alves, & Amorim, 1999).

La principal ventaja del bioetanol sobre la gasolina es que proviene de fuentes renovables y su combustión produce una contaminación baja en comparación con la gasolina.

Debido a lo anterior, el principal motivo para llevar a cabo la producción de etanol combustible es evitar o disminuir cada vez más la dependencia al petróleo, usándolo como aditivo para la oxigenación del combustible, con lo que se reducirían las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos. Sin embargo, el etanol compite con el metanol y dos derivados del petróleo, el metil y el etil terbutil éter (MTBE y ETBE respectivamente), como aditivo de combustibles (Wheals, Basso, Alves, & Amorim, 1999).

Por estos motivos surge la necesidad de desarrollar alternativas para la producción de etanol, la cual en principio, puede ser la utilización de sustratos de bajo valor y de fácil conversión, para la producción de etanol.

Sin embargo, el uso del etanol como aditivo de combustible, solo podría ser considerado si se reducen los costos de producción; por lo que nuestra propuesta está relacionada con el uso de cultivos mixtos con células libres e inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1.1. Antecedentes.

### 1.1.1. Biocombustibles.

La FAO define a los biocombustibles como una fuente de energía renovable, ya que son una forma de energía solar transformada. Los biocombustibles se pueden clasificar según la fuente y el tipo (Figura 1).



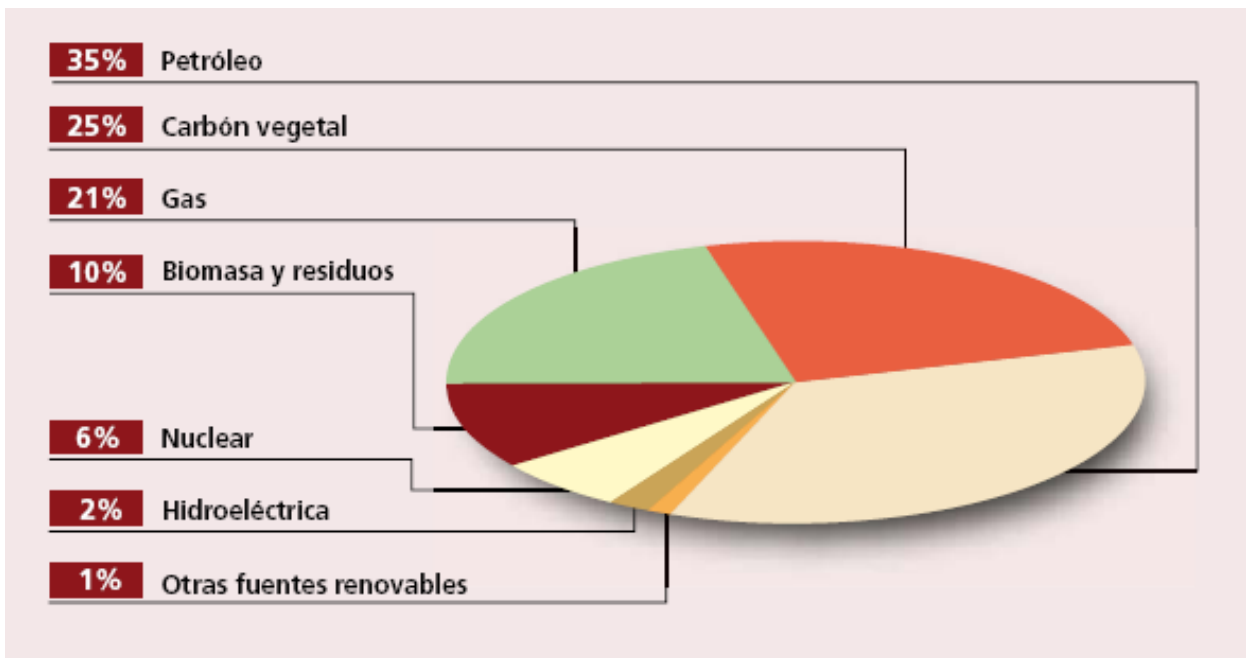
Figura 1. Biocombustibles: desde la materia prima hasta el uso final.

(FAO, 2008)

Aunque también se hace una distinción elemental entre biocombustibles primarios (sin elaborar) y secundarios (elaborados):

- ❖ Los biocombustibles primarios, como la leña, las astillas y los gránulos de madera son de combustión directa y en general se usa para satisfacer la demanda de combustible para cocinar o generar calefacción o electricidad en aplicaciones industriales en pequeña y gran escala.
- ❖ Los biocombustibles secundarios en forma sólida (por ejemplo, el carbón vegetal), líquida (por ejemplo, el etanol y el biodiésel), o gaseosa (por ejemplo, el biogás, el gas de síntesis y el hidrógeno) pueden usarse en un número mayor de aplicaciones, como el transporte y procesos industriales a altas temperaturas.

La demanda mundial total de energía primaria asciende a unos 11 400 millones de toneladas equivalentes de petróleo (emtp) por año; la biomasa, incluidos los productos agrícolas y forestales y los desechos y residuos orgánicos, representan el 10 por ciento de ese total (Figura 2). Las fuentes de energía renovable, entre las que ocupa un lugar importante la biomasa, representan el 13 por ciento aproximadamente del suministro total de energía primaria (FAO, 2008).



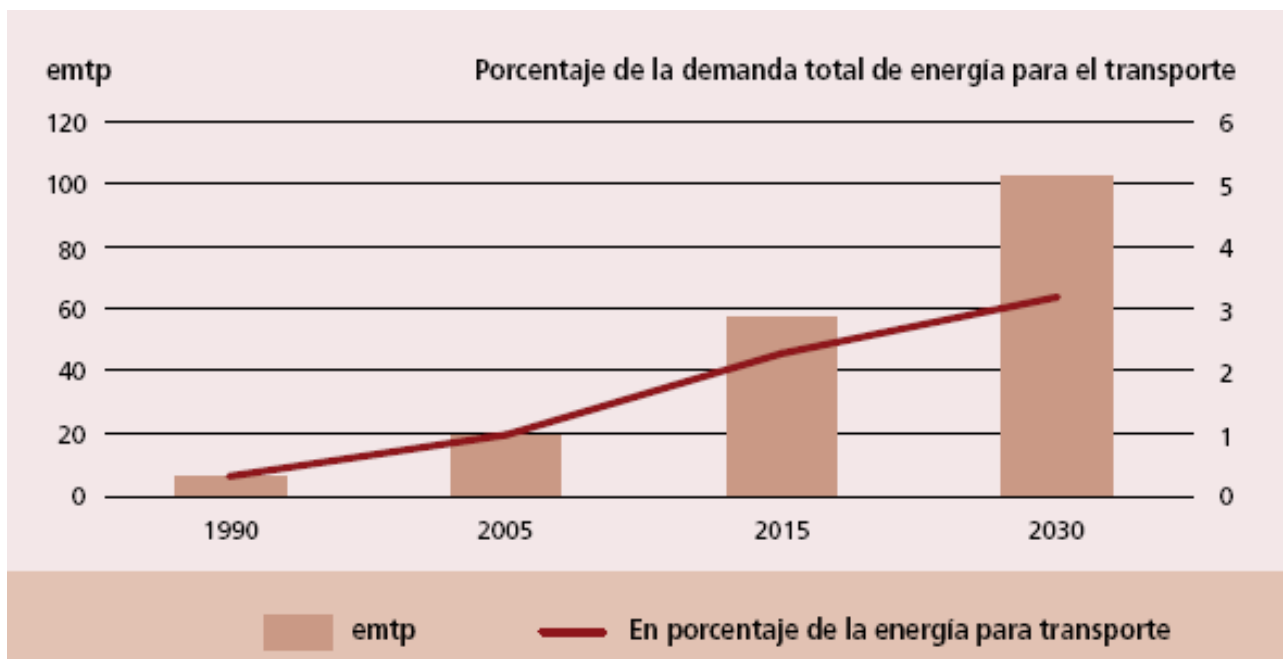
**Figura 2. Demanda de energía primaria por fuentes, 2005.**

(FAO, 2008)



### 1.1.2. Biocombustibles líquidos.

Como se menciona con anterioridad, los biocombustibles líquidos se utilizan principalmente para el transporte. Los cuales, en años recientes, han tenido un rápido aumento tanto en lo que respecta a su volumen como a la parte que les corresponde en la demanda mundial de energía para el transporte. Se prevé que continúe este crecimiento, tal como se ilustra en la Figura 3, en la que se muestran las tendencias históricas, así como las proyecciones para 2015 y 2030 (AIE, 2007).



**Figura 3. Tendencias en el consumo de biocombustibles para el transporte.**

(FAO, 2008)

En su mayor parte los biocombustibles líquidos, han adquirido la forma de etanol, producido a partir de cultivos de azúcar o almidón, o de biodiesel derivado de cultivos oleaginosos. Como se muestra en la Figura 4, se puede usar toda una gama de cultivos como materia prima para producir etanol y biodiésel.

No obstante, en su mayor parte, la producción mundial de etanol se deriva de la caña de azúcar o el maíz; en Brasil, el mayor porcentaje de la producción de etanol se deriva de la caña de azúcar, y en los Estados Unidos de América, del maíz.

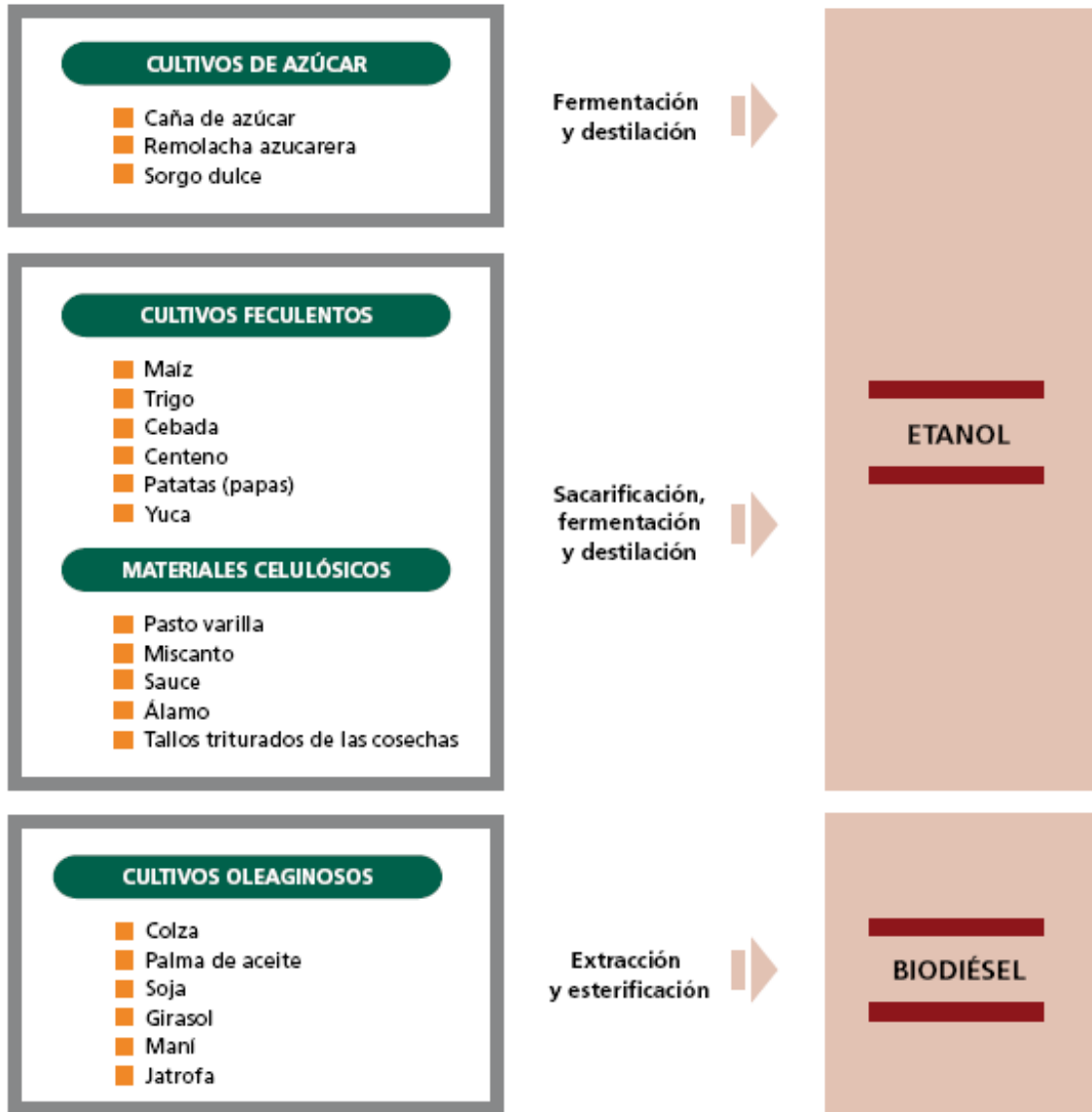


Figura 4. Conversion de materias primas agrícolas en biocombustibles líquidos.

(FAO, 2008)

Entre otros cultivos importantes se cuentan la yuca, el arroz, la remolacha azucarera y el trigo. En el caso del biodiésel, las materias primas de mayor popularidad son la colza en la Unión Europea, la soja en los Estados Unidos de América y el Brasil, y los aceites de palma y coco en los países tropicales y subtropicales.

### **1.1.3. Producción de etanol por fermentación.**

En 1975, Brasil lanzó el primer gran programa para la producción de etanol utilizando azúcar de caña y posteriormente diversos programas en USA en 1978 y Canadá en 1998, utilizando almidón de maíz. La ventaja de estos programas, desde un punto de vista ambiental, es que provienen de fuentes renovables altamente sustentables y con una menor contaminación en la combustión que la gasolina (Wheals, Basso, Alves, & Amorim, 1999). Actualmente el 1 de febrero de 2008, se expidió la ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos en México, la cual tiene como fines principales: promover la producción de insumos para Bioenergéticos, a partir de las actividades agropecuarias, forestales, algas, procesos biotecnológicos y enzimáticos del campo mexicano, sin poner en riesgo la seguridad y soberanía alimentaria del país y desarrollar la producción, comercialización y uso eficiente de los Bioenergéticos para contribuir a la reactivación del sector rural, la generación de empleo y una mejor calidad de vida para la población; en particular las de alta y muy alta marginalidad (Congreso, 2008).

En años recientes, muchas investigaciones se han dirigido a la utilización de nuevos sustratos de fácil conversión y mayor productividad de etanol, como los almidones y otras fuentes lignocelulosicas (Gunasekaran & Chandra Raj, 1999). Actualmente, la producción de etanol a partir de la caña de azúcar o la remolacha azucarera exhibe los rendimientos más altos, con Brasil a la cabeza de los países que producen etanol a partir de la caña de azúcar en lo que se refiere al rendimiento de biocombustible por hectárea, seguido de cerca por la India.

Los rendimientos por hectárea son algo más bajos en el caso del maíz, aunque con marcadas diferencias entre éstos; por ejemplo, en China y los Estados Unidos de América. Los datos que se muestran en el Tabla 1 reflejan solamente los rendimientos técnicos. Lo que cuesta producir biocombustibles a partir de diferentes cultivos en diferentes países puede seguir patrones muy diferentes.

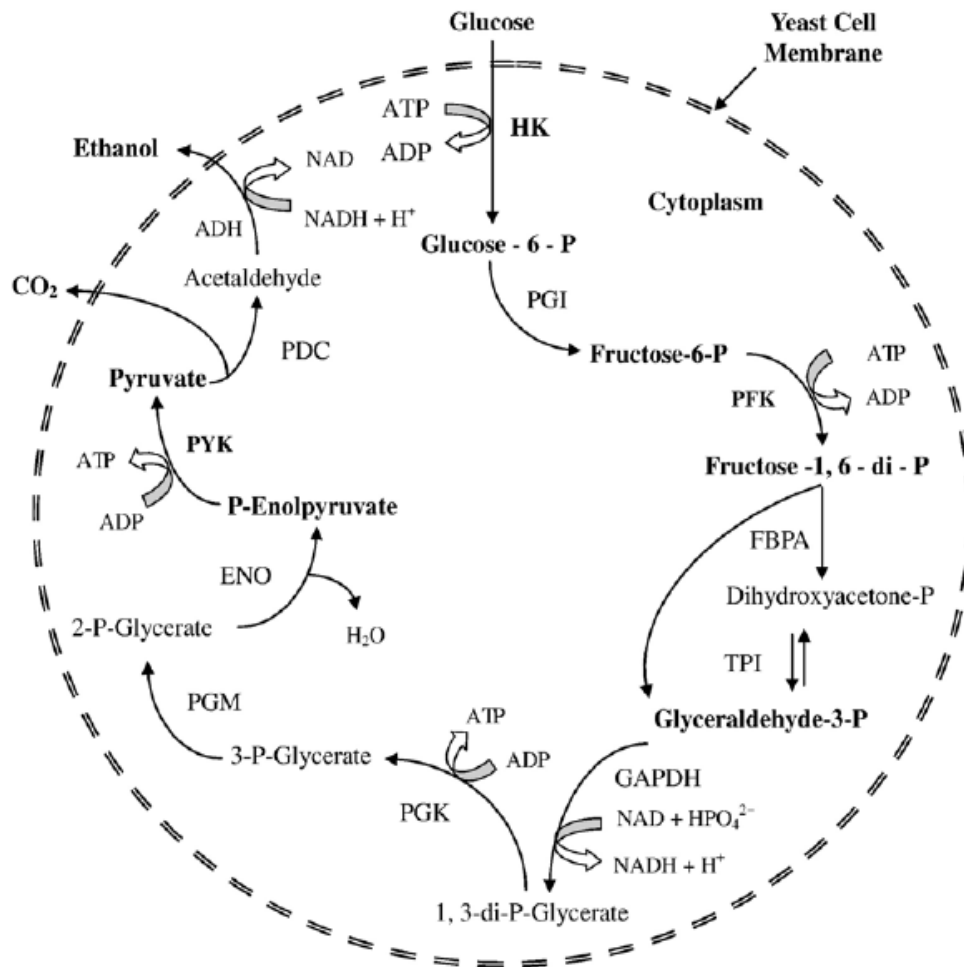
Tabla 1. Rendimientos de los biocombustibles para diferentes materias primas y países.

CULTIVO	ESTIMACIONES MUNDIALES/ NACIONALES	BIOCOM-BUSTIBLE	RENDIMIENTO DEL CULTIVO	EFICIENCIA DE LA CONVERSIÓN	RENDIMIENTO DEL BIOCOMBUSTIBLE
			(Toneladas/ha)	(Litros/tonelada)	(Litros/ha)
Remolacha azucarera	Mundial	Etanol	46,0	110	5 060
Caña de azúcar	Mundial	Etanol	65,0	70	4 550
Yuca	Mundial	Etanol	12,0	180	2 070
Maíz	Mundial	Etanol	4,9	400	1 960
Arroz	Mundial	Etanol	4,2	430	1 806
Trigo	Mundial	Etanol	2,8	340	952
Sorgo	Mundial	Etanol	1,3	380	494
Caña de azúcar	Brasil	Etanol	73,5	74,5	5 476
Caña de azúcar	India	Etanol	60,7	74,5	4 522
Palma de aceite	Malasia	Biodiésel	20,6	230	4 736
Palma de aceite	Indonesia	Biodiésel	17,8	230	4 092
Maíz	Estados Unidos de América	Etanol	9,4	399	3 751
Maíz	China	Etanol	5,0	399	1 995
Yuca	Brasil	Etanol	13,6	137	1 863
Yuca	Nigeria	Etanol	10,8	137	1 480
Soja	Estados Unidos de América	Biodiésel	2,7	205	552
Soja	Brasil	Biodiésel	2,4	205	491

(FAO, 2008)

En 2008 Bai *et al.*, mencionan que el etanol, siendo tanto renovable como ecológico, es una de las mejores alternativas para disminuir el consumo de productos derivados del petróleo, por ello es que se ha aumentado dramáticamente su capacidad de producción. También mencionan que entre muchos microorganismos que han sido estudiados para la producción de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* todavía permanece como la especie principal. Sin embargo, *Zymomonas mobilis* también ha sido estudiada de manera intensiva durante las tres décadas pasadas y algunos investigadores la proponen para sustituir a *S. cerevisiae* en la producción de etanol, debido a que esta especie posee algunas "características superiores" para la producción de etanol.

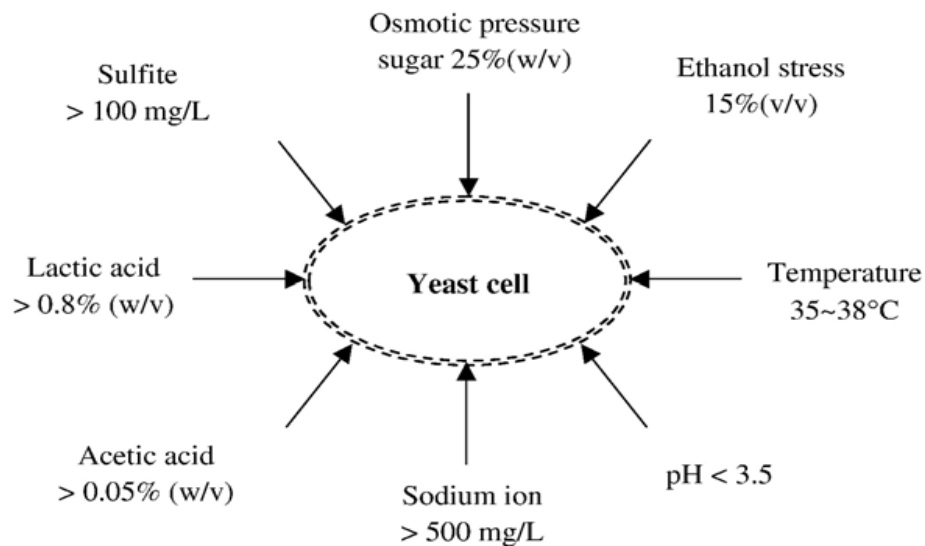
Para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* los autores mencionan que la ruta metabólica principal en la fermentación de etanol es la glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP Figura 5), por la cual la molécula de glucosa es metabolizada, y dos moléculas de piruvato son producidas. Bajo condiciones anaeróbicas el piruvato es reducido a etanol con la liberación de  $\text{CO}_2$ .



**Figura 5. Ruta metabólica de fermentación de etanol (EMP) en *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Abreviaciones:** HK: hexoquinasa, PGI: fosfoglucoisomerasa, PFK: fosfofructoquinasa, FBPA: fructosa bisfosfato aldolasa, TPI: triosa fosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato dihidrogenasa, PGK: fosfoglicerato quinasa, PGM: fosfogliceromutasa, ENO: enolasa, PYK: piruvato quinasa, PDC: piruvato descarboxilasa, ADH: alcohol deshidrogenasa (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

Por otro lado, durante la fermentación de etanol, las células de levadura sufren varios tipos de estrés (Figura 6). Unos son ambientales, como la deficiencia nutritiva, el aumento de la temperatura y la contaminación, mientras los demás son propios del metabolismo celular como la acumulación de etanol y su efecto de inhibición sobre el crecimiento celular y la producción de etanol (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008), especialmente después de la hidrólisis ácida (o algún otro pretaramiento) de la materia prima, ya que los productos de este proceso son una mezcla de fuentes de carbono para la fermentación, la cual provoca un aumento en la presión osmótica (Mousdale, 2008).



**Figura 6. Estrés ambiental en *S. cerevisiae* durante la fermentación de etanol.**

(Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

Muchos de estos efectos son sinérgicos, ya que afectan más a las células de levadura que cualquiera de ellos por separado, provocando una reducción de la viabilidad de la levadura y la disminución en el rendimiento en la producción de etanol (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

#### **1.1.4. *Zymomonas mobilis*.**

*Zymomonas mobilis* es un bacilo corto, gram negativo, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud y 1 a 1,5  $\mu\text{m}$  de ancho, comúnmente se encuentran en pares, pero en ocasiones solos. La mayoría de las especies (70 % de las especies conocidas) no son móviles, el resto (30 %) es móvil y tienen de 1 a 4 flagelos (Swings & De Ley, 1977).

En 1977, Swings & De Ley, demostraron el efecto del pH (Tabla 2) y la temperatura (Tabla 3) sobre el crecimiento de varias especies de *Zymomonas*.

**Tabla 2. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Zymomonas* en medio líquido.**

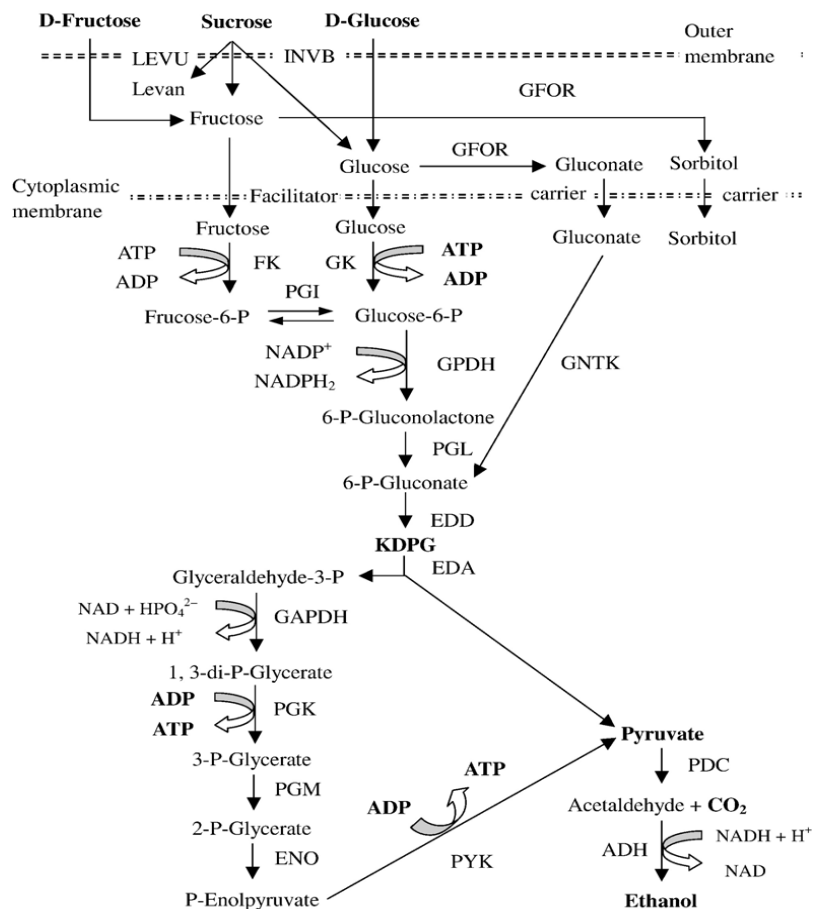
pH inicial	% de crecimiento
3,05	0
3,5	43
3,7	71
3,85	90
5-7	100
7,5	87
8,0	0

**Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Zymomonas* en medio líquido.**

Temperatura de incubación (°C)	% de crecimiento
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

En 1993 Doelle *et al.*, observaron que *Zymomonas mobilis* es un organismo obligatoriamente fermentativo y utiliza sacarosa, glucosa y fructosa por medio de la ruta de Entner-Doudoroff (ED, Figura 7); aunque puede llegar a crecer bien bajo condiciones aeróbicas. Estos autores observaron fenómenos que requieren investigación más profunda como:

Que ocurre en el exterior de la célula y en la hidrólisis de sacarosa, el uso de la glucosa en el interior de la célula, cuales son los procesos termodinámicos del metabolismo, cuál es el papel del CO<sub>2</sub>, y el etanol en la inhibición y cuál de estos puede tener mayor efecto de inhibición. Si este último fuera el caso se debe de proteger la membrana celular por vía de la inmovilización y así tener mayores rendimientos de etanol.



**Figura 7. Ruta metabólica de fermentación de etanol (ED) en *Zymomonas mobilis*.**

**Abreviaciones:** LEVU: levansucrosa, INVB: invertasa, GFOR: glucosa-fructosa oxidoreductasa, FK: fructoquinasa, GK: glucoquinasa, GPDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, PGL: fosfogluconolactonasa, EDD: 6-fosfogluconato dihidratasa, KDPG: 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato, EDA: 2-ceto-3-deoxi-gluconato aldolasa, GNTK: gluconato quinasa, ver Figura 5 para PGI, GAPDH, PGK, PGM, ENO, PYK, PDC y ADH

(Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).



También Doelle *et al.*, califican a *Z. mobilis* como una alternativa industrial para la fermentación de jarabes de azúcar de caña, pero éste debe ser adicionado con pequeñas cantidades de sulfato de magnesio y fosfato de di-amonio; la sacarosa es hidrolizada en glucosa y fructosa extracelularmente, los monómeros son acarreados al interior por un sistema de transporte difusivo y simultáneamente catabolizados por la ruta metabólica de ED.

Además, Doelle *et al.*, mencionaron que se han desarrollado técnicas de inmovilización que han revolucionado el uso de microorganismos para tratamiento de residuos y en la producción industrial de químicos, fármacos, alimentos, y otros productos. Estos sistemas inmovilizados son particularmente usados en sistemas continuos; su aplicación resulta en un mejor control del proceso, reducción en costos de operación, menor tiempo de fermentación, disminución en la fase lag (adaptación) y mayor uniformidad en el producto.

Las ventajas antes mencionadas son económicamente importantes, debido a que el biocatalizador puede ser reutilizado y se reduce el tamaño de operación, y por consecuencia se tiene una disminución de desperdicios en el efluente. Sin embargo, para cumplir el propósito, los autores recomiendan, que el soporte debe ser inerte a la acción del etanol, que resista condiciones de pH ácido y que sea económico. Por todas las características mencionadas, los autores mencionan que *Z. mobilis* puede ser bien inmovilizada por oclusión en gel de alginato y carragenina.

Aunque también mencionaron que puede llevarse a cabo una co- inmovilización con otros microorganismos o enzimas, con lo que se podrían aumentar las opciones en la producción de alcohol a nivel industrial.

#### **1.1.5. *Saccharomyces cerevisiae.***

*Saccharomyces cerevisiae* ha sido estudiada ampliamente por investigadores para la fermentación de etanol, debido al gran conocimiento que se tienen de sus rutas metabólicas, siendo la más estudiada en la producción de etanol, la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) (Figura 6), en la cual se metaboliza una molécula de glucosa es metabolizada y dos moléculas de piruvato son producidas.

Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es reducido a etanol y es liberado  $\text{CO}_2$ . Se ha reportado que los rendimientos de etanol para *S. cerevisiae* son alrededor del 90- 93 % (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

#### **1.1.6. Sustratos para producción de etanol.**

Cualquier materia prima con un alto contenido de azúcar, o de ingredientes que se convierten en azúcar como el almidón o la celulosa, se puede usar para producir etanol. El etanol actualmente disponible en el mercado de biocombustibles se produce a partir de azúcar o de almidón. Los cultivos de azúcar comúnmente usados como materia prima son la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el sorgo azucarado. Entre las féculas que se usan comúnmente como materia prima se encuentran el maíz, el trigo y la yuca (FAO, 2008). El etanol es comúnmente producido a gran escala por la fermentación de azúcares extraídos o preparados de granos, seguida por la separación del etanol por destilación (Wheals, Basso, Alves, & Amorim, 1999). En Brasil y otros países tropicales que actualmente producen etanol, la materia prima más ampliamente usada con ese fin es la caña de azúcar. En los países de la OCDE la mayor parte del etanol se produce a partir del componente feculento de los cereales (FAO, 2008).

Para poder aumentar la producción de etanol se requieren sustratos de bajo costo (Kosaric, Vardar-Sukan, & Pieper, 2001). Debido a ello, la tendencia actual es usar fuentes no convencionales, entre las que se encuentran los almidones de tubérculos como la papa, la yuca o el makal, los cuales presentan diversas características fisicoquímicas, estructurales y funcionales, que brindan una amplia gama de aplicaciones industriales.

Estructuralmente, el almidón consiste de dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal (no soluble en agua) de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4), en el cual algunos enlaces  $\alpha$  (1-6) pueden estar presentes alrededor de cada 180-320 unidades (Fennema, 2000). La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4) y con uniones  $\alpha$  (1-6), dichas ramificaciones localizadas aproximadamente a cada 15-25 unidades de glucosa (Hernández Medina, Torruco-Uco, Chel Guerrero, & Betancur Ancona, 2008).

### 1.1.6.1. Yuca.

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, la cual está constituida por unas 7 200 especies que se caracterizan por el desarrollo de vasos laticíferos compuestos por células secretoras o galactocitos que producen una secreción lechosa.

El nombre científico de la yuca fue dado originalmente por Crantz en 1766. Posteriormente, fue reclasificada por Pohl en 1827 y Pax en 1910 en dos especies diferentes: yuca amarga *Manihot utilissima* y yuca dulce *M. aipi*. Sin embargo, Ciferri en 1938 reconoce el trabajo de Crantz en el que se propone el nombre utilizado actualmente.

La yuca recibe diferentes nombres comunes: *yuca* en el norte de América del Sur, América Central y las Antillas, *mandioca* en Argentina, Brasil y Paraguay, *cassava* en países anglo parlantes, *guacamote* en México, *aipi* y *macacheira* en Brasil y *mhogo* en swahili en los países de África oriental.

Se han descrito alrededor de 98 especies del género *Manihot*, de las cuales sólo la yuca tiene relevancia económica y es cultivada (Aristizábal & Sánchez, 2007).

En el 2008, Hernández *et al.*, realizaron la evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de almidones de tubérculos: yuca (*Manihot esculenta* Crantz), makal (*Xanthosoma yucatanensis*), camote (*Ipomea batata*) y sagú (*Marantha arundinacea*). En este estudio se observó que el makal, camote y yuca tienen contenidos bajos de proteína cruda (0,16, 0,22 y 0,06 % respectivamente), disminuyéndose las reacciones de Maillard que se pueden presentar durante algunos procesos de producción, como la producción de jarabes con alto contenido de glucosa.

Por otra parte, los contenidos de amilosa de los almidones de makal, camote, yuca y sagú fueron de 23,6, 19,6, 17,0 y 22,7 %, respectivamente, resultando menores que el contenido que tiene el maíz. Los contenidos de amilopectina de los almidones de makal y sagu (76,4 y 77,3 %, respectivamente) fueron menores a los encontrados en los almidones de camote y yuca (80,4 y 83,0%, respectivamente). Los autores concluyeron diciendo que los almidones de los tubérculos evaluados mostraron diversas propiedades fisicoquímicas y funcionales que los hacen factibles para su utilización en diversas aplicaciones industriales.

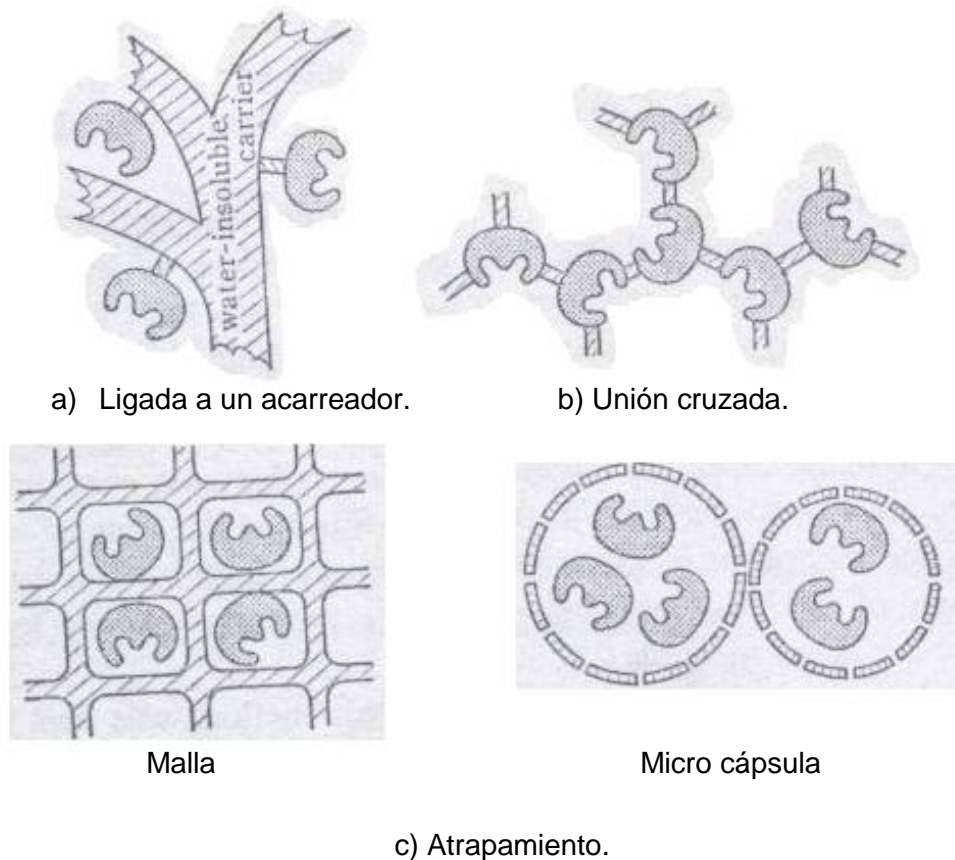
### 1.1.7. Inmovilización celular.

La inmovilización se puede definir como el confinamiento físico de las células microbianas en una región definida del espacio con una retención de su actividad catalítica, y que puede ser utilizada repetidamente o en continuo (Chibata, 1978).

La tecnología de la inmovilización celular disminuye la mayoría de los problemas que plantea la fermentación utilizando células libres. Este sistema tiene la ventaja de poder manipular la concentración celular, previa al inicio de la fermentación, además, facilita la operación del proceso de fermentación continua, evitando los pasos de eliminación de células al concluir la fermentación. Por otro lado, las células tienen ciertas ventajas como la estabilización de las funciones biológicas ya que permite la intensificación del proceso.

En 1978, Chibata propuso tres métodos generales para inmovilizar células microbianas (Figura 8), estos son:

- ❖ Ligada a un acarreador (carrier-binding), este método se basa en la unión de las células microbianas directamente en acarreadores insolubles en agua.
- ❖ Unión cruzada (cross-linking), basada en la unión de las células microbianas con reactivos bifuncionales o multifuncionales por enlaces químicos, y
- ❖ Atrapamiento (entrapping).



**Figura 8. Métodos de inmovilización celular.**

**(Chibata, 1978).**

El método por atrapamiento, es uno de los más usados en los últimos años para la inmovilización celular y se basa en el confinamiento de las células en una malla formada por una matriz polimérica o una micro cápsula formada por una membrana semipermeable. El método antes mencionado, difiere del método de unión cruzada en que la célula en sí, no se une con la matriz o la membrana (Chibata, 1978).

### **1.1.8. Producción de etanol con células inmovilizadas.**

En 1982 McGhee *et al.*, encontraron que la inmovilización de células de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*) y bacterias (*Zymomonas mobilis*) tiene un efecto positivo en la conversión continua de glucosa a etanol (más del 90 %) por un periodo de 2 semanas y 1 semana, respectivamente y mencionan que recientemente se ha incrementado el interés por la producción continua de etanol a nivel industrial con células inmovilizadas.

La investigación se llevó a cabo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* y *Zymomonas mobilis* mantenidas en medio líquido con extracto de levadura, extracto de malta y glucosa (YMG). La inmovilización se realizó con 1 g de alginato de sodio con 18 g (peso seco) de biomasa, la mezcla fue extruida en una solución estéril de cloruro de calcio 0.09M, con 1, 3, 5, 10 o 20 % de glucosa y 15 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Los resultados obtenidos en el reactor de columna demostraron que *S. cerevisiae* (NRRL Y-2034), mantuvo altos rendimientos de etanol por 5 días. Comparada con todos los microorganismos probados, fue la mejor productora de etanol con 4.7-4.9 g/100 g de solución en 72 h, disminuyendo después del día 14. Para el caso de *S. uvarum* (NRRL Y-1347), el rendimiento de etanol fue de 4 g/100 g de solución en 2 días, con una disminución después de 7 días. En cuanto a *Z. mobilis* (NRRL B-806), produjo 4.7 g de etanol/100 g de solución y disminuyó después de 10 días.

En otro experimento, en el cual las esferas fueron empacadas y distribuidas homogéneamente en el reactor por medio de una torre de discos múltiples, *S. cerevisiae* produjo 5 g de etanol/100 g de solución, el cual representó el 100 % del rendimiento teórico, y continuó con este rendimiento por 9 días. Para el caso de *S. uvarum* mantuvo una producción de etanol de 4.5 g/100 g de solución por 8 días. En cuanto a *Z. mobilis* no mostró un cambio significativo en la producción de etanol comparada con la columna empacada.

Más tarde en 1985 Bajpai *et al.*, encontraron que las células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* pueden rápidamente y eficientemente fermentar altas concentraciones de glucosa y producir una concentración máxima de etanol de 12.6% (w/v).

La investigación se llevó a cabo utilizando *Zymomonas mobilis* mantenida en medio rico (RM) enriquecido con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 1 g/L y con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0.5 g/L, con diferentes concentraciones de glucosa, entre 51 a 297 g/L.

Los resultados obtenidos demostraron que la concentración máxima de etanol en la fermentación aumentó continuamente de 24.3 a 126.3 g/L con el incremento de la concentración de sustrato de 51 a 297 g/L. Estos autores también demostraron que la concentración de inhibición sobre la producción de etanol fue de aproximadamente 140 g/L de etanol.

También analizaron las células que son liberadas en el medio durante todo el experimento las cuales incrementaron de 0.2 a 0.33 g/L conforme se fue incrementando la concentración de glucosa de 51 a 297 g/L, con esto demostraron que las esferas de alginato de calcio eran muy estables para llevar a cabo la inmovilización.

#### **1.1.9. Producción de etanol con células co-inmovilizadas.**

Por co-inmovilización se puede entender como el confinamiento físico de dos o más especies de células microbianas o partes de ellas (enzimas) en una región definida del espacio con una retención de su actividad catalítica, y que pueden ser utilizada repetidamente o en continuo.

En 1985 Tanaka *et al.*, mostraron que la aplicación de dos etapas en el proceso de fermentación, el cual estaba compuesto de un sistema aeróbico y uno anaeróbico era más efectivo. La investigación se llevó a cabo usando *Aspergillus awamori* cultivada en agar papa dextrosa (PDA) a 30 °C por 5 días y *Zymomonas mobilis* fue mantenida en medio líquido (pH 6.8) con 1 % de glucosa, 0.5 % de extracto de levadura y 0.2 % de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. La inmovilización de las esporas de *A. awamori*, las células de *Z. mobilis* y la co-inmovilización se llevó a cabo en condiciones estériles usando alginato de sodio al 3 %.

Los resultados usando *A. awamori* inmovilizada, mostraron que la hidrólisis inició después de 12 h y se completó a las 48 h. Sin embargo, la glucosa fue consumida y llegó a cero a las 72 h. Por otra parte, para la producción de etanol a partir de glucosa con *Z. mobilis*, la glucosa fue consumida de manera lineal y el etanol de la misma manera fue producido, obteniéndose una concentración final de 8 g/L.

En el caso de la co-inmovilización, la cual se llevó a cabo en un sistema aerobio, los autores observaron que el crecimiento del micelio se desarrolló en la superficie del soporte mientras que en la bacteria se desarrolló en el interior del soporte, donde el oxígeno es deficiente.

Los autores probaron tres sistemas de fermentación con 5, 20 y 40 mg de células y con un número constante de esporas ( $5 \times 10^7$ ). Obteniendo como resultado que con 20 mg de células se obtenía una concentración de 6.7 g/L de etanol. Posteriormente se probaron altas concentraciones de almidón (2, 10 y 20%) en cultivo mixto co-inmovilizado, usando el sistema óptimo encontrado con anterioridad (20 mg de células / $5 \times 10^7$  esporas). Los

resultados obtenidos en la producción de etanol son de 7.2 g/L en 12h, 22 g/L en 36h y 34 g/L en 84 h respectivamente.

Por último, los autores concluyeron que el sistema utilizado tiene dos ventajas: la primera es que los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos, espontáneamente, muestran segregación del hábitat, en la superficie y en el centro de las esferas de gel, respectivamente, y la segunda es que las condiciones anaeróbicas en la parte central del soporte, pueden acelerar la producción de etanol.

En 2001, Amutha & Gunasekaran implementaron el uso de un sistema de co- inmovilización, para aumentar la productividad de etanol con células y enzima. Indicando que el uso de sistemas celulares co- inmovilizados es altamente deseable para aumentar la productividad de etanol en comparación con células libres y células inmovilizadas por separado de la enzima.

La investigación se llevó a cabo utilizando *Zymomonas mobilis* mantenida en medio rico (RM) con glucosa en concentración de 20 g/L y pH 6; también se trabajó con *Saccharomyces diastaticus* mantenida en medio con extracto de malta, extracto de levadura, glucosa y peptona de caseína (MYGP) con concentraciones de glucosa de 20 g/L; para la inmovilización celular ambos microorganismos fueron crecidos a 30 °C en condiciones aeróbicas en la fase exponencial.

El medio de fermentación de harina preparada con agua destilada se hidrolizó con alfa-amilasa a 75 °C de 1-1.5 h con agitación. La inmovilización se llevó a cabo con alginato de sodio 3.5 % (w/v).

Los resultados obtenidos demostraron que el uso de la co-inmovilización de células de *Z. mobilis* y *S. diastaticus* produjo altos rendimientos de etanol comparados con la inmovilización celular de levaduras. Los autores también mostraron que las fermentaciones en lote repetidas, representan una gran ventaja para aumentar la productividad de etanol, comparándola en cada lote realizado, mencionaron también que en el final de la primera fermentación se obtuvo una concentración de etanol de 43.7 g/L y al final de la quinta fermentación la concentración alcanzó su máximo de 53.5 g/L.

Usando la co- inmovilización se redujeron los tiempos de fermentación de 42 h en el primer lote a 17 h en el quinto.



También realizaron fermentaciones en continuo en un reactor de lecho empacado a diferentes flujos, resultando que a un flujo de 3.9 mL/h la concentración de etanol fue de 62.2 g/L y que a un flujo de 10.1 mL/h la concentración de etanol fue de 54 g/L. Los autores mencionaron que los resultados obtenidos sugieren que la co- inmovilización celular de *Z. mobilis* y *S. diastaticus* puede ser eficientemente utilizada para la fermentación de almidón hidrolizado.

En 2008, Patle & Lal, mencionan que la producción de etanol por medios biotecnológicos está adquiriendo un valor considerable. En este contexto, los autores mencionaron que el etanol obtenido de productos agrícolas renovables y baratos proporcionará la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero, por lo que consideran el almidón de yuca como una fuente barata, abundante y renovable para la producción de etanol.

La investigación se llevó a cabo utilizando *Zymomonas mobilis* mantenida en un medio con 10 % de glucosa y pH de 6.0 y también se utilizó con *Candida tropicalis* aislada de la miel cruda.

La hidrólisis del sustrato se llevó a cabo con una solución de HCl al 10 % a una temperatura de 100 °C por 3 h, y se determinaron los azúcares reductores totales por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico.

Los autores utilizaron dos procesos de pre-tratamiento del sustrato: la hidrólisis ácida y la enzimática. Para el tratamiento ácido probaron diferentes concentraciones de ácido sulfúrico que van desde 0.25 % hasta 4 % v/v, incubados a una temperatura de 37 y 55 °C; para el tratamiento enzimático se utilizaron diferentes concentraciones de enzima que van desde 5 Uenzima/gsustrato hasta 20 Uenzima/gsustrato y además se usaron diferentes combinaciones de sustrato y enzimas que fueron incubadas a 55 °C por 3 h.

Los resultados obtenidos de la hidrólisis ácida demostraron que la mayor cantidad de azúcares reductores se obtuvo a una concentración de ácido de 0.75 %, la cual fue utilizada para posteriores estudios. En el caso de la hidrólisis enzimática la mayor producción de azúcares reductores se obtuvo con la mezcla de amilasa + pectinasa.

En el caso de la fermentación en biorreactor de 1 L, con cultivo mixto obtuvieron un rendimiento de 254.45 g etanol /L, para el caso de *Z. mobilis* el rendimiento fue de 228.55 g etanol/L y por último el rendimiento con *C. tropicalis* fue de 214.2 g etanol/L. Sin embargo,

en el caso de la fermentación en biorreactor de 10 L, usando el cultivo mixto, el rendimiento de etanol fue de 219.63 g etanol/L.

## 1.2. Objetivos.

### 1.2.1. Generales.

Evaluar la producción de etanol en cultivo sumergido con células libres e inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.2.2. Específicos.

- ❖ Evaluar la producción de azúcares fermentables de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), makal (*Xanthosoma yucatanensis*) y yuca (*Yucca schidigera*), obtenidos por hidrólisis ácida y enzimática.
- ❖ Caracterizar cinéticamente la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* y con *Saccharomyces cerevisiae* libres.
- ❖ Producir etanol en cultivo sumergido mixto con *Zymomonas mobilis* y con *Saccharomyces cerevisiae* libres.
- ❖ Producir etanol en cultivo sumergido mixto con *Zymomonas mobilis* y con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas.

### 1.3. Justificación.

Hace 25 años la producción de bioetanol sólo se realizaba en USA, Canadá y Brasil con materias primas como el maíz y la caña de azúcar, respectivamente. En años recientes y gracias a la biotecnología, se pueden aplicar mejoras en la producción de bioetanol, mediante el uso de nuevas materias primas para la producción de biomasa y el aumento en la eficiencia de su conversión.

El principal motivo para llevar a cabo la producción de bioetanol es evitar o disminuir cada vez más la dependencia al petróleo. Además, el bioetanol puede mezclarse con gasolina o quemarse puro en motores de encendido por chispa ligeramente modificados. En comparación con la gasolina, el bioetanol contiene solo una cantidad ínfima de azufre, Por tanto, la mezcla bioetanol-gasolina ayuda a reducir el contenido de azufre del combustible, disminuyendo con esto las emisiones de óxido de azufre, componente de la lluvia ácida (FAO, 2008). Pero todo esto solo podría lograrse si se reducen los costos en la producción del bioetanol utilizando sustratos fácilmente convertibles a etanol.

Por estos motivos surge la necesidad de desarrollar alternativas para la producción de bioetanol, la cual en principio, puede ser la utilización de sustratos de bajo valor y de fácil conversión, para la producción de bioetanol, el cual es considerado en estos días un producto de alto valor agregado.

Para poder llevar a cabo la producción de etanol se experimentará con cultivos mixtos, en cultivo sumergido con células libres e inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio, usando hidrolizados de yuca como fuente carbono.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1. Sustratos.

Se utilizaron como sustratos yuca (*Manihot esculenta* Crantz), makal (*Xanthosoma yucatanensis*) y diferentes muestras (polvo, corteza y bagazo) de yuca (*Yucca schidigera*), para la obtención de glucosa y maltosa, los cuales fácilmente son fermentables.

#### 2.1.1. Preparación de la harina.

Se preparó harina de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), makal (*Xanthosoma yucatanensis*) y yuca (*Yucca schidigera*), para posteriormente ser usados en los tratamientos de hidrólisis.

Los tubérculos se lavaron, pelaron y rebanaron en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de grosor. Se secaron en un horno a 40 °C durante 48 h. Después, los tubérculos fueron pulverizados en un homogenizador y tamizados a un diámetro de partícula de 100 µm. La harina se envaso en un recipiente de plástico a -37 °C hasta su uso (Alarcón Elias, 2010).

### 2.2. Hidrólisis.

Debido a la composición de los sustratos, deben ser sometidos a tratamientos de hidrólisis enzimática y ácida, para la obtención de azúcares que sean fácilmente fermentables, como la glucosa y maltosa.

#### 2.2.1. Hidrólisis ácida.

El procedimiento para llevar a cabo la hidrólisis ácida de los diferentes sustratos fue la siguiente (Alarcón Elias, 2010):

1. Preparar una solución al 5% de ácido sulfúrico.
2. Calentar en baño maría a 97 °C aproximadamente 10 mL de solución de ácido sulfúrico por 10 min.
3. Pesar la muestra de harina para preparar una solución al 10 %.
4. Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento del ácido, agregar la muestra previamente pesada, y dejar reaccionar por 5 h, con agitación constante.
5. Transcurrido el tiempo de reacción, el hidrolizado se enfría súbitamente y es centrifugado a 6,000 rpm por 15 min.

6. Ajustar el pH del sobrenadante a 6.8, con NaOH 2 M.
7. Vaciar en botellas y esterilizar a 121 °C, 15 psi por 15 min.
8. Determinar la concentración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS).

### 2.2.2. Hidrólisis enzimática.

A diferencia de la mayoría de los ensayos relacionados con la hidrólisis enzimática, donde las reacciones de licuefacción y sacarificación se realizan por separado; en este proyecto se realizó la reacción al mismo tiempo (Alarcón Elias, 2010). El procedimiento para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y makal, fue el siguiente:

1. Preparar una solución al 10 % de harina de yuca con regulador de citratos pH 4.08, y calentar a 73 °C.
2. Pesar 0.0634 g de cloruro de magnesio y 0.0906 g de sulfato de calcio, y agregar a la solución de harina.
3. Pesar 0.638 g de alfa-amilasa y disolverla en 5mL de regulador (obtener solución final a 3 U/mg muestra).
4. Tomar 0.83 mL de amiloglucosidasa (obtener solución final a 0.025 U/mg muestra).
5. Una vez que la solución de harina alcanza la temperatura de 73 °C, se le agrega el alfa-amilasa y la amiloglucosidasa al mismo tiempo.
6. Se deja reaccionando por 24 h, tapada para evitar evaporación.
7. Transcurrido el tiempo, el hidrolizado es centrifugado a 6,000 rpm por 15 min.
8. Vaciar el sobrenadante en botellas y se esteriliza a 121 °C, 15 psi por 15 min.
9. Determinar la concentración de azúcares reductores por el método de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS).

Preparación del regulador de citratos:

1. Preparar una solución 0.1 M de ácido cítrico (21.01 g en 1,000 mL).
2. Preparar una solución 0.1 M de citrato de sodio (29.41 g en 1,000 mL).
3. Tomar 33 mL de la solución de ácido cítrico y 17 mL de la solución de citrato de sodio, y mezclar. Aforar a 100 mL y medir el pH.

### 2.3. Microorganismos y medio de cultivo.

Se utilizaron dos microorganismos, *Zymomonas mobilis* (NRRL 14234) y *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL 6673), para las que se usaron el medio YP (Yeast-Peptone) (Kondorosi, Sváb, Solymosy, & Fedorcsák, 1972) y YM (Yeast-Malt) (Atlas, 2004), respectivamente, para su reactivación y mantenimiento; y el medio RM (Atlas, 2004) se uso para la producción de etanol de ambas cepas.

#### 2.3.1. Mantenimiento.

Para el caso del mantenimiento de las cepas, como se dijo anteriormente, se utilizaron los medios YP para *Z. mobilis* y YM para *S. cerevisiae*, de los cuales a continuación se describe su composición por litro y modo de preparación:

**Tabla 4. Composición de los medios de cultivo para el mantenimiento.**

Medio YP		Medio YM	
<b>Extracto de levadura</b>	3.0 g	<b>Glucosa</b>	10.0 g
<b>Peptona de caseína</b>	10.0 g	<b>Peptona de caseína</b>	5.0 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2.0 g	<b>Extracto de levadura</b>	3.0 g
<b>NaCl</b>	3.0 g	<b>Extracto de malta</b>	3.0 g
<b>Agar</b>	20.0 g	<b>Agar</b>	20.0 g
<b>pH 6.0 ± 0.2 a 25 °C</b>		<b>pH 6.2 ± 0.2 a 25 °C</b>	

La preparación se llevó a cabo como sigue:

1. Agregar los componentes previamente pesados al agua destilada/des-ionizada y aforar el volumen a 1.0 L.
2. Calentar y mezclar hasta disolver todos los componentes y distribuir en tubos o frascos.
3. Esterilizar en autoclave por 15 min a 15 psi de presión y 121 °C.

### 2.3.2. Producción de etanol.

El medio RM, es el que se tomó como referencia para la formulación del medio de producción para *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, en el cual la concentración de glucosa fue sustituida por el hidrolizado de harina de yuca en la misma concentración.

**Tabla 5. Composición del medio de cultivo para la producción de etanol.**

Medio RM	
Glucosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
pH 6.0 ± 0.2 a 25 °C	

La preparación se lleva a cabo como sigue:

1. Agregar los componentes previamente pesados al agua destilada/des ionizada y aforar el volumen a 1.0 L.
2. Calentar y mezclar hasta disolver todos los componentes y distribuir en frascos y tubos.
3. Esterilizar en autoclave por 15 min a 15 psi de presión y 121 °C.

### 2.4. Estimación de la concentración de biomasa libre por peso seco.

Uno de los métodos para determinar la concentración de biomasa que se tiene durante una fermentación, y además uno de los más sencillos es el método de peso seco, en el cual fue obtenida la biomasa por centrifugación y posteriormente fue secada en charolas de aluminio; a continuación se describen sus pasos (Durán Páramo & Muñoz Aguilar, 2003):

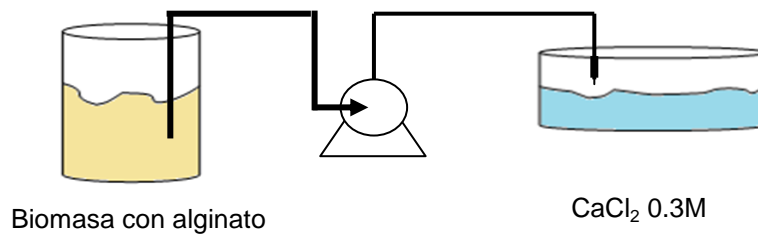


1. Poner 10 mL de muestra (caldo de fermentación) en un tubo Falcon de 15 mL de volumen y centrifugar a 6 000 rpm durante 15 minutos.
2. Decantar el sobrenadante y mezclar la biomasa precipitada en el tubo Falcon con 5 mL de solución salina (solución estéril de cloruro de sodio al 0.9 %).
3. Homogenizar utilizando el vórtex.
4. Centrifugar a 6 000 rpm durante 15 min.
5. Decantar el sobrenadante y mezclar la biomasa precipitada en el tubo Falcon con 1mL de solución salina.
6. Verter la suspensión celular en una charola de aluminio de peso conocido.
7. Meter la charola conteniendo la suspensión celular dentro del horno a 80 °C durante 24 h o hasta tener peso constante.
8. Determinar el peso de la biomasa seca por diferencia de pesos. El peso de la muestra seca y de la charola, menos el peso de la charola sola, resulta en el peso seco de la biomasa contenida en los 10 mL de muestra.
9. Reportar la concentración de biomasa en: g de biomasa libre seca/ L de caldo de cultivo.

## **2.5. Técnica de inmovilización celular por atrapamiento.**

Como se mencionó con anterioridad, el método de inmovilización por atrapamiento es uno de los métodos más usados para el confinamiento de células, ya que no altera físicamente la célula. A continuación se describe esta técnica utilizando alginato de sodio como soporte (Durán Páramo & Muñoz Aguilar, 2003):

1. Montar el sistema de inmovilización (Figura 9).
2. Centrifugar el medio de cultivo con microorganismos a 6,000 rpm durante 30 min. a 4 °C.
3. Recuperar el precipitado (biomasa) por decantación.
4. Colocar la biomasa en un matraz con alginato de sodio al 2 % y mezclar con ayuda de un agitador magnético.
5. Colocar el capilar del sistema de inmovilización y succionar con bomba peristáltica la mezcla.
6. Gotear la suspensión a través de una aguja hacia una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.3 M en agitación, donde entrará en contacto el alginato con los iones de calcio gelificándose y formando esferas.



**Figura 9. Sistema de inmovilización celular.**

## **2.6. Estimación de la concentración de biomasa inmovilizada por peso seco.**

Como se mencionó, el método de peso seco es uno de los más sencillos para determinar la concentración de biomasa; sin embargo, en este caso tenemos que tomar en cuenta que es necesario separar la biomasa del soporte, por lo que las esferas de alginato de calcio serán solubilizadas con citrato de sodio. A continuación se describen los pasos para realizar este método (Durán Páramo & Muñoz Aguilar, 2003):

1. Tomar de forma estéril del matraz el número de esferas correspondientes a 1 mL de gel.
2. Disolver en un tubo de ensaye o un tubo Falcon, con 9 mL de la solución estéril de citrato de sodio 0.1 M a 40 °C. Agitar vigorosamente por medio de un vórtex hasta la completa disolución de las esferas.
3. Centrifugar la suspensión de biomasa liberada del soporte de inmovilización a 6 000 rpm durante 15 min.
4. Decantar el sobrenadante y mezclar la biomasa precipitada en el tubo Falcon con 1 mL de agua salina (solución estéril de cloruro de sodio al 0.9 %).
5. Homogenizar utilizando el vórtex.
6. Verter la suspensión celular en una charola de aluminio de peso conocido.
7. Meter la charola conteniendo la suspensión celular dentro del horno a 80 °C durante 24 h o hasta tener peso constante.
8. Determinar el peso de la biomasa seca por diferencia de pesos. El peso de la muestra seca y de la charola, menos el peso de la charola sola, resulta en el peso seco de la biomasa contenida en 1 mL de muestra.
9. Reportar la concentración de biomasa en: g de biomasa inmovilizada seca /L de gel.

## **2.7. Determinación de azúcares del caldo de cultivo.**

### **2.7.1. Determinación de glucosa y maltosa del caldo de fermentación por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución).**

La determinación de azúcares del medio de fermentación, nos servirá como referencia para determinar qué tan eficiente fue la fermentación, por lo que se utilizó el equipo de HPLC, para una separación por exclusión de iones. A continuación se describen los pasos:

1. Se tomaron muestras de 5 mL del caldo de fermentación, las cuales fueron centrifugadas a 6 000 rpm por 15 min para eliminar la biomasa.
2. El sobrenadante fue filtrado con una membrana millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y posteriormente utilizado directamente para la determinación de glucosa y maltosa por HPLC.

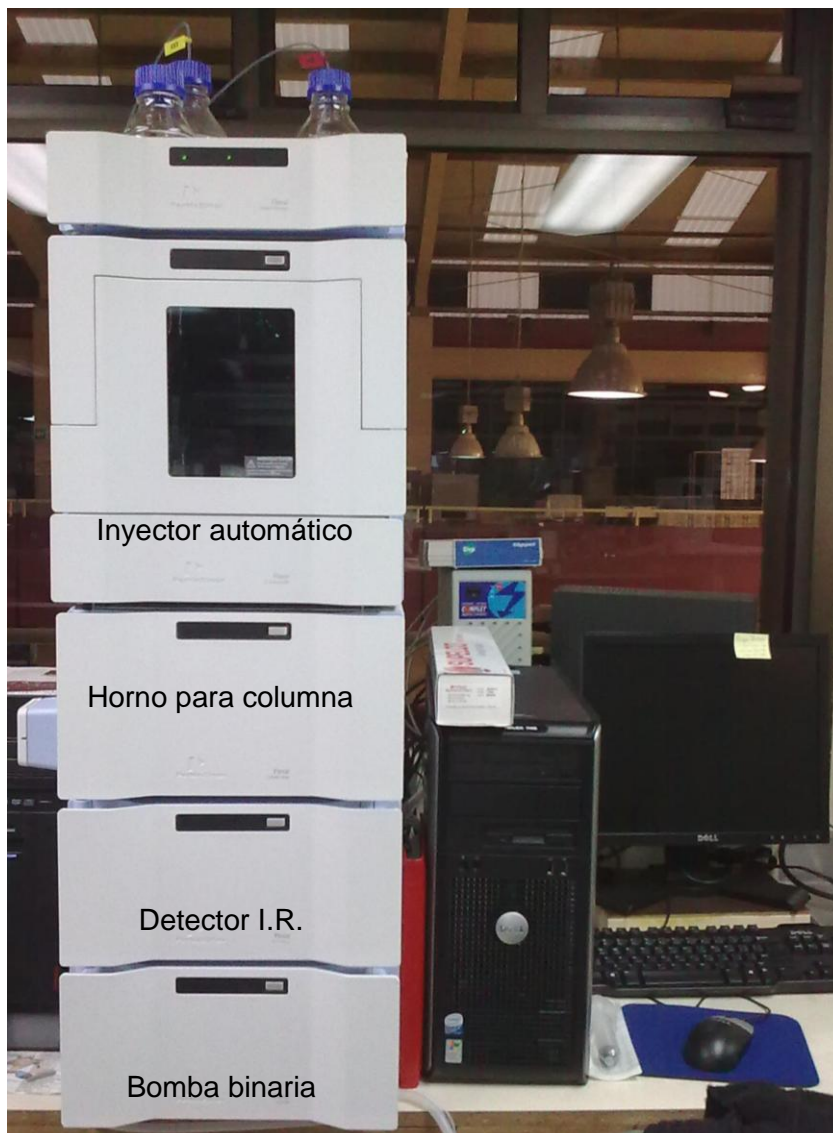
La columna utilizada fue una CC-MCa<sup>2+</sup> (30 cm X 7,8 mm) de Supelco Analytical (Bellefonte, USA). La columna contiene un co- polímero de estireno (divinilbenceno) bajo la forma de Ca<sup>2+</sup>. La técnica es muy simple debido a que el eluyente (fase móvil) es agua. La detección de las moléculas se realiza por refractometría diferencial utilizando un detector de Índice de Refracción (I.R.). Así mismo, se utilizó una pre-columna del tipo CC-OA (5 cm X 4.6 mm) de Supelco Analytical (Bellefonte, USA).

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- Eluyente: Agua MilliQ (Millipore) filtrada (0,2  $\mu\text{m}$  Millipore) y des-gasificada.
- Flujo: 0,8 mL/min (320 psi).
- Detector de I.R. a 50 °C.
- Temperatura de columna: 80 °C.

El equipo de HPLC está conformado por los siguientes módulos:

- Inyector automático de muestras Perkin Elmer (modelo Flexar).
- Bomba binaria isocrática Perkin Elmer (modelo Flexar).
- Horno para columna Perkin Elmer (modelo Flexar).
- Detector de índice de refracción Perkin Elmer (modelo Flexar).
- Estación de trabajo con Software Chromera Perkin Elmer (2009).



**Figura 10. Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

### **2.7.2. Cuantificación de azúcares reductores por el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico).**

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico identifica los grupos reductores hemiacetal. La cantidad de ácido dinitro-amino-salicílico formado es estimada colorimétricamente a 540 nm y está directamente relacionado con la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra.

El procedimiento para la determinación de la concentración de azúcares reductores fue el siguiente:

1. Mezclar en un tubo de ensaye de 10 mL de volumen 250  $\mu$ L del reactivo de DNS + 250  $\mu$ L de muestra.
2. Homogenizar la solución en el vórtex.
3. Calentar la solución en un baño de agua a temperatura de ebullición (93-100°C), durante 5 min exactamente.
4. Inmediatamente después se pone la solución en un baño de agua fría durante 5 minutos.
5. Posteriormente añadir 2.5 mL de agua destilada a la solución.
6. Se homogeniza la solución en el vórtex.
7. Se determina la absorbancia de la solución a 540nm contra un blanco (el blanco contiene 250  $\mu$ L de agua destilada + 250  $\mu$ L del reactivo DNS y es tratado de la misma manera que la muestra, a partir del punto 2).

Se elaboraron curvas patrón de azúcares reductores, la primera con glucosa y la segunda con maltosa, con concentraciones que van de 0 a 2 g/L.

1. Preparar 50 mL de una solución de glucosa 0,2 % (2 g/L) y 50 mL de una solución de maltosa 0,2 %, usando agua destilada como diluyente.
2. Preparar las diluciones presentadas en la Tabla 6 por duplicado y tratarlas según la técnica de determinación de concentración de azúcares reductores con el reactivo DNS.
3. Elaborar la curva patrón en donde se grafique en el eje de las abscisas (eje x) el promedio de la absorbancia determinada a 540 nm y en el eje de las ordenadas (eje y) el promedio de la concentración del azúcar reductor (glucosa o maltosa).
4. Determinar la ecuación de la línea recta que relaciona los dos parámetros:

$$y = mx + b$$

En donde “y” representa la absorbancia determinada a 540 nm y “x” la concentración de azúcares invertidos.

**Tabla 6. Diluciones para la curva patrón de azúcares reductores (glucosa o maltosa).**

Muestra	Concentración del azúcar reductor en la muestra (g/L)	Volumen de la solución del azúcar reductor de 2 g/L (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
Blanco	0,00	0,00	1,00
1	0,20	0,10	0,90
2	0,40	0,20	0,80
3	0,60	0,30	0,70
4	0,80	0,40	0,60
5	1,00	0,50	0,50
6	1,20	0,60	0,40
7	1,40	0,70	0,30
8	1,60	0,80	0,20
9	1,80	0,90	0,10
10	2,00	1,00	0,00

El reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico se preparó de la siguiente forma:

1. Disolver 30 g de tartrato de sodio y potasio en agua destilada.
2. Agregar 1,6 g de NaOH previamente disuelto en agua destilada.
3. Agregar 1,0 g de DNS previamente disuelto en agua destilada.
4. Aforar a 100 mL con agua destilada.
5. Guardar al abrigo de la luz y en frasco ámbar.
6. Dejar reposar 15 min.
7. Determinar la absorbancia a 540nm contra un blanco.

## **2.8. Determinación por HPLC de ácidos orgánicos y alcoholes (etanol) del caldo de fermentación.**

La determinación de etanol del medio de fermentación, sirvió como referencia para determinar qué tan eficiente es la fermentación y cuál es la concentración de etanol producido, por lo que se utilizó el equipo de HPLC. A continuación se describen los pasos:

1. Se tomaron muestras de 5 mL del caldo de fermentación, las cuales fueron centrifugadas a 6 000 rpm por 15 min para eliminar la biomasa.

2. El sobrenadante fue filtrado con una membrana millipore de  $0.22 \mu\text{m}$  y posteriormente utilizado directamente para la determinación de etanol por HPLC.

La columna utilizada fue una CC-MH<sup>+</sup> (30 cm X 7,8 mm) de Supelco Analytical (Bellefonte, USA). La columna contiene un co- polímero de estíreno (divinilbenceno) bajo la forma de H<sup>+</sup>. La técnica es muy simple debido a que el eluyente (fase móvil) fue agua. La detección de las moléculas se realiza por refractometría diferencial utilizando un detector de Índice de Refracción (I.R.). Así mismo, se utilizó una pre-columna del tipo CC-OA (5 cm X 4.6 mm) de Supelco Analytical (Bellefonte, USA).

Para la determinación de etanol fueron usados los mismos módulos y las mismas condiciones descritos en la página 30, para la determinación de glucosa y maltosa.

### **2.9. Diseño experimental y análisis de resultados.**

El diseño experimental usado fue un diseño factorial  $3^k$  (Montgomery, 2002), es decir un arreglo factorial de k factores que tuvieron tres niveles cada uno.

Para representar los niveles de cada factor se utilizaron los dígitos 0 (bajo), 1 (medio) y 2 (alto). Cada combinación de tratamientos del diseño se denotó por k dígitos, donde el primer dígito indicó el nivel del factor A y el segundo dígito indicó el nivel del factor B.

Para este estudio, tenemos como factores el pH y la temperatura, por lo que el diseño factorial usado tiene  $k=2$  factores.

En la Figura 11, se muestra la representación gráfica de las combinaciones de los tratamientos, donde el dígito 0 representó un pH de 5 y temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente; el dígito 1 representó un pH de 6.8 y temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente; por último el dígito 2 representó un pH de 8.5 y temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

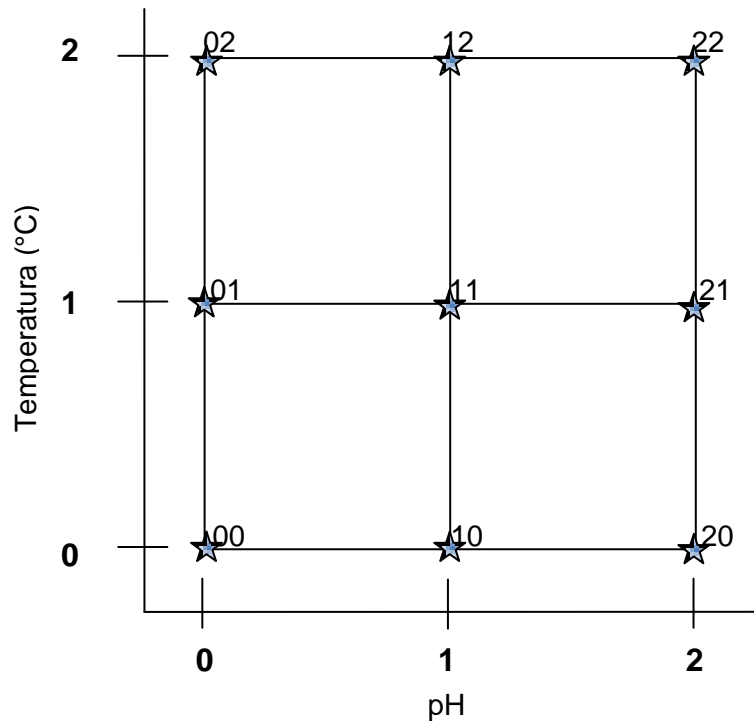


Figura 11. Representación geométrica del diseño  $3^2$ .

Para analizar los resultados obtenidos, se usó el modelo de regresión lineal múltiple, el cual es utilizado cuando se tienen más de una variable regresora (Montgomery & Runger, 2003).

Para nuestro caso las variables de estudio fueron el pH y la temperatura, con las que se podría describir la relación como:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \epsilon$$

donde:  $Y$  representa la velocidad específica de crecimiento o el rendimiento de producto con base en el sustrato.

$X_1$  representa el pH.

$X_2$  representa la Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

$\epsilon$  representa el error aleatorio.



Se trata de un modelo de regresión lineal múltiple con dos regresores o variables independientes. Se usa el término lineal porque la ecuación es una función lineal de los parámetros desconocidos  $\beta_0, \beta_1$  y  $\beta_2$ .

Para la determinación de los parámetros de la ecuación, se utilizó el método de estimación por mínimos cuadrados, para el cual, en nuestro estudio se le dio un enfoque matricial descrito por Montgomery & Runger.

Suponiendo que hay  $k$  variables independientes y  $n$  observaciones  $(x_{i1}, x_{i2}, x_{i3}, \dots, x_{ik}, y_i)$ ,  $i=1,2,\dots,n$ , y que el modelo relaciona las variables independientes, la variable de respuesta fue:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} + \varepsilon_i, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

Este modelo es un sistema de  $n$  ecuaciones que en notación matricial puede expresarse como:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

donde:

$$\mathbf{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}$$

$$\boldsymbol{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix}$$

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}$$

En general,  $\mathbf{y}$  es un vector ( $n \times 1$ ) de las observaciones,  $\mathbf{X}$  es una matriz ( $n \times p$ ) de los niveles de las variables independientes,  $\boldsymbol{\beta}$  es un vector ( $p \times 1$ ) de los coeficientes de regresión y  $\boldsymbol{\epsilon}$  es un vector ( $n \times 1$ ) de los errores aleatorios.

Para poder determinar los coeficientes de regresión, se debe encontrar el estimador de mínimos cuadrados  $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ . Después de una serie de operaciones matemáticas, la ecuación para la estimación de mínimos cuadrados de  $\boldsymbol{\beta}$  es:

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y}$$

Entonces, en notación matricial, el modelo ajustado es:

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}}$$

La diferencia entre la observación  $y_i$  y el valor ajustado  $\hat{y}_i$  es un residual. El vector ( $n \times 1$ ) de los residuales se denota por:

$$\mathbf{e} = \mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}}$$

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Hidrólisis.

Se estudio la producción de azúcares fermentables, glucosa y maltosa a partir de la hidrólisis ácida y enzimática de yuca (*Manihot esculenta Crantz*), makal (*Xanthosoma yucatanensis*) y tres diferentes muestras (polvo, bagazo y corteza) de yuca (*Yucca schidigera*) donadas por la empresa Alltech.

##### 3.1.1. Hidrólisis ácida.

Se realizaron hidrólisis con ácido sulfúrico al 5%, de las muestras antes mencionadas para la obtención de azúcares fermentables. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Hidrólisis ácida de yuca ( <i>Yucca schidigera</i> ), yuca ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> ) y makal ( <i>Xanthosoma yucatanensis</i> ).			
	Muestra	Concentración de	
		Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)
<b>Hidrólisis ácida yuca (<i>Yucca schidigera</i>) AllTech</b>	Polvo Antes de Esterilizar	38.84	61.43
	Polvo Después de Esterilizar	26.37	41.00
	Bagazo Antes de Esterilizar	21.22	32.57
	Bagazo Después de Esterilizar	18.47	28.06
	Corteza Antes de Esterilizar	16.67	24.47
	Corteza Después de Esterilizar	15.05	23.09
<b>Hidrólisis ácida</b>	Yuca Antes de Esterilizar	89.60	142.57
	Yuca Después de Esterilizar	74.98	125.63
	Makal Antes de Esterilizar	86.40	139.32
	Makal Después de Esterilizar	77.13	124.14

Como se puede observar en la tabla anterior las mayores concentraciones de azúcares se obtuvieron en los tubérculos (yuca y makal) debido a que estos dos tubérculos tienen una gran cantidad de almidón, comparados con otros tubérculos como el camote y sagú, pero menor al ser comparado con el maíz (Hernández Medina, Torruco-Uco, Chel Guerrero, & Betancur Ancona, 2008). Para el caso de las muestras de yuca (cactácea) proveniente de AllTech, las concentraciones mayores se obtuvieron en el polvo, seguida del bagazo y por último la corteza, esto puede deberse a que las muestras presentan características lignocelulosicas, además de que el polvo de yuca tiene partículas mucho más pequeñas que las otras dos muestras.

Debido a que el hidrolizado será utilizado como sustrato para fermentación, se decidió determinar la concentración de azúcares después de esterilizar, obteniendo como resultado en todos los casos, una disminución en su concentración. Esto se puede deber a que en medio ácido, cambia considerablemente el comportamiento de los glúcidos y tienen lugar las reacciones de epimerización y polimerización, incluso se ha encontrado la presencia de ácido fórmico y materiales poliméricos coloreados, con lo que se ha llegado a concluir que este comportamiento frente a los ácidos es característico de las hexosas (Soler, Guzmán, & Pérez Sánchez, 1966).

También cabe mencionar que durante las reacciones de hidrólisis ácidas de los diferentes sustratos, se observó un pardeamiento del medio. Soler *et al.* mencionan que las disoluciones acuosas de glucosa se colorean cuando se calientan durante varias horas a 100°C haciendo responsable del pardeamiento al hidroximetilfurfural formado, seguido de su polimerización a sustancias húmicas.

### **3.1.2. Hidrólisis enzimática.**

Se realizaron hidrólisis enzimáticas, usando alfa-amilasa y amiloglucosidasa en la misma reacción, de harina de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) y makal (*Xanthosoma yucatanensis*) a una concentración del 10%, para la producción de azúcares fermentables como glucosa y maltosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Hidrólisis enzimática de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y makal (*Xanthosoma yucatanensis*).

	Muestra	Concentración de	
		Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)
<b>Hidrólisis enzimática</b>	Yuca Antes de Esterilizar	51.40	82.55
	Yuca Después de Esterilizar	48.68	75.90
	Makal Antes de Esterilizar	44.90	71.91
	Makal Después de Esterilizar	39.96	67.18

Como se puede observar en la tabla anterior, la concentración de azúcares es mayor en la yuca. Esto se debe a la relación que se tiene de amilosa/amilopectina en la yuca y en el makal, la cual es de 17/83 y 23.6/76.4 respectivamente (Hernández Medina, Torruco-Uco, Chel Guerrero, & Betancur Ancona, 2008); una hidrólisis para llevarse a cabo en condiciones óptimas, debe tener una relación amilosa/amilopectina de 12/88 (Mera, Hoyos, Carrera, Forero, & Velasco, 2003), debido a que cuanto menor sea esta relación, mayor será el rompimiento de enlaces alfa 1,4 glucosídicos, obteniéndose así mayor rendimiento en la producción de glucosa (Hernández Medina, Torruco-Uco, Chel Guerrero, & Betancur Ancona, 2008).

Además, se determinó la concentración de azúcares después de esterilizar, ya que el concentrado se utilizará para la fermentación. Sin embargo, podemos observar que después de esterilizar las muestras, tiende a disminuir la concentración de azúcares; cuando las aldosas o cetosas se calientan en solución con aminos, producen una reacción conocida como reacción de Maillard, en la cual el azúcar reductor reacciona reversiblemente con la amina para producir una glucosilamina. Ésta sufre una reacción que se denomina transposición de Amadori, que resulta en el caso de la D-Glucosa en la formación de un derivado de la 1-amino-1-desoxi-D-fructosa. La reacción continúa a pH 5 o menor para dar un intermediario que sufre una deshidratación, posteriormente se pueden formar derivados del furano, para el caso de una hexosa, el 5-hidroximetil-2-furaldehído (Fennema, 2000).

Los productos del pardeamiento de Maillard, se encuentran siempre que se calientan juntos azúcares reductores y aminoácidos, proteínas y/u otros compuestos nitrogenados.

De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió utilizar el método de hidrólisis enzimática, debido a que se obtienen mayores concentraciones de azúcares fermentables (glucosa y maltosa) y que el método de hidrólisis ácida además de glucosa produce compuestos indeseables. Estos compuestos son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural, los cuales se han reportado como tóxicos para la fermentación, aun en concentraciones bajas (Patle & Lal, 2008).

### **3.2. Determinación del pH y temperatura óptimos.**

Se realizó un diseño factorial 3k para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de etanol a diferentes pH's y temperaturas de *Saccharomyces cerevisiae*, así como de *Zymomonas mobilis*.

#### **3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL-6673).**

Tomando en cuenta las condiciones óptimas reportadas en la bibliografía, se decidió llevar a cabo cinéticas de crecimiento a pH de 5, 6.8 y 8.5 y temperaturas de 30, 35 y 40°C, con una concentración inicial de azúcares de 20 g/L, para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de etanol.

La Figura 12 muestra la gráfica obtenida a 30°C y pH de 5, donde podemos observar que la concentración de biomasa fue de 6.3g/L, el consumo de sustrato no fue completo, dejando 2.08 g/L de azúcares al final de la cinética, y por otra parte podemos observar la producción de etanol, la cual fue de 7.6 g/L, en 24hrs.

La Figura 13 muestra la gráfica obtenida a 30°C y pH de 6.8, donde puede observarse que la concentración de biomasa que se obtuvo fue de 7.2 g/L, por otra parte el consumo de azúcares fue casi total, dejando únicamente una concentración de 0.05 g/L al final de la cinética, y en cuanto al etanol, la concentración obtenida fue de 6.2 g/L, en un tiempo de 24hrs.

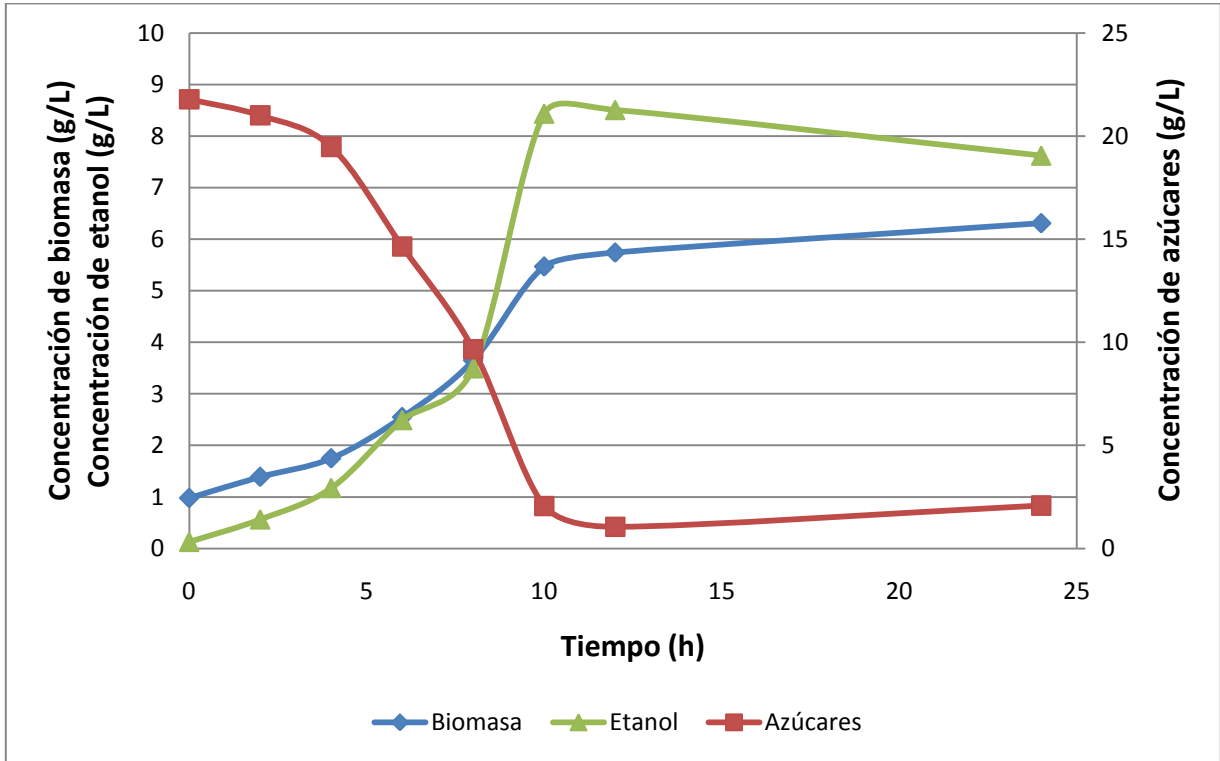


Figura 12. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 30°C y pH 5.

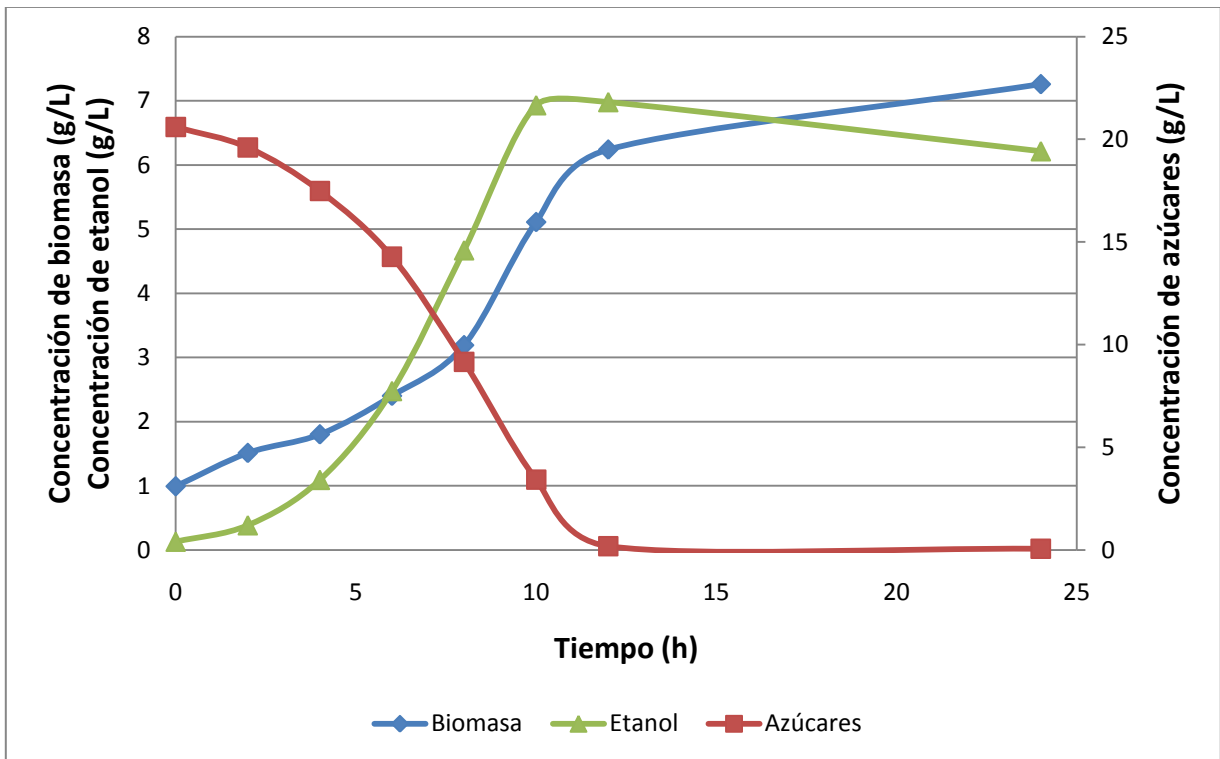
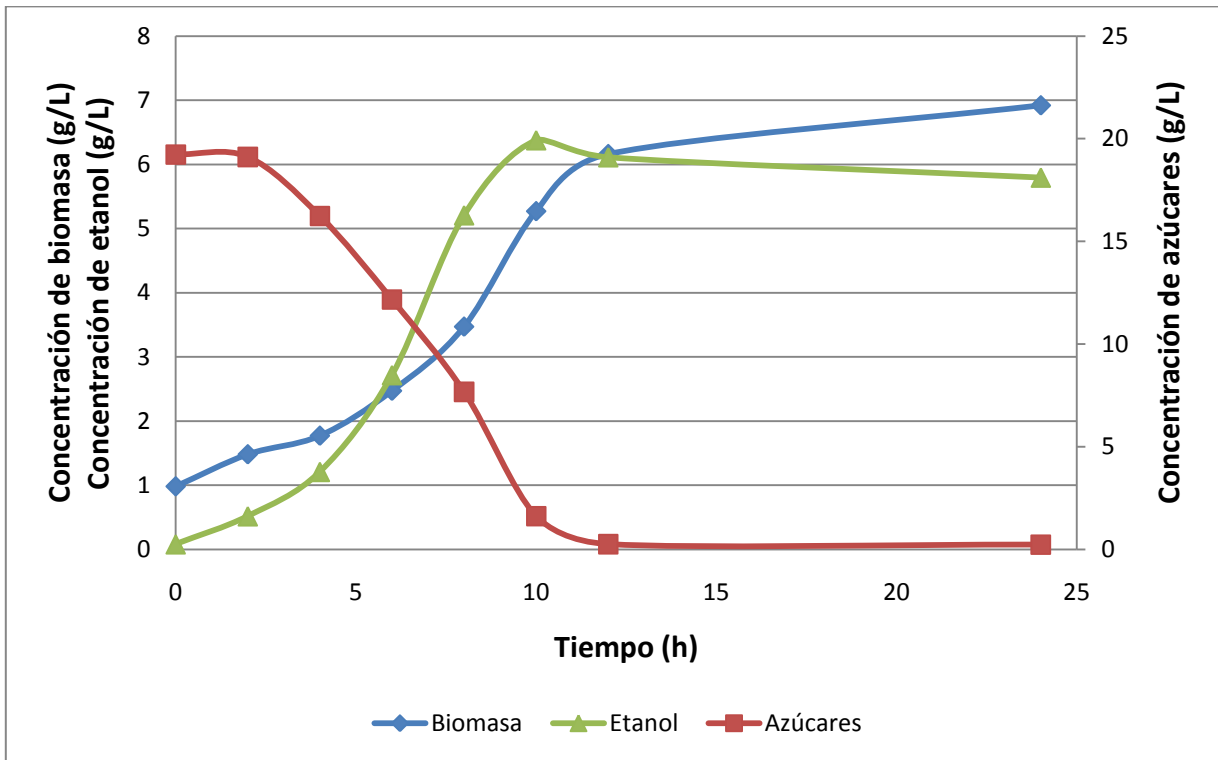


Figura 13. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 30°C y pH 6.8.

Por último, en la Figura 14 observamos la gráfica de la cinética de crecimiento a 30°C y pH de 8.5, donde podemos observar que la concentración de biomasa fue de 6.9 g/L, por otro lado observamos que el consumo de azúcares fue casi total, teniendo un remanente de 0.2 g/L al final de la cinética, y en cuanto al etanol la concentración que se obtuvo fue de 5.8 g/L, en un tiempo de 24hrs.



**Figura 14. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 30°C y pH 8.5.**

Las gráficas de las cinéticas que se realizaron a 35 y 40°C y pH's de 5, 6.8 y 8.5, se muestran en el anexo 6.1.

Una vez que se obtuvieron todas las gráficas, se linealizaron los datos de cada una de las gráficas aplicando el logaritmo natural a la concentración de biomasa (Tabla 9).



Tabla 9. Datos linealizados de las cinéticas de *S. cerevisiae* realizadas a 30°C.

Tiempo (h)	pH 5	pH 6.8	pH 8.5
0	-0.0202	-0.0101	-0.0202
2	0.3293	0.4121	0.3920
4	0.5596	0.5878	0.5710
6	0.9361	0.8755	0.9042
8	1.2947	1.1600	1.2442
10	1.6993	1.6312	1.6620
12	1.7475	1.8310	1.8181
24	1.8421	1.9824	1.9344

Posteriormente se identifican los puntos que corresponden a la fase exponencial (marcados en la tabla 8) y se graficaron (Figura 15), para la obtención de las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ).

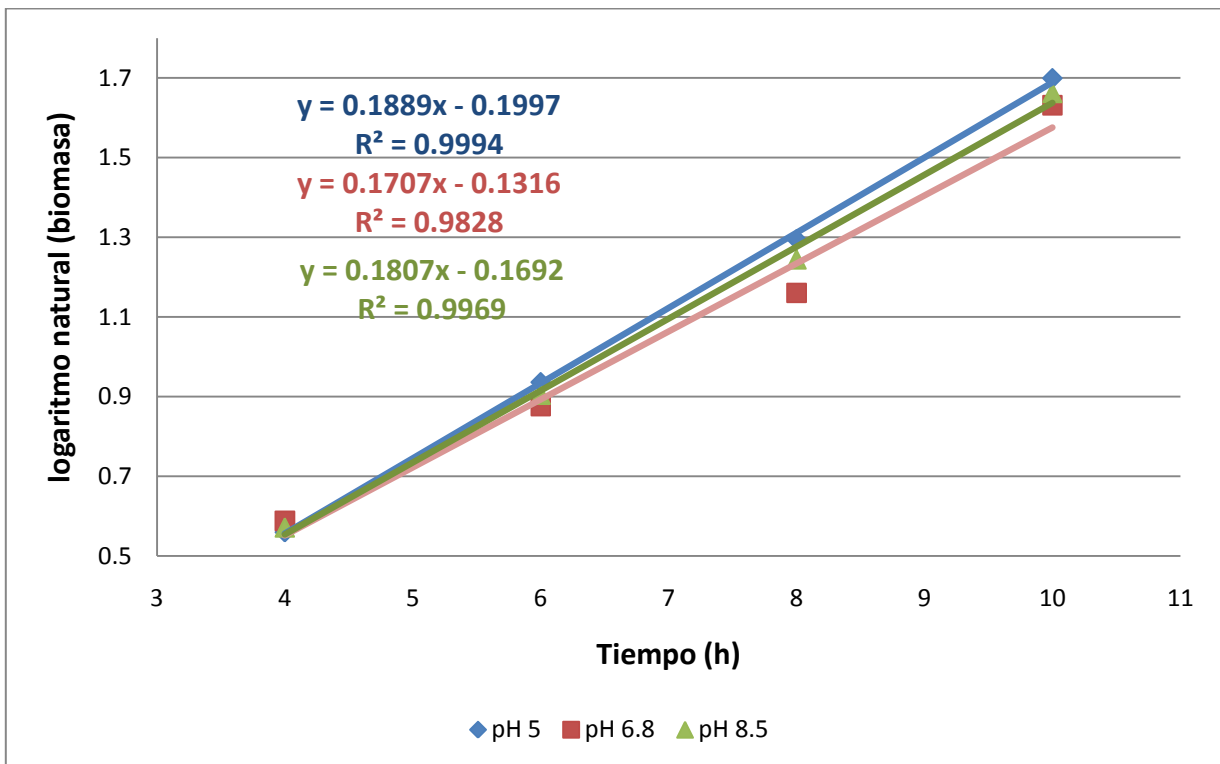


Figura 15. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de *S. cerevisiae* a 30°C.

De la ecuación de regresión, la pendiente indica las velocidades específicas de crecimiento, la Tabla 10 muestra las velocidades específicas de crecimiento obtenidas a las diferentes condiciones de pH y temperatura.

Tabla 10. Velocidades específicas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> ( $h^{-1}$ ).			
pH	Temperatura ( $^{\circ}C$ )		
	30	35	40
5	0.1889	0.2177	0.1728
6.8	0.1707	0.1677	0.1739
8.5	0.1807	0.1650	0.1956

Para poder construir la superficie de respuesta, se diseñó un programa en MATLAB (ver algoritmo en anexo 6.2), el cual permitirá determinar los coeficientes de la regresión lineal múltiple por el método matricial. A continuación se muestra la ventana de comandos, en donde se puede observar la manera en que son insertados los datos de las condiciones y de las velocidades, además se puede observar la ecuación de regresión lineal múltiple, con los coeficientes determinados por este método.

Ingrese los valores de las condiciones en forma de matriz [1 pH T]: [1 5 30;1 6.8 30;1 8.5 30;1 5 35;1 6.8 35;1 8.5 35;1 5 40;1 6.8 40;1 8.5 40]

Ingrese los valores de las velocidades en forma de matriz [v1;v2;...]: [0.1889;0.1707;0.1807;0.2177;0.1677;0.1650;0.1728;0.1739;0.1956]

La ecuación lineal es:  $y = 0.2042 - 0.003715 * pH + 6.667e-005 * T$ .

Los valores ajustados de la velocidad son:

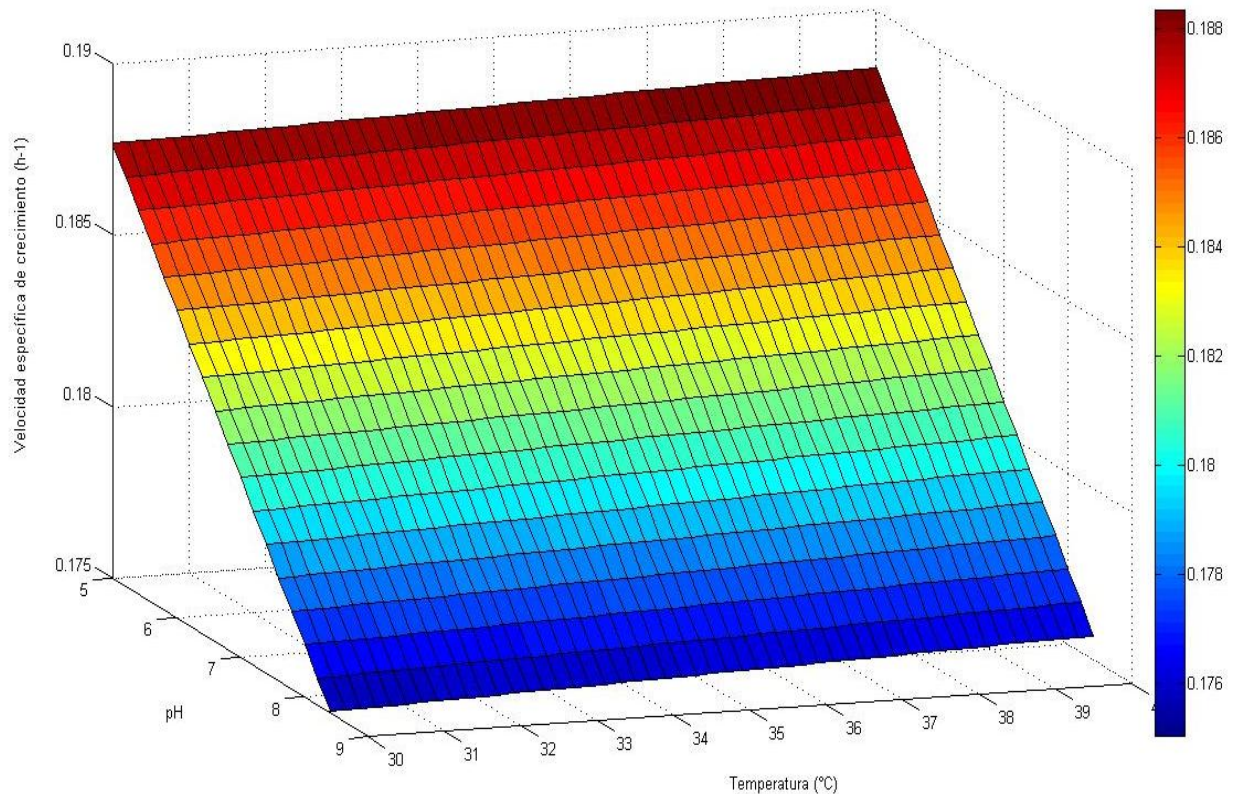
Ye = 0.1877 0.1810 0.1747 0.1880 0.1813 0.1750 0.1883 0.1817 0.1753

Ingrese los valores de pH para construir la gráfica: 5:0.2:8.5

Ingrese los valores de temperatura para construir la gráfica: 30:0.2:40

Por último, el programa pide los valores en los cuales se evaluará la ecuación de regresión, para la construcción de la superficie de respuesta.

A continuación, se puede ver la gráfica de superficie de respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 16), donde se observa claramente que el pH es el factor que más influye para el crecimiento.



**Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* para determinar la temperatura y pH óptimos de crecimiento.**

También se puede observar que la temperatura no es un factor determinante para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la mayor velocidad de crecimiento encontrada es a las condiciones de 40°C y pH de 5.

Por otro lado, además de conocer las condiciones óptimas de crecimiento, se determinaron las condiciones óptimas de producción de etanol, usando el rendimiento de producto en base al sustrato, el cual se calcula como:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{([ ]_{final} - [ ]_{inicial})_{de\ producto}}{([ ]_{final} - [ ]_{inicial})_{de\ sustrato}}$$

En la Tabla 11 se presentan los rendimientos calculados a partir de las cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas y pH's.

Tabla 11. Rendimiento de producto en base al sustrato (Yp/s) (g prod/g sust) de <i>S. cerevisiae</i> .			
pH	Temperatura (°C)		
	30	35	40
5	0.3927	0.3211	0.5786
6.8	0.2976	0.2824	0.5098
8.5	0.3007	0.5317	0.4646

De la misma manera en que se calcularon los coeficientes de la regresión lineal múltiple para la velocidad, se calcularon los coeficientes usando el rendimiento. A continuación se muestra la ventana de comandos de MATLAB:

Ingrese los valores de las condiciones en forma de matriz [1 pH T]: [1 5 30;1 6.8 30;1 8.5 30;1 5 35;1 6.8 35;1 8.5 35;1 5 40;1 6.8 40;1 8.5 40]

Ingrese los valores de los rendimientos en forma de matriz [r1;r2;...]: [0.3927;0.2976;0.3007;0.3211;0.2824;0.5317;0.5786;0.5098;0.4646]

La ecuación lineal es:  $y = -0.2473 + 6.638e-005 \cdot \text{pH} + 0.01873 \cdot T$ .

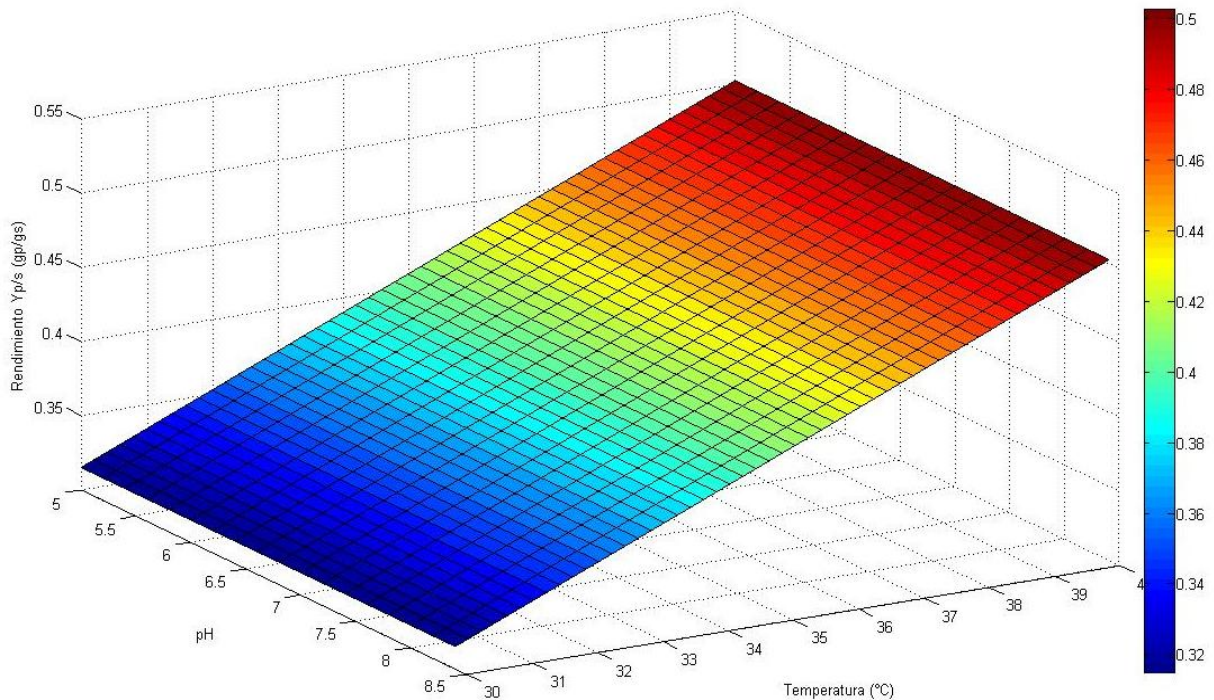
Los valores ajustados de la velocidad son:

Ye = 0.3150 0.3151 0.3152 0.4087 0.4088 0.4089 0.5023 0.5025 0.5026

Ingrese los valores de pH para construir la gráfica: 5:0.2:8.5

Ingrese los valores de temperatura para construir la gráfica: 30:0.2:40

La gráfica resultante del programa usando el rendimiento (Yp/s Figura 17), muestra que, para el caso del rendimiento de etanol, el factor que tiene más influencia en la producción de éste es la temperatura.



**Figura 17. Gráfica de superficie de respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* para determinar la temperatura y pH óptimos de producción.**

Además, se observa en la Figura 17 que los mayores rendimientos en la producción de etanol se presentan a temperatura de 40°C. Con los resultados mostrados en las gráficas de superficie de respuesta (Figura 16 y Figura 17), se puede decir que las condiciones óptimas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* son 40°C y pH de 5.

### 3.2.2. *Zymomonas mobilis* (NRRL-14234).

De la misma manera que *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó la caracterización cinética de *Zymomonas mobilis* con las mismas condiciones de evaluación, temperaturas de 30, 35 y 40°C y pH's de 5, 6.8 y 8.5, y una concentración de azúcares de 20 g/L, para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de etanol.

En la Figura 18, se observa la cinética de crecimiento obtenida a 30°C y pH de 5, donde se muestra que la concentración máxima alcanzada de biomasa es de 2.24 g/L, por otro lado se puede observar que el consumo de sustrato no fue efectivo, debido a que al final de la cinética aún se tenían 18.8 g/L, debido a esto, la concentración del etanol alcanzada sólo fue de 0.38 g/L, en un tiempo de 48hrs.

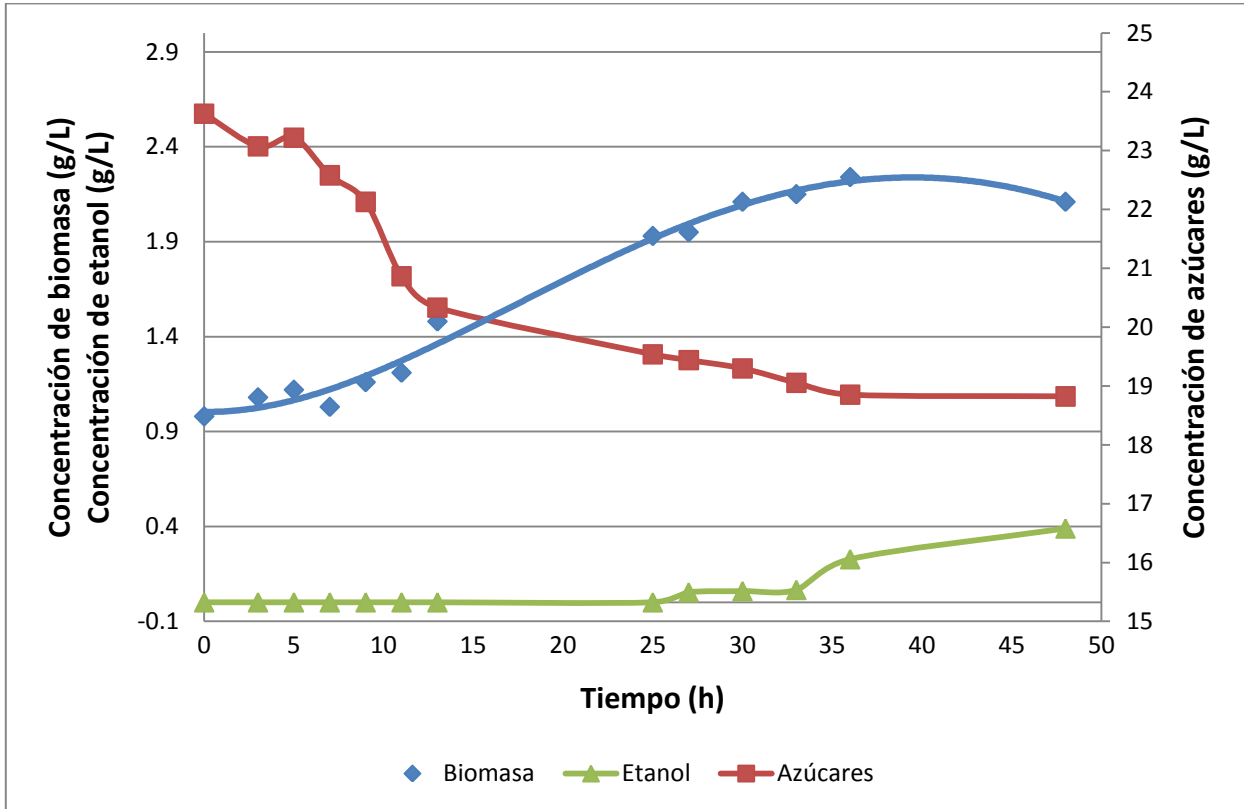


Figura 18. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 30°C y pH 5.

En la Figura 19 se observa la gráfica de crecimiento obtenida a 30°C y pH 6.8, donde se muestra que la concentración máxima alcanzada de biomasa es de 2.9 g/L, por otra parte podemos observar que se obtiene al final de la fermentación una concentración de azúcares de 16.5 g/L y una concentración de etanol de 0.03 g/L.

Por último, en la Figura 20 observamos la cinética obtenida a 30°C y 8.5, donde se puede apreciar que la máxima concentración que se obtuvo de biomasa fue de 3.02 g/L, también se puede observar que el consumo de azúcares no fue completo, teniendo al final de la fermentación una concentración de 11.1 g/L, y por último, se observa que no hubo producción de etanol.

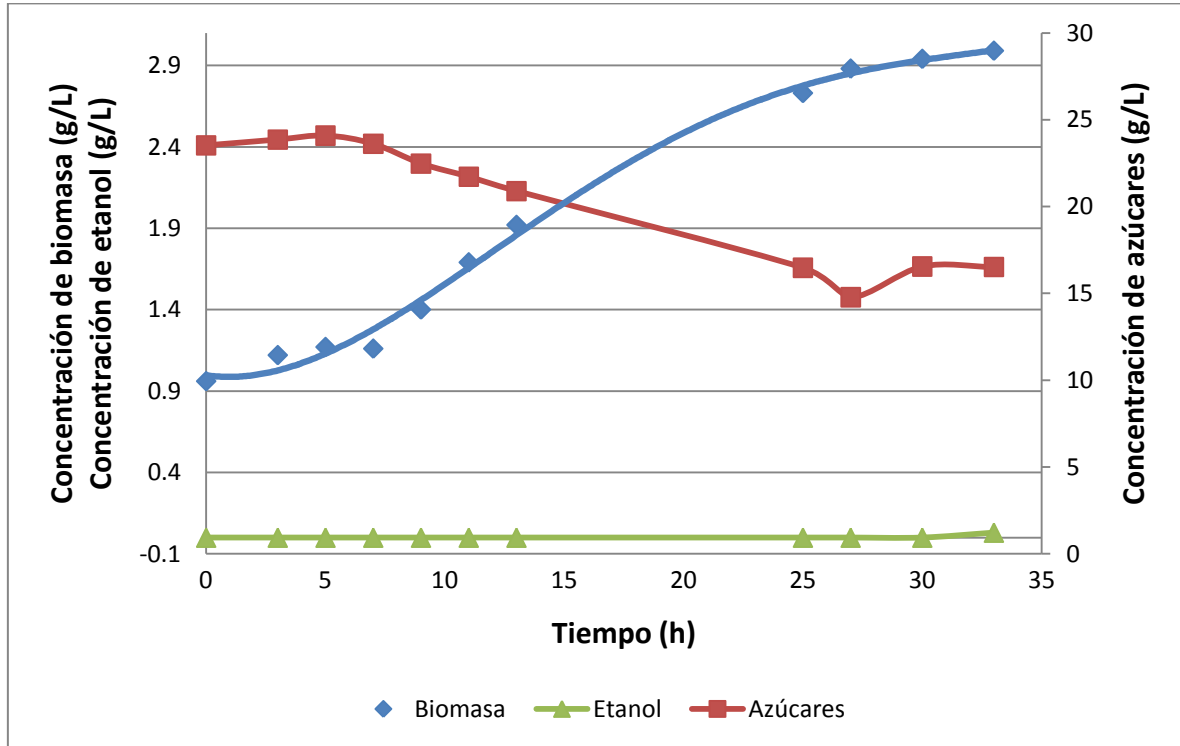


Figura 19. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 30°C y pH 6.8.

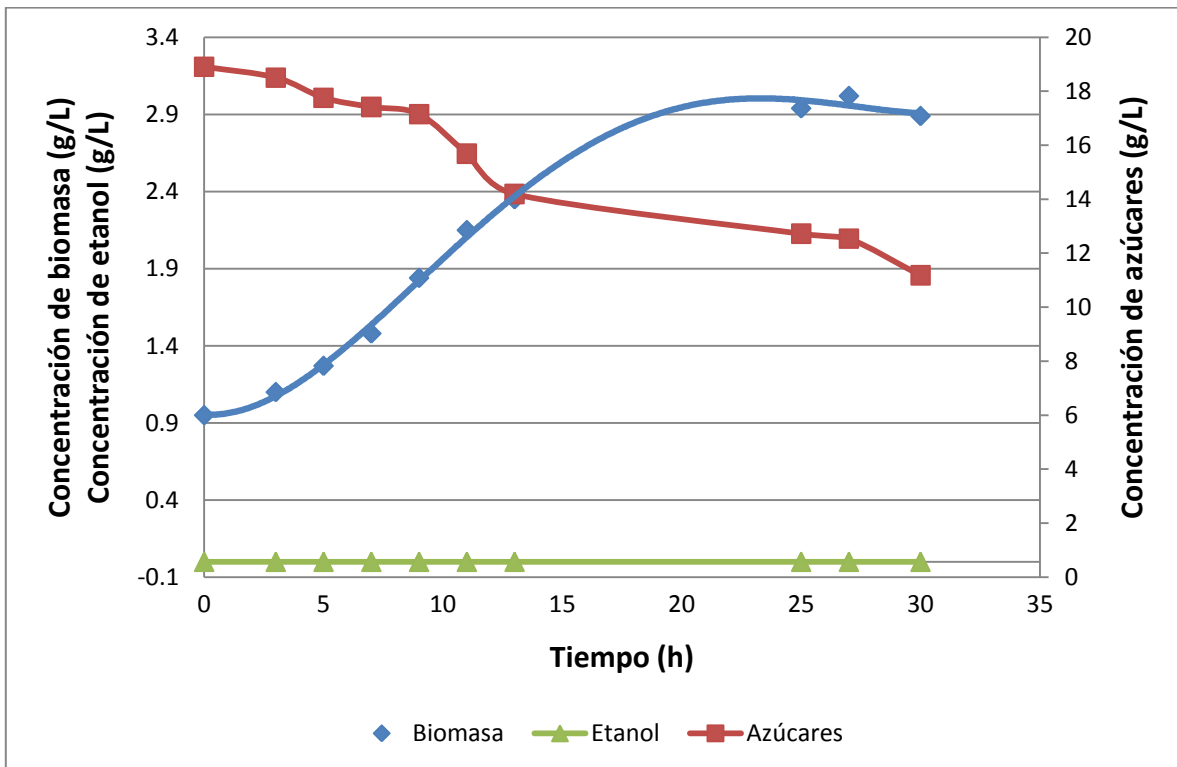


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 30°C y pH 8.5.

Las gráficas de las cinéticas que se realizaron a 35 y 40°C y pH's de 5, 6.8 y 8.5, se muestran en el anexo 6.3.

Una vez que se tenían todas las gráficas, se linealizaron los datos aplicando el logaritmo natural a cada uno de los datos de biomasa (Tabla 12).

Tabla 12. Datos linealizados de las cinéticas de *Z. mobilis* realizadas a 30°C.

Tiempo	pH 5	pH 6.8	pH 8.5
0	0.1044	0.2231	0.0953
3	0.1823	0.1133	0.0953
5	0.1133	0.1570	0.2390
7	0.2070	0.1484	0.3920
9	0.1484	0.3365	0.6098
11	0.1906	0.5247	0.7655
13	0.3920	0.6523	0.8544
25	0.6575	1.0043	1.0784
27	0.6678	1.0578	1.1053
30	0.7467	1.0784	1.0613
33	0.7655	1.0953	
36	0.8065	1.0473	
48	0.7467		

Posteriormente se graficaron los datos de la fase exponencial (marcados en verde en la Tabla 12), a estos se les realizó una regresión lineal (Figura 21). De esta regresión, la pendiente indica la velocidad específica de crecimiento, la Tabla 13 muestra las velocidades específicas de crecimiento obtenidas a las diferentes condiciones de pH y temperatura evaluadas en este experimento.

Tabla 13. Velocidades específicas de crecimiento de *Z. mobilis* ( $h^{-1}$ ).

pH	Temperatura (°C)		
	30	35	40
5	0.0207	0.0843	0.0212
6.8	0.0850	0.0942	0.0779
8.5	0.0899	0.0972	0.1015



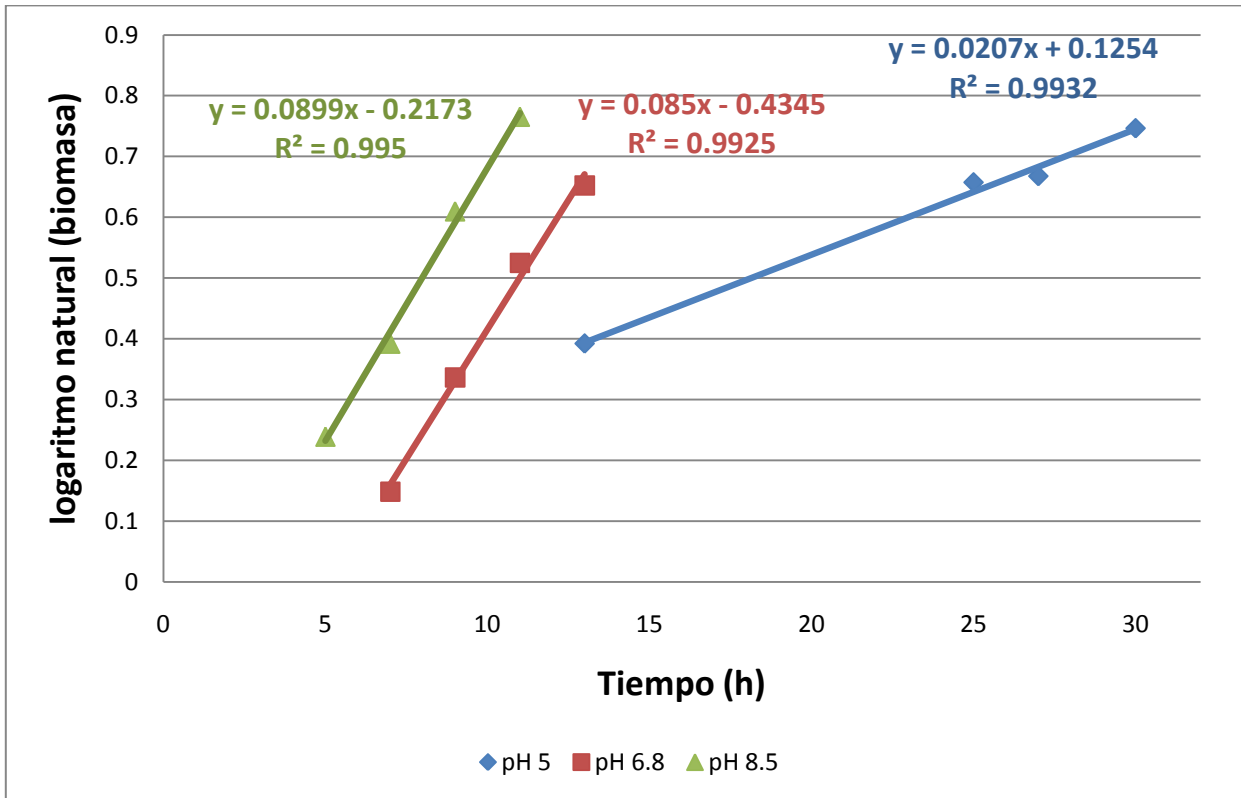


Figura 21. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de *Z. mobilis* a 30°C.

Para poder construir la superficie de respuesta, se diseñó un programa en MATLAB (ver algoritmo en anexo 6.2), el cual determina los coeficientes de la regresión lineal múltiple por el método matricial. A continuación se muestra la ventana de comandos, en donde se puede observar la manera en que son introducidos los datos de las condiciones y de las velocidades.

Además, se puede observar la ecuación de regresión lineal múltiple, con los coeficientes determinados por este método.

Ingrese los valores de las condiciones en forma de matriz [1 pH T]: [1 5 30;1 6.8 30;1 8.5 30;1 5 35;1 6.8 35;1 8.5 35;1 5 40;1 6.8 40;1 8.5 40]

Ingrese los valores de las velocidades en forma de matriz [v1;v2;...]: [0.0207;0.0850;0.0899;0.0843;0.0942;0.0972;0.0212;0.0779;0.1015]

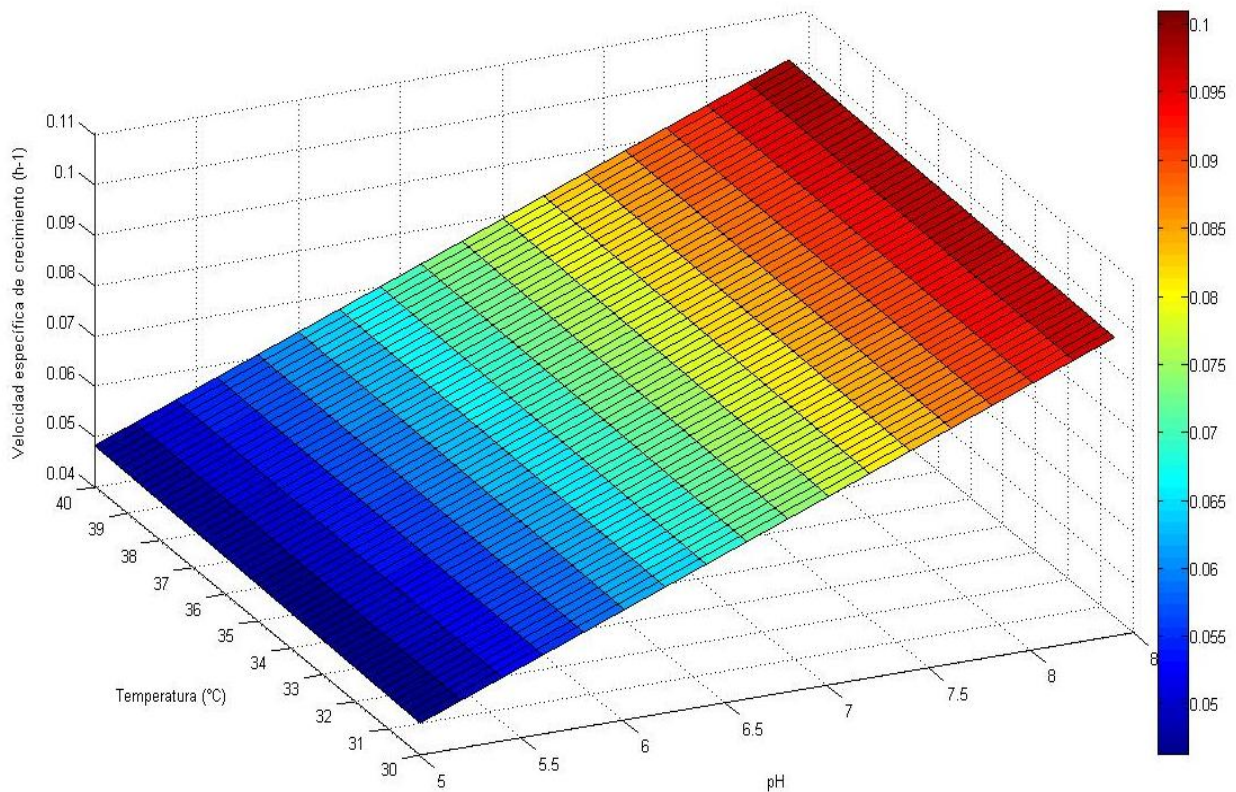
La ecuación lineal es:  $y = -0.03642 + 0.01555 \cdot \text{pH} + 0.0001667 \cdot T$ .

Ye = 0.0463 0.0743 0.1008 0.0472 0.0752 0.1016 0.0480 0.0760 0.1024

Ingrese los valores de pH para construir la gráfica: 5:0.2:8.5

Ingrese los valores de temperatura para construir la gráfica: 30:0.2:40

En los últimos dos renglones del cuadro anterior, se pueden observar los intervalos en los que se evaluará la ecuación obtenida, y con los cuales se obtendrá la gráfica de superficie (Figura 22).



**Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta de *Zymomonas mobilis* para determinar la temperatura y pH óptimos de crecimiento.**

En la gráfica de superficie se puede observar que el factor que tiene mayor influencia en el crecimiento es el pH, para el caso de *Z. mobilis* el pH donde se obtiene mayor producción de biomasa es 8.5. Además, se puede observar que la temperatura no influye en el crecimiento, siempre y cuando se trabaje al pH óptimo.

Por otro lado, además de conocer las condiciones óptimas de crecimiento, se determinaron las condiciones óptimas de producción de etanol, usando el rendimiento de producto en base al sustrato, el cual se calcula de la siguiente forma:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{([\ ]_{final} - [\ ]_{inicial})_{de\ producto}}{([\ ]_{final} - [\ ]_{inicial})_{de\ sustrato}}$$

En la Tabla 14 se pueden observar los rendimientos calculados a partir de las cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas y pH's.

Tabla 14. Rendimiento de producto en base al sustrato ( $Y_{p/s}$ ) (g prod/g sust) de <i>Z. mobilis</i> .			
pH	Temperatura (°C)		
	30	35	40
5	0.0810	0.0051	0.1042
6.8	0.0044	0.8232	0.0585
8.5	0.0000	0.1337	1.3472

De igual manera en que se calcularon los coeficientes para la velocidad específica, se calcularon los coeficientes para el rendimiento de producto. A continuación se muestra la ventana de comandos de MATLAB, en la cual se muestra la forma de insertar los datos de las condiciones y los datos de los rendimientos.

Además, se muestra la ecuación de regresión y los coeficientes calculados, con los que en la última etapa del programa, se calculará la superficie de respuesta.

Ingrese los valores de las condiciones en forma de matriz [1 pH T]: [1 5 30;1 6.8 30;1 8.5 30;1 5 35;1 6.8 35;1 8.5 35;1 5 40;1 6.8 40;1 8.5 40]

Ingrese los valores de los rendimientos en forma de matriz [r1;r2;...]: [0.0810;0.0044;0.0000;0.0051;0.8232;0.1337;0.1042;0.0585;1.3472]

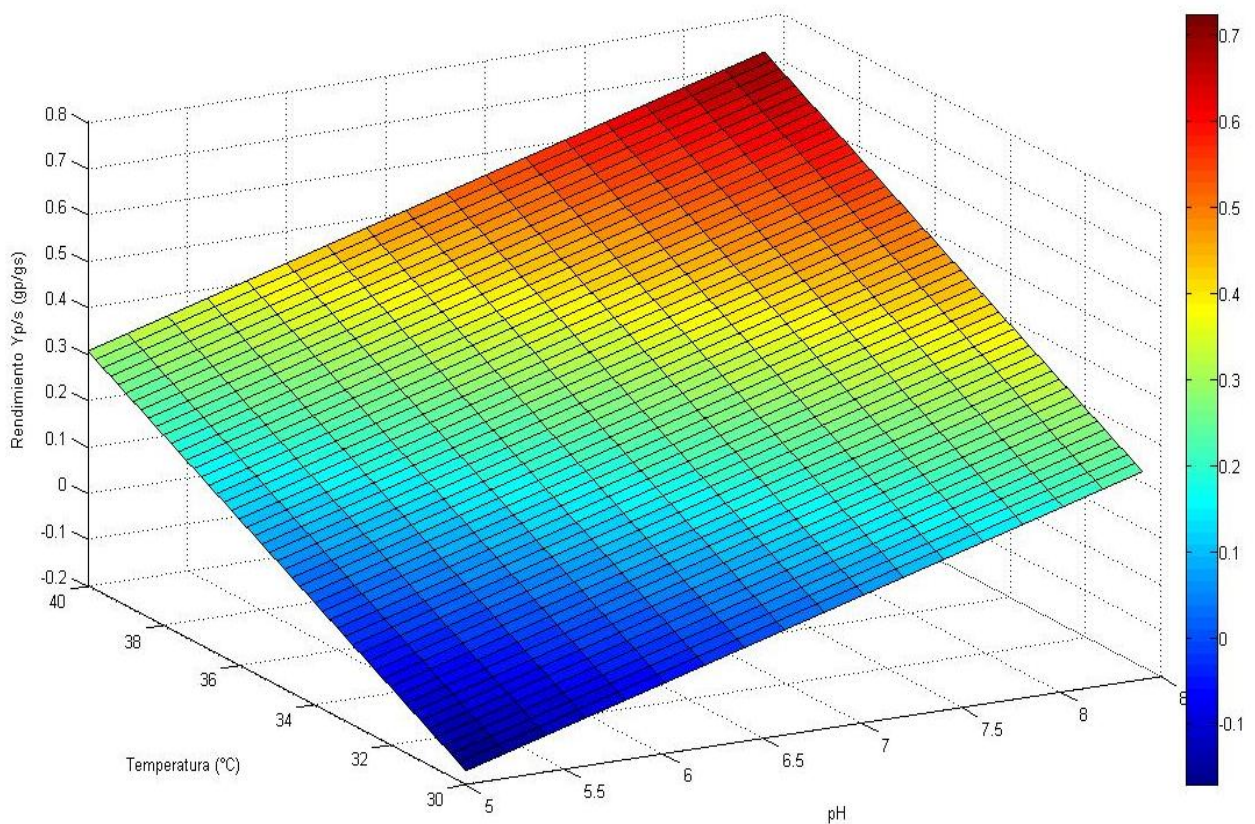
La ecuación lineal es:  $y = -2.21 + 0.123 \cdot \text{pH} + 0.04748 \cdot T$ .

Ye = -0.1705 0.0508 0.2599 0.0669 0.2882 0.4973 0.3043 0.5257 0.7347

Ingrese los valores de pH para construir la gráfica: 5:0.2:8.5

Ingrese los valores de temperatura para construir la gráfica: 30:0.2:40

La gráfica resultante del programa usando el rendimiento (Yp/s Figura 23), muestra que la producción de etanol se ve afectada por la temperatura y el pH.



**Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta de *Zymomonas mobilis* para determinar la temperatura y pH óptimos de producción.**

Como se observa a pH de 8.5 y temperatura de 40°C se obtiene el mayor rendimiento de producto, y si se varía uno de los dos factores, la producción se ve seriamente afectada.

En la Tabla 15 se resumen los parámetros de pH y temperatura óptimos de crecimiento y producción para ambos microorganismos.

Tabla 15. Parámetros óptimos de crecimiento y producción de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.

Factor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Zymomonas mobilis</i>	
	Crecimiento	Producción	Crecimiento	Producción
Temperatura (°C)	30-40	40	30-40	40
pH	5	5-8.5	8.5	8.5

De acuerdo con los datos encontrados por diferentes autores (Swings & De Ley, 1977), las condiciones óptimas de crecimiento de *Zymomonas mobilis* son: pH de 5 a 7 y temperatura de 30 a 36, lo cual difiere de lo encontrado en este trabajo, sin embargo, no muestran las condiciones óptimas de producción, que en un principio serían las condiciones que más interesan.

### 3.3. Fermentación en cultivo sumergido mixto.

Con los resultados de la caracterización, es posible definir las condiciones en las cuales los dos microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*) pueden trabajar en sinéresis para la producción de bioetanol. La Tabla 15, para la producción de etanol, *Zymomonas mobilis* tiene las condiciones de temperatura y pH limitadas a 40°C y 8.5, respectivamente, manteniendo una velocidad de crecimiento óptima.

Además, *Saccharomyces cerevisiae*, presenta también una producción óptima a las mismas condiciones que *Z. mobilis* (40°C y pH 8.5), sin embargo, su velocidad de crecimiento no es la óptima, lo cual a futuro al inmovilizarla podría ser de provecho, ya que se evitaría la ruptura de la matriz por crecimiento, lo cual llevaría a la liberación de la biomasa al medio de fermentación.

### 3.3.1. Producción de bioetanol con células libres.

La fermentación se llevó a cabo en un reactor agitado de 2L, con agitación de 100rpm, pH inicial de 8.5 y temperatura de 40°C, inoculando primero *Zymomonas mobilis* y 12hrs después *Saccharomyces cerevisiae*.

En la Figura 24, se observa la cinética de fermentación con cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL-6673) y *Zymomonas mobilis* (NRRL-14234), tomando en cuenta el crecimiento como biomasa total.

Se observa que la producción de biomasa total fue de 3.41 g/L, por otro lado se observa que el consumo de sustrato fue casi total, dejando como remanente únicamente 1.28g/L y en cuanto a la producción de etanol, se obtuvo una concentración de 13.08 g/L. Con estos datos se calculo el rendimiento de producto con base en el sustrato, el cual fue de 0.5773 (gprod/gsust).

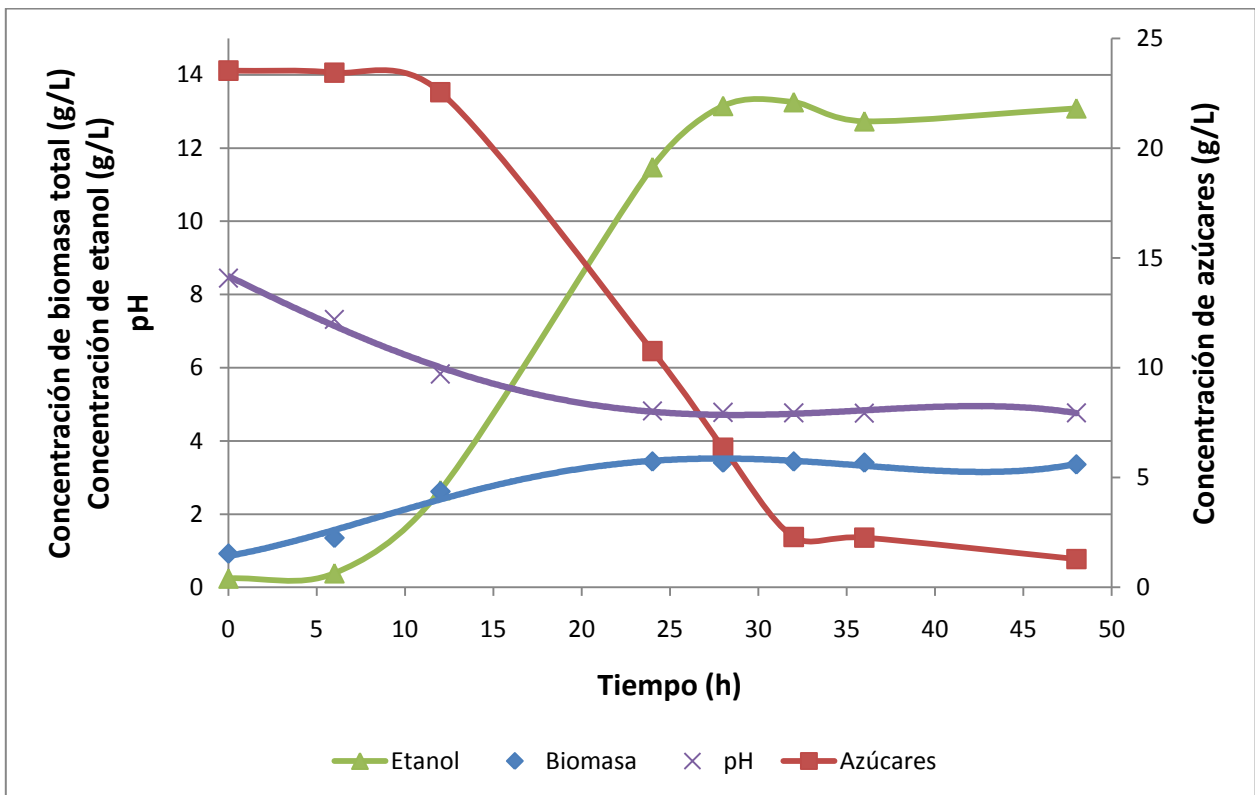
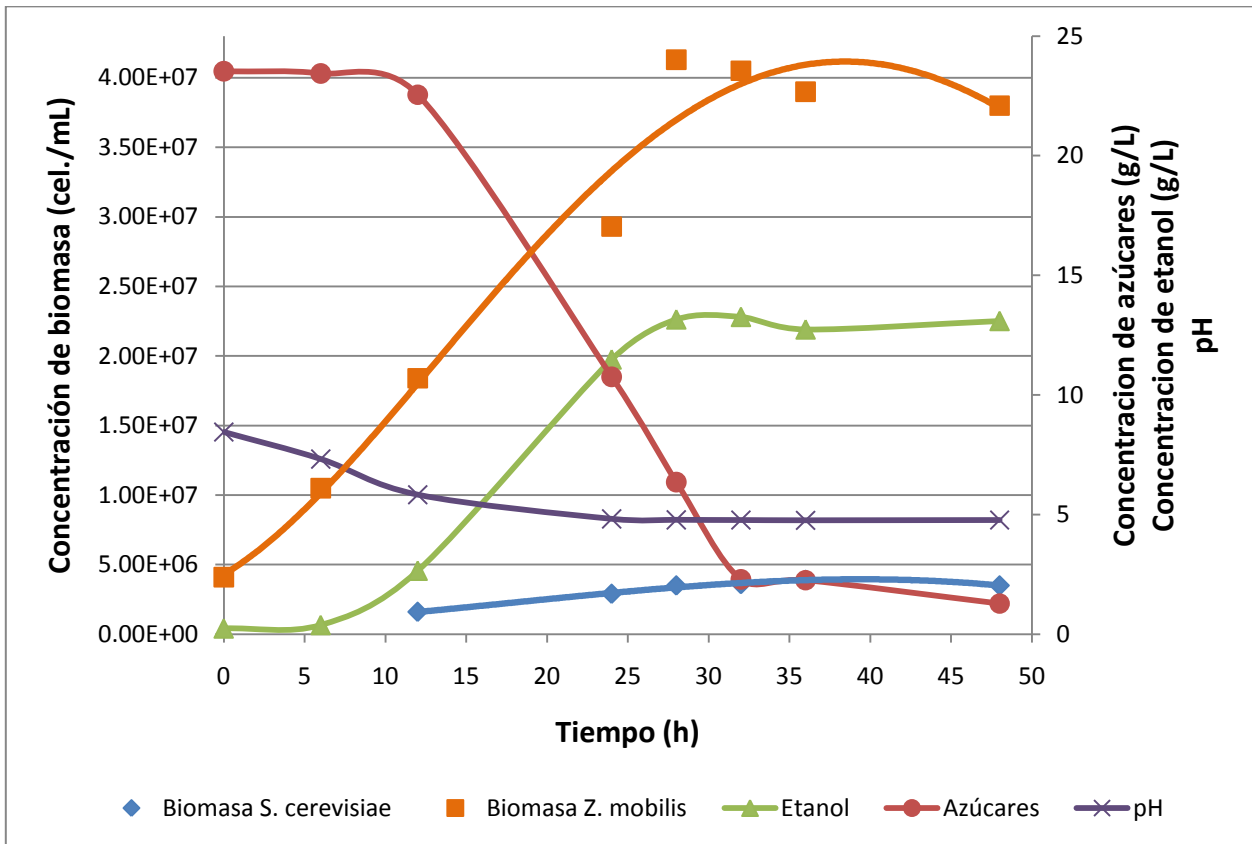


Figura 24. Fermentación en biorreactor de 2L con células libres de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* en cultivo mixto.

Es necesario mencionar que durante la fermentación, se observa una disminución importante en el pH, debido a que en condiciones aeróbicas, la producción de etanol va acompañada de la producción de otros ácidos orgánicos, principalmente el ácido acético, esto se manifiesta en presencia de etanol y de dióxido de carbono en el medio de fermentación (Doelle, Kirk, Crittenden, & Toh, 1993).



**Figura 25. Fermentación en biorreactor de 2L con células libres en cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.**

En la Figura 25 se observa la misma fermentación mencionada anteriormente, pero en esta gráfica la concentración de biomasa se reporta de manera individual; por un lado se presenta la concentración de biomasa de *Z. mobilis* donde obtenemos una concentración final de  $3.8 \times 10^7$  cel/mL, mientras que para *S. cerevisiae*, se obtuvo una concentración final de  $3.5 \times 10^6$  cel/mL.

Como se puede observar, cuando *S. cerevisiae* es inoculada, la producción de etanol ya se está llevando a cabo, acompañada de la disminución del pH y producción de ácidos

orgánicos por *Z. mobilis*; todos estos factores afectan de manera conjunta la producción de etanol y la viabilidad de *S. cerevisiae* (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008).

### 3.3.2. Producción de bioetanol con células inmovilizadas independientemente.

La fermentación se llevó a cabo en un reactor agitado de 0.5L, con agitación de aproximadamente 100rpm, pH inicial de 8.5 y temperatura de 40°C, inoculando primero *Zymomonas mobilis* y 8hrs después *Saccharomyces cerevisiae*.

En la Figura 26 se observa la cinética de fermentación con cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL-6673) y *Zymomonas mobilis* (NRRL-14234), tomando en cuenta el crecimiento como biomasa total.

Se observa, que la producción de biomasa total fue de 8.72 g/L y que el consumo de sustrato fue casi total, dejando como remanente únicamente 1.15 g/L. En cuanto a la producción de etanol, se obtuvo una concentración de 8.42 g/L; el rendimiento de producto con base en el sustrato fue 0.4097 (gprod/gsubst).

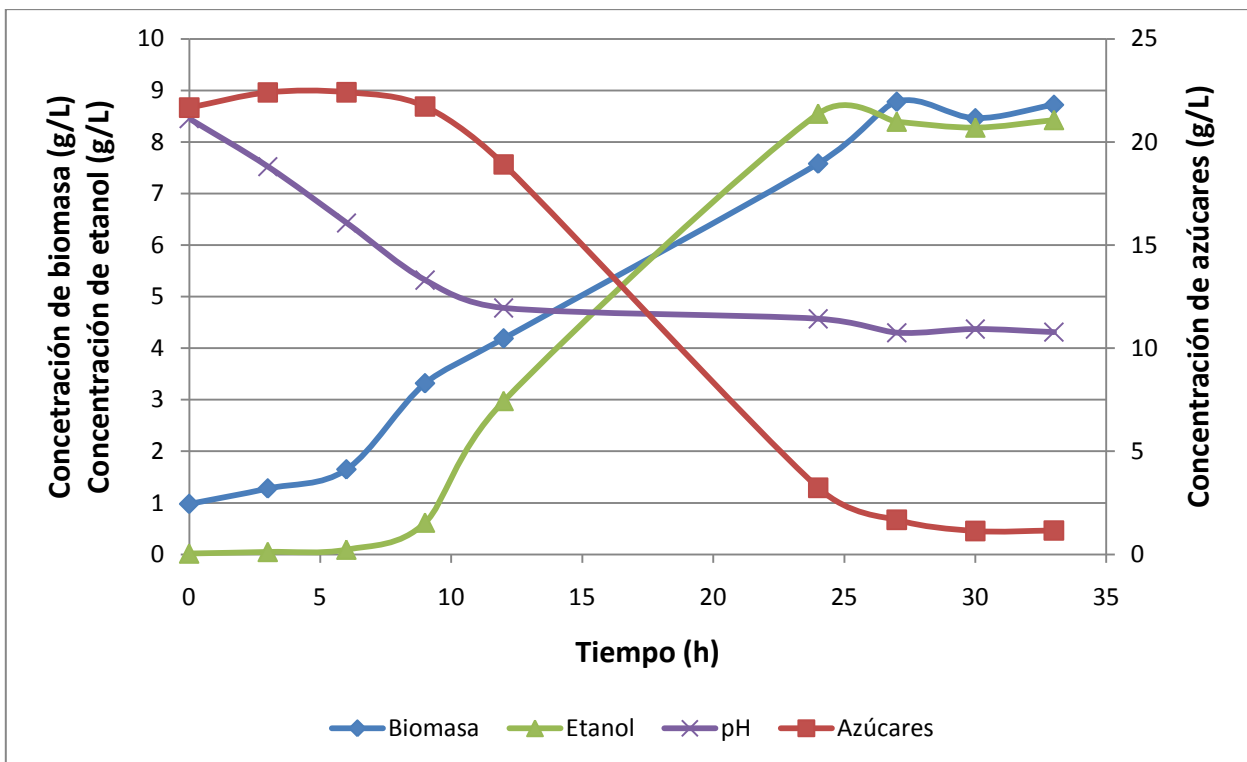
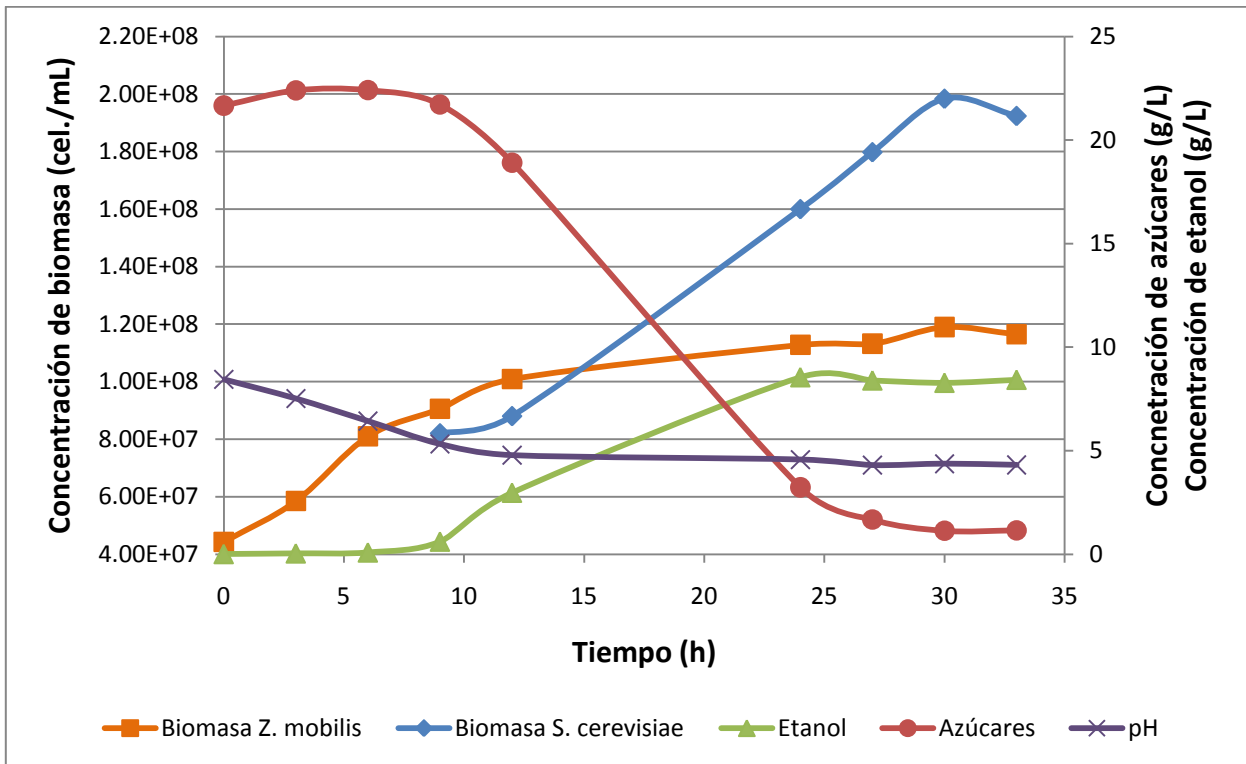


Figura 26. Fermentación en biorreactor de 0.5L con células inmovilizadas de manera independiente en cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.



Si se comparan los rendimientos obtenidos en ambas fermentaciones (células libres y células inmovilizadas), se observa que se obtiene un mayor rendimiento en la producción de etanol con las células libres.



**Figura 27. Fermentación en biorreactor de 0.5L con células inmovilizadas de manera independientes en cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.**

Dichos resultados indican que posiblemente el soporte de inmovilización está efectuando una función de protección a los microorganismos, de los factores del medio como son: el etanol, dióxido de carbono y otros ácidos, producidos por llevar a cabo una fermentación aerobia, los cuales se conocen por inhibir el crecimiento (Doelle, Kirk, Crittenden, & Toh, 1993), por lo tanto, con la inmovilización favorecemos el crecimiento.

En la Figura 27 se observa la misma fermentación con células inmovilizadas mencionada anteriormente, pero en esta gráfica la concentración de biomasa se reporta de manera individual. Por un lado se tiene la concentración de biomasa de *Z. mobilis* donde se obtuvo una concentración final de 1.16E8 cel/mL, mientras que para *S. cerevisiae*, se obtuvo una concentración final de 1.92E8 cel/mL.

Como se puede observar, cuando *S. cerevisiae* es inoculada, la producción de etanol apenas se está llevando a cabo, acompañada de la disminución del pH y producción de ácidos orgánicos por *Z. mobilis*, sin embargo el crecimiento de *S. cerevisiae* no se ve afectado debido a la posible protección conferida por el alginato de calcio; esta protección se manifiesta mediante fenómenos de difusión dentro del soporte de inmovilización. Dichos fenómenos evitan que las células se vean afectadas por las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla la fermentación (Chibata, 1978).

Cabe mencionar que hace falta profundizar más en estos temas de inmovilización para futuras investigaciones, ya que una de las aplicaciones económicamente importantes, es la fermentación en sistemas continuos, con la cual se puede tener mejor control del proceso, reducir costos de operación, reducir el periodo de adaptación de los microorganismos y obtener mayores rendimientos en la producción de etanol, así como una mayor uniformidad en el producto, evitando la producción de otros ácidos orgánicos (Doelle, Kirk, Crittenden, & Toh, 1993).

## IV. CONCLUSIONES.

- ❖ Para el caso de la hidrólisis ácida, la muestra de la que se obtuvo la mayor concentración de azúcares fermentables maltosa y glucosa fue la de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con 74.9 g/L y 125.6 g/L respectivamente, utilizando el makal (*Xanthosoma yucatanensis*) se obtuvieron 77.1 g/L y 124.1 g/L, y por último la muestra de polvo de yuca (*Yucca schidigera*) produjo 26.3 g/L y 41 g/L.
- ❖ Para la hidrólisis enzimática, la muestra de la que se obtuvo mayor producción de azúcares fermentables maltosa y glucosa fue la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con 75.9 g/L y 48.6 g/L respectivamente.
- ❖ Las condiciones óptimas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* fueron de 30-40 °C y pH de 5 y de 30-40 °C y pH de 8.5, respectivamente.
- ❖ Las condiciones óptimas de producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* son de 40 °C y pH de 5-8.5 y de 40 °C y pH de 8.5, respectivamente.
- ❖ La producción de etanol en la fermentación con células libres en cultivo mixto fue de 13.08 g/L, obteniendo un rendimiento de 0.5773 (gprod/g sust).
- ❖ La producción de etanol en la fermentación con células inmovilizadas en cultivo mixto fue de 8.42 g/L, obteniendo un rendimiento de 0.4097 (gprod/g sust).
- ❖ La inmovilización tiene un efecto positivo en producción de biomasa, sin embargo la producción de etanol se ve disminuida considerablemente.

## V. PERSPECTIVAS.

Una vez que se determinó el efecto que tiene la temperatura y el pH en el crecimiento y en la producción de etanol, sería de gran importancia tomar en cuenta otros sistemas de cultivo para la producción de etanol en biorreactor.

En este trabajo se realizaron únicamente dos sistemas de cultivo; usando células libres en cultivo mixto y células inmovilizadas en alginato de calcio; sin embargo se pueden realizar en un futuro, tomando este y otros trabajos como base, nuevos sistemas de cultivo para la producción de etanol.

A continuación propongo otros sistemas de cultivo, los cuales consideraría que faltan para poder determinar cuál de estos es el óptimo.

- ❖ Realizar cinéticas de producción en matraz con cultivos mixtos; con esto se podría determinar el tiempo de inoculación.
  - Inocular los dos microorganismos al mismo tiempo.
  - Primero *S. cerevisiae* y luego *Z. mobilis*.
  - Contrario al punto anterior.
- ❖ Realizar cinéticas de producción en biorreactor con cultivos mixtos, tomando en cuenta los resultados anteriores.
- ❖ Cinéticas de producción en biorreactor empacado con células inmovilizadas de forma independiente.
- ❖ Cinéticas de producción en biorreactor empacado con células inmovilizadas en cultivo mixto.
  - Células inmovilizadas por separado, empacadas en columnas independientes.
  - Células inmovilizadas por separado, empacadas en una misma columna.
  - *S. cerevisiae* libre y *Z. mobilis* inmovilizada.
  - Contrario al punto anterior.
  - Co-inmovilización.

## VI. BIBLIOGRAFÍA.

AIE. (2007). *World Energy Outlook*. París.

Alarcón Elias, A. V. (2010). *Tesis "Producción de bioetanol con Zymomonas mobilis"*. UPIBI-IPN, México.

Amutha, R., & Gunasekaran, P. (2001). Production of ethanol from Liquefied Cassava Starch Using Co- Immobilized Cells of Zymomonas mobilis and Saccharomyces diastaticus. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 92 (6), p 560-564.

Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Atlas, R. M. (2004). *Handbook of Microbiological Media* (Tercera ed.). Florida: Ed. CRC Press.

Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* , 26, p 89-105.

Bajpai, P. K., & Margaritis, A. (1987). Effects of ethanol concentration on immobilized Zymomonas mobilis for continuous production of ethanol. *Fermentation technology* , 65 (2), p 233-237.

C. G. (2008). *Ley de promoción y desarrollo de bioenergéticos*. Decreto.

Chibata, I. (1978). *Immobilized enzymes: research and development* (Primera ed.). Tokyo: Ed. Kodansha.

Doelle, H. W., Kirk, L., Crittenden, R., & Toh, H. (1993). Zymomonas mobilis- Science and Industrial Application. *Critical Reviews in Biotechnology* , 13 (1), p 57-98.

Durán Páramo, E., & Muñoz Aguilar, J. M. (2003). *Manual de prácticas del laboratorio de Biotecnología Alimentaria*. México: UPIBI-IPN.

FAO. (2008). *Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades*. Roma: FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación).

- Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos* (Segunda ed.). Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.
- Gunasekaran, P., & Chandra Raj, K. (1999). Ethanol fermentation technology - *Zymomonas mobilis*. *Current Science* , 77 (1), p 56-68.
- Hernández Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel Guerrero, L., & Betancur Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatan, México. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* , 28 (3), p 718-726.
- Khuri, A. I., & Cornell, J. A. (1987). *Response Surfaces: Designs and Analyses*. New York, USA: Marcel Dekker.
- Kondorosi, A., Sváb, Z., Solymosy, F., & Fedorcsák, I. (1972). Effect of Diethyl Pyrocarbonate on the Biological Activity of Deoxyribonucleic Acids Isolated from Bacteriophages. *Journal of Virology* , 16, p 373-380.
- Kosaric, N., Vardar-Sukan, F., & Pieper, H. (2001). *Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. (M. Roehr, Ed.) Wiley.
- McGhee, J. E., Julian, G., Detroy, R. W., & Bothast, R. J. (1982). Ethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering* , 24, p 1155-1163.
- Mera, I., Hoyos, J. L., Carrera, J., Forero, C. L., & Velasco, R. (2003). Caracterización enzimática de alfa-amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de yuca (manihot esculenta). *Facultada de Ciencias Agropecuarias* , 1 (1), p 83-88.
- Montgomery, D. C. (2002). *Diseño y análisis de experimentos* (Segunda ed.). México, D.F.: Limusa.
- Montgomery, D. C., & Runger, G. C. (2003). *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería* (Segunda ed.). México, D.F.: Limusa.
- Mousdale, D. M. (2008). *Biofuels: Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development* (Primera ed.). Boca Raton: CRC Press.

Patle, S., & Lal, B. (2008). Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* , 32 (6), p 596-602.

Soler, A., Guzmán, G., & Pérez Sánchez, C. (Junio de 1966). Transformaciones de mono y disacaridos por el ácido sulfúrico 2N. *Real Sociedad Española de Física y Química* , p 224-230.

Swings, J., & De Ley, J. (1977). The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews* , 41 (1), p 1-46.

Tanaka, H., Kurosawa, H., & Murakami, H. (1986). Ethanol production from starch co-immobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. 28, p 1761-1768.

Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M., & Amorim, H. V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *TIBTECH* , 17, p 482-487.

## VII. ANEXOS.

### 7.1. Gráficas para la caracterización cinética de *Saccharomyces cerevisiae*.

A continuación se muestran los datos y gráficas obtenidas para la caracterización de *Saccharomyces cerevisiae*, a temperatura de 35°C.

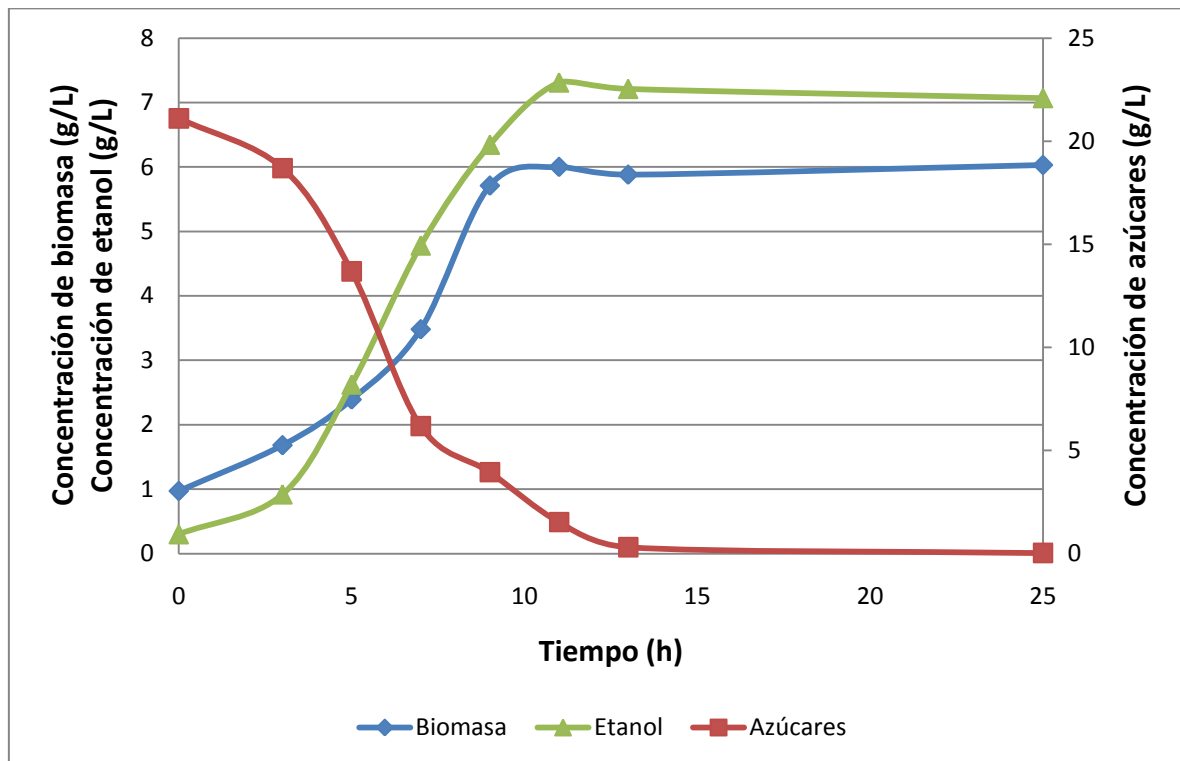


Figura 28. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 35°C y pH 5.

De acuerdo con el diseño experimental, el punto central se debe de hacer por duplicado, por lo que las figuras 12 y 13 representan las mismas condiciones.



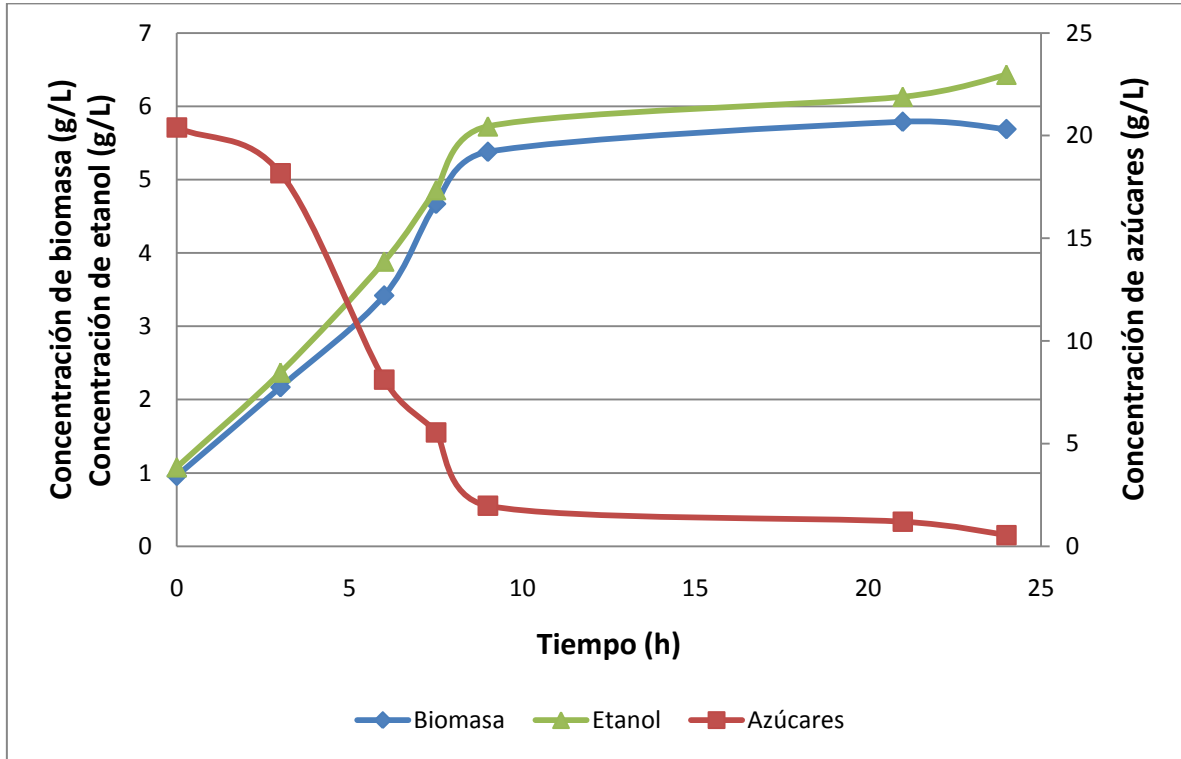


Figura 29. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 35°C y pH 6.8.

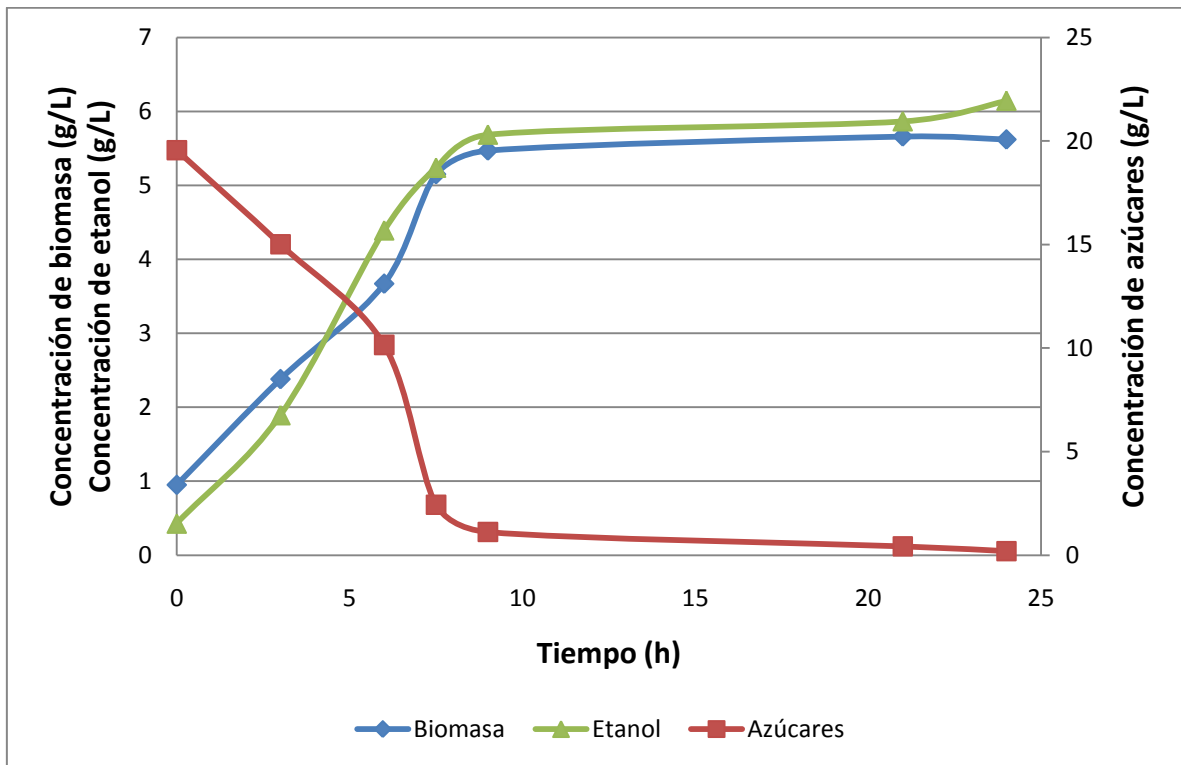


Figura 30. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 35°C y pH 6.8.

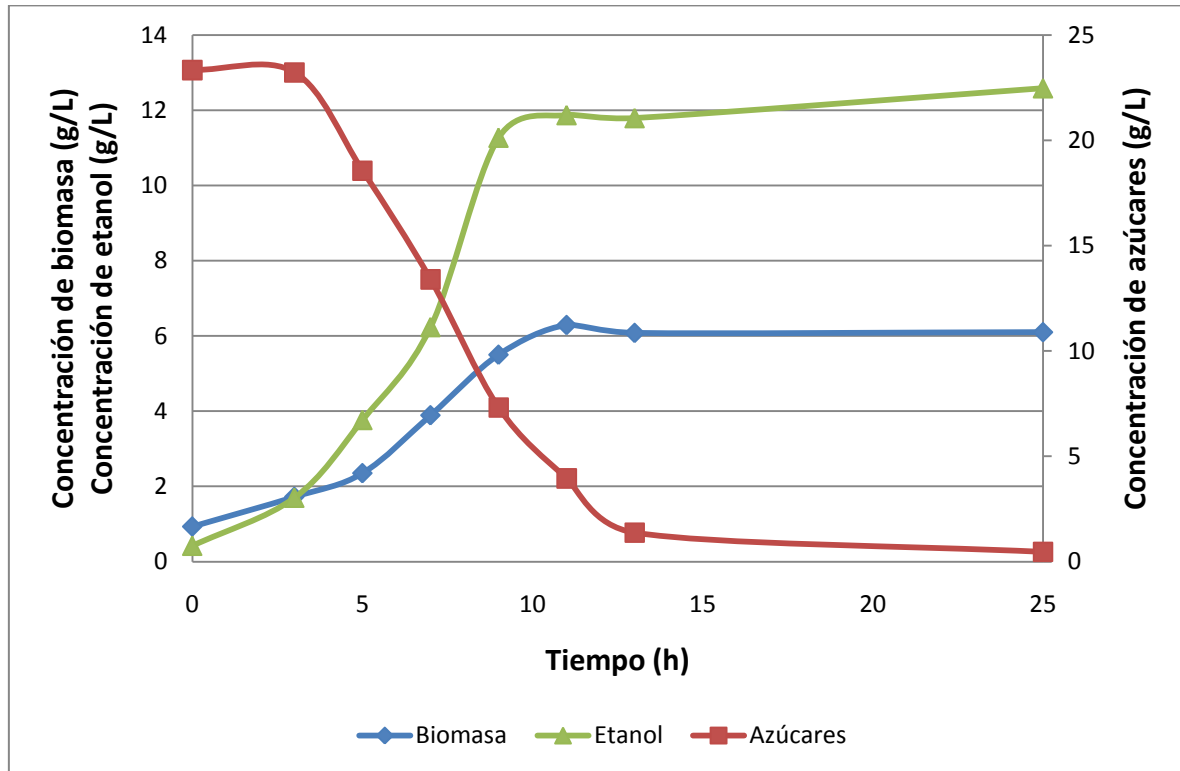


Figura 31. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 35°C y pH 8.5.

Tabla 16. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 35°C con *S. cerevisiae*.

Tiempo (h)	pH 5	pH 6.8		pH 8.5
0	-0.03046	-0.04082	-0.05129	-0.07257
3	0.51879	0.77473	0.86710	0.54232
5	0.87129	1.22964	1.30019	0.85442
7	1.24703	1.54116	1.63900	1.35841
9	1.74222	1.68269	1.69928	1.70475
11	1.79176	1.75613	1.73342	1.83896
13	1.77156	1.73871	1.72633	1.80500
25	1.79675			1.80829

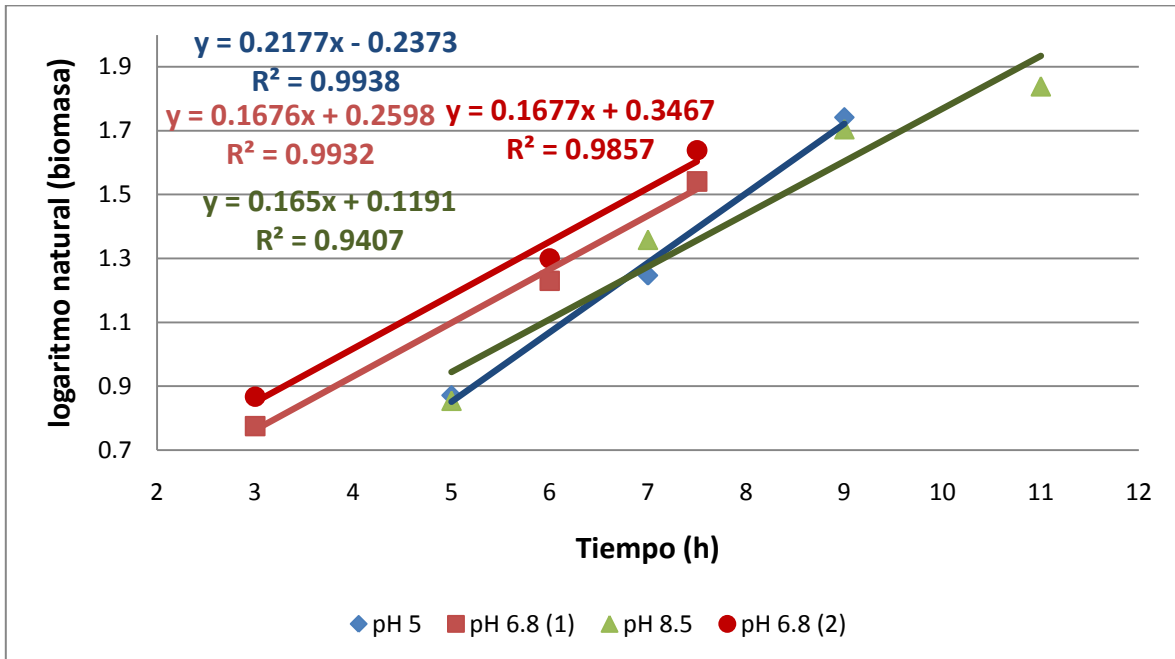


Figura 32. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de *S. cerevisiae* a 35°C.

A continuación se muestran las gráficas y los datos obtenidos para la caracterización de *Saccharomyces cerevisiae*, a una temperatura de 40°C.

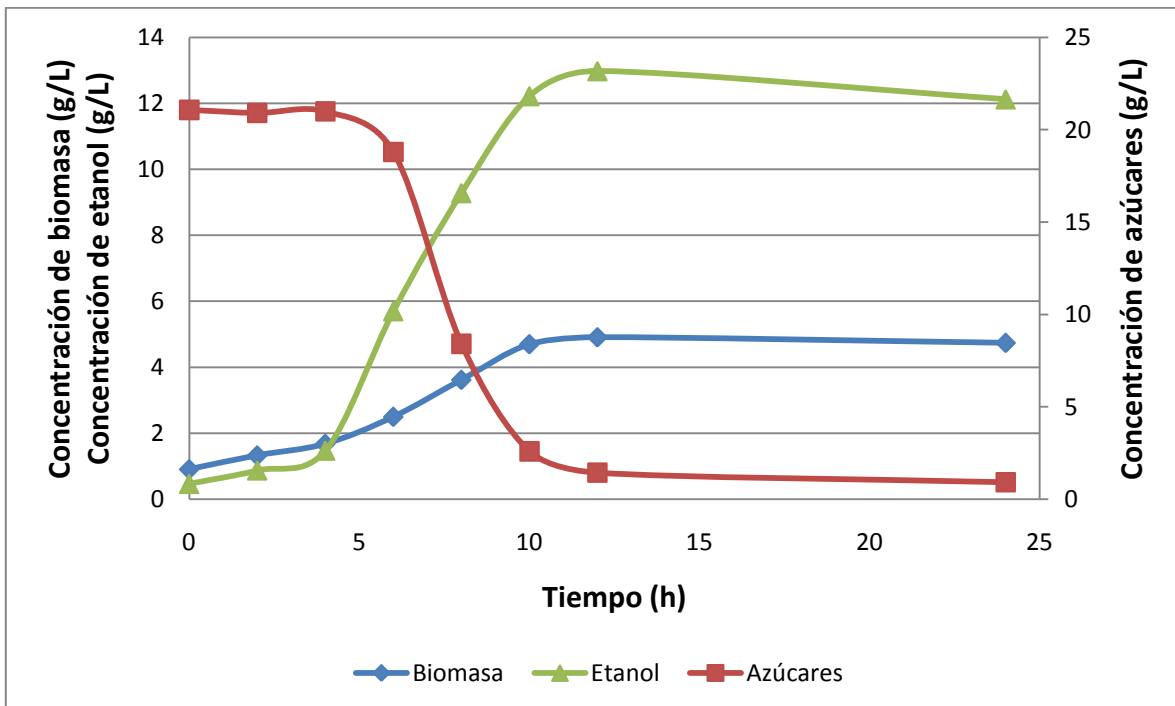


Figura 33. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 40°C y pH 5.

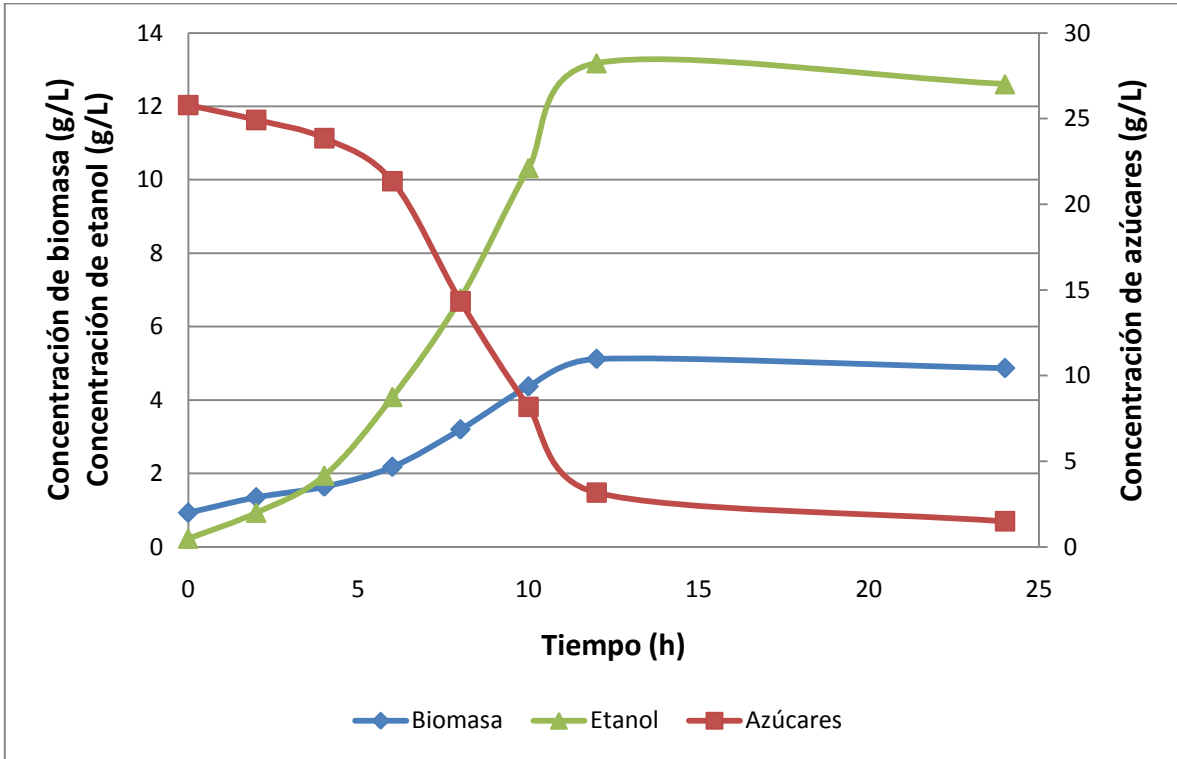


Figura 34. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 40°C y pH 6.8.

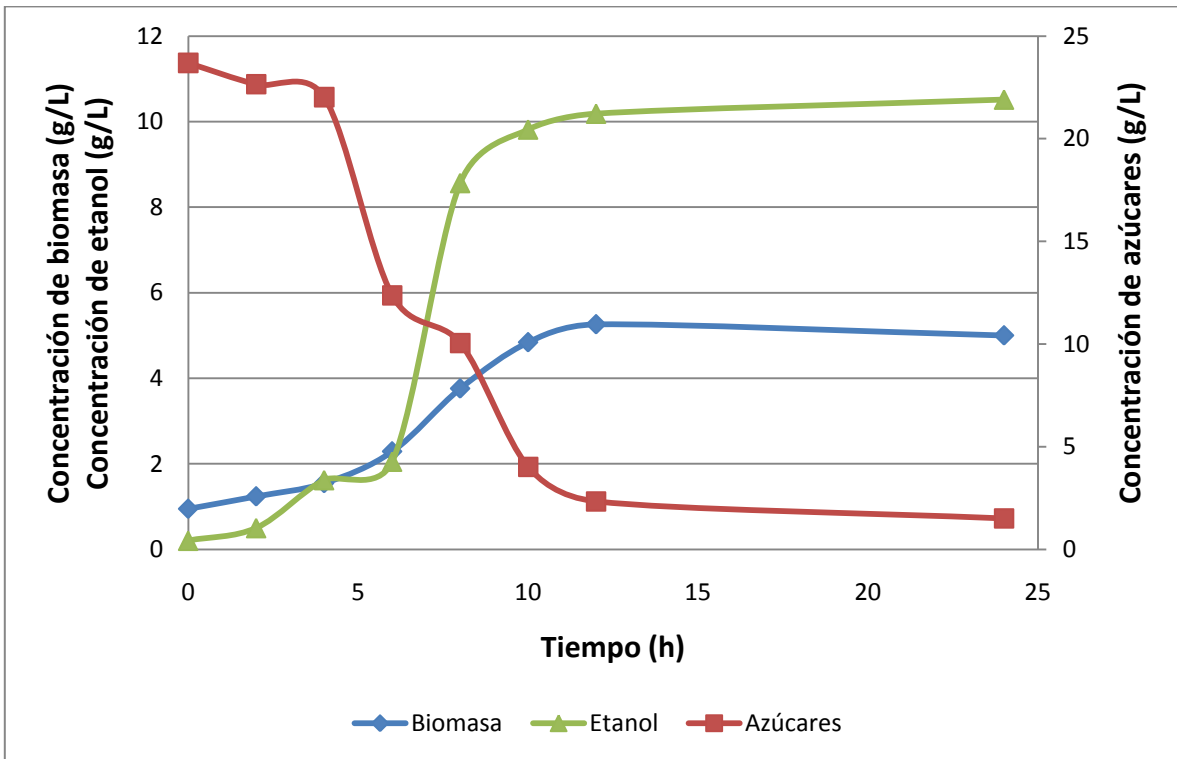


Figura 35. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a 40°C y pH 8.5.



Tabla 17. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 40°C con *S. cerevisiae*.

Tiempo (h)	pH 5	pH 6.8	pH 8.5
0	-0.0943	-0.0726	-0.0513
2	0.2852	0.3001	0.2151
4	0.5188	0.4947	0.4383
6	0.9163	0.7793	0.8286
8	1.2865	1.1632	1.3244
10	1.5476	1.4748	1.5769
12	1.5913	1.6332	1.6601
24	1.5560	1.5831	1.6094

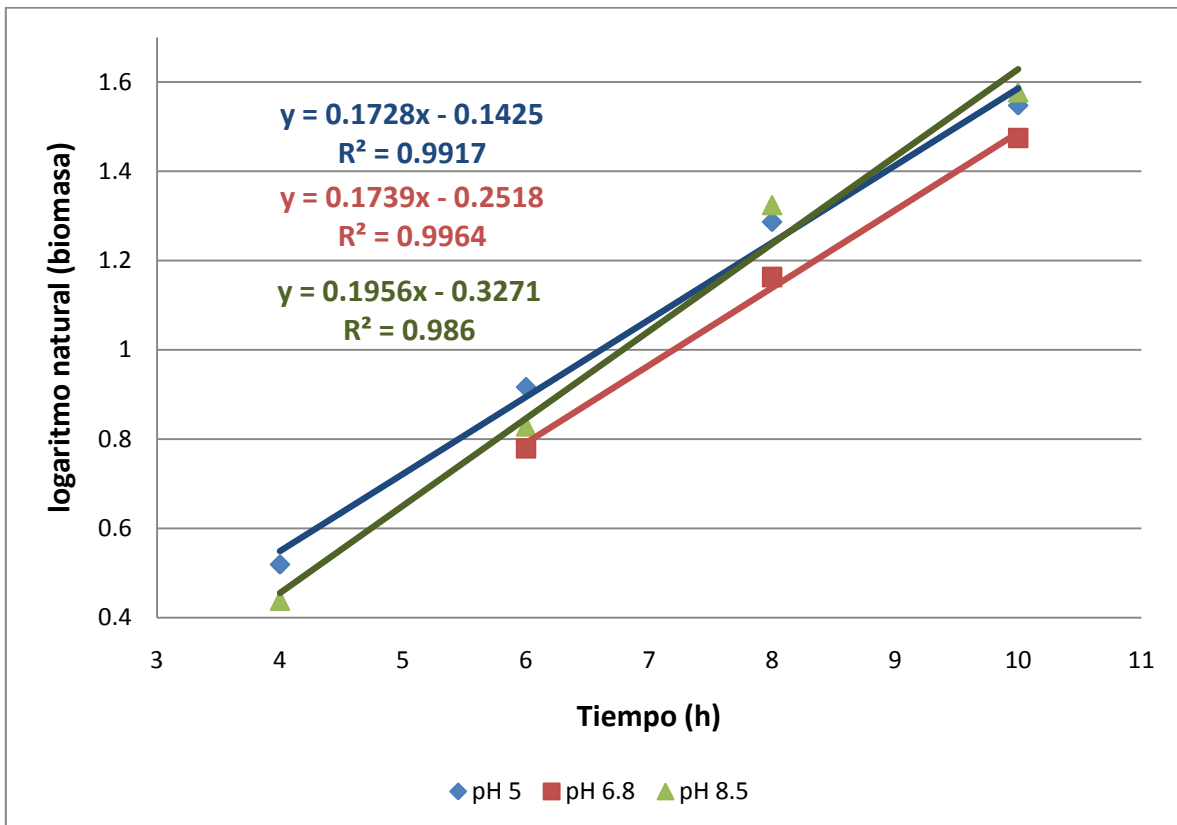


Figura 36. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de *S. cerevisiae* a 40°C.

## 7.2. Algoritmos para determinar los coeficientes de regresión múltiple por el método matricial.

**%Algoritmo para determinar los coeficientes de regresión múltiple para la caracterización de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* usando la velocidad.**

```
clear;clc;
X=input('Ingrese los valores de las condiciones en forma de matriz [1 pH
T]: ');
Y=input('Ingrese los valores de las velocidades en forma de matriz
[v1;v2;...]: ');
A=X'*X;
B=X'*Y;
R=A^-1*B;
c1=R(1,1);c2=R(2,1);c3=R(3,1);
fprintf('\nLa ecuación lineal es: y=% 5.4g% +5.4g*pH%
+5.4g*T.\n\n',c1,c2,c3)
%Datos para el cálculo de las superficies de respuesta usando la velocidad.
pH=input('Ingrese los valores de pH para construir la gráfica: ');
Tem=input('Ingrese los valores de temperatura para construir la gráfica:
');
[P,T]=meshgrid(pH,Tem);
y=c1+c2*P+c3*T;
surf(P,T,y)
```

**%Algoritmo para determinar los coeficientes de regresión múltiple para la caracterización de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* usando el rendimiento.**

```
clear;clc;
X=input('Ingrese los valores de las condiciones en forma de matriz [1 pH
T]: ');
Y=input('Ingrese los valores de los rendimientos en forma de matriz
[r1;r2;...]: ');
A=X'*X;
B=X'*Y;
R=A^-1*B;
c1=R(1,1);c2=R(2,1);c3=R(3,1);
fprintf('\nLa ecuación lineal es: y=% 5.4g% +5.4g*pH%
+5.4g*T.\n\n',c1,c2,c3)
%Datos para el cálculo de las superficies de respuesta usando la velocidad.
pH=input('Ingrese los valores de pH para construir la gráfica: ');
Tem=input('Ingrese los valores de temperatura para construir la gráfica:
');
[P,T]=meshgrid(pH,Tem);
y=c1+c2*P+c3*T;
surf(P,T,y)
```

### 7.3. Gráficas para la caracterización cinética de *Zymomonas mobilis*.

A continuación se muestran las gráficas y los datos obtenidos para la caracterización de *Zymomonas mobilis* a temperatura de 35°C.

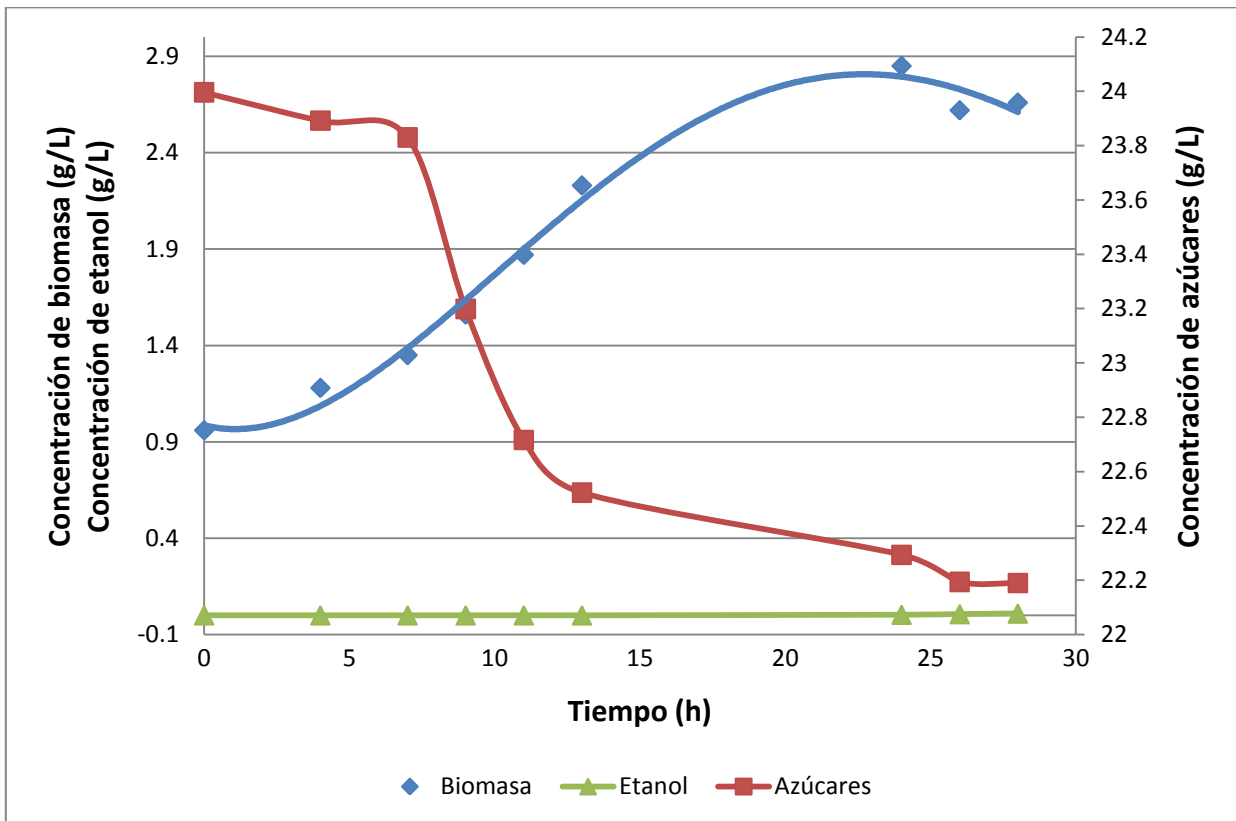


Figura 37. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 35°C y pH 5.

De acuerdo al diseño experimental factorial central, el punto central de las condiciones se realiza por duplicado. A continuación se muestran las gráficas.

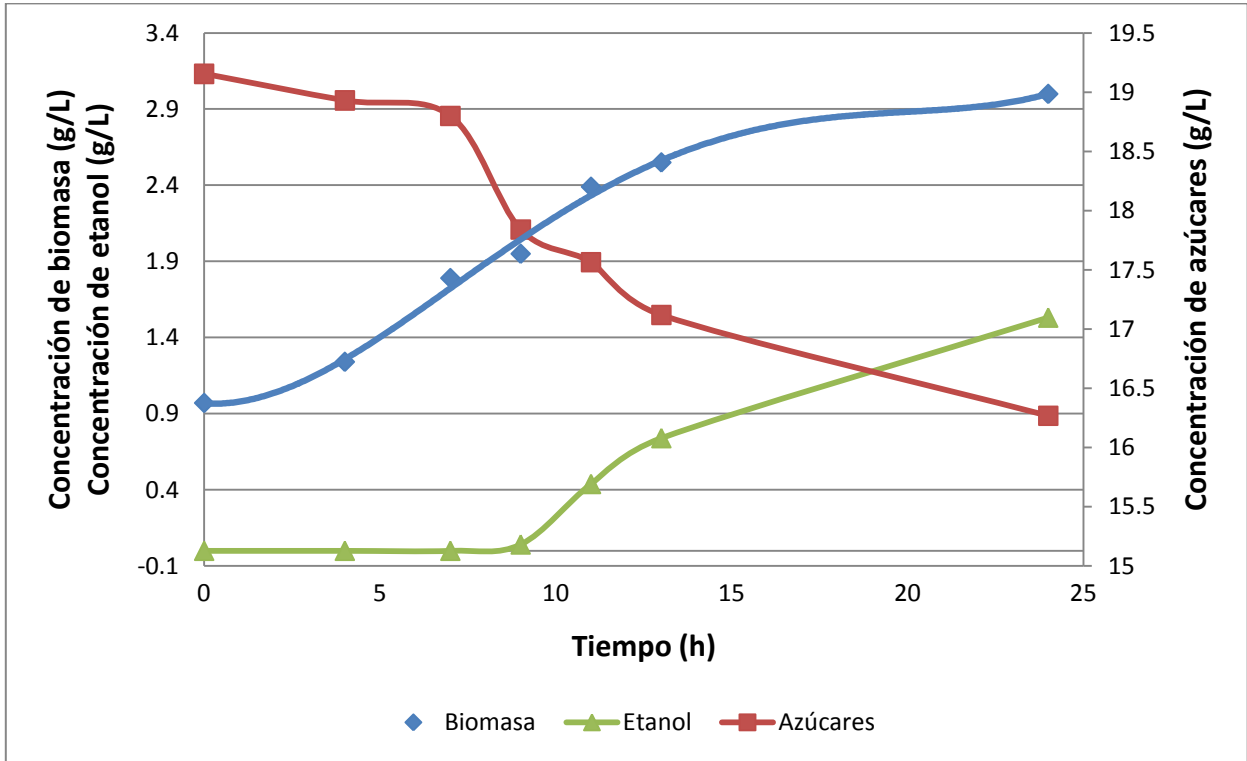


Figura 38. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 35°C y pH 6.8.

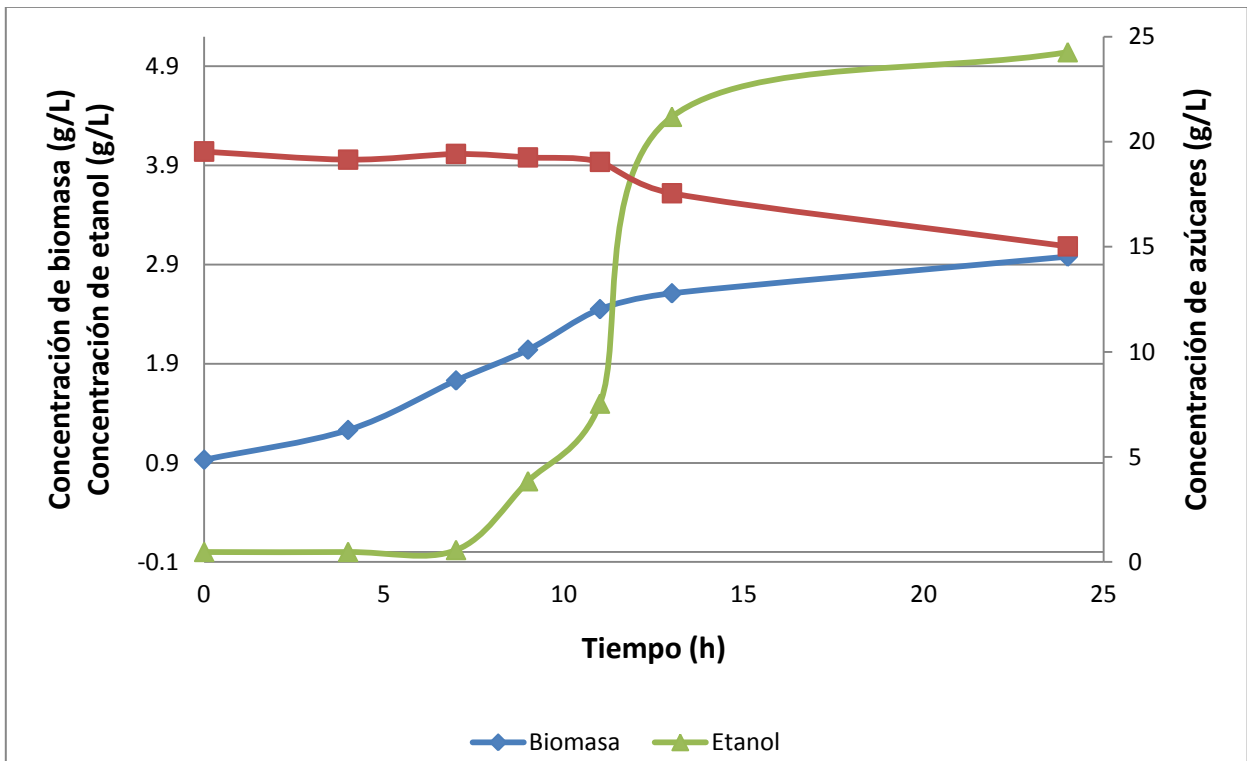


Figura 39. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 35°C y pH 6.8.



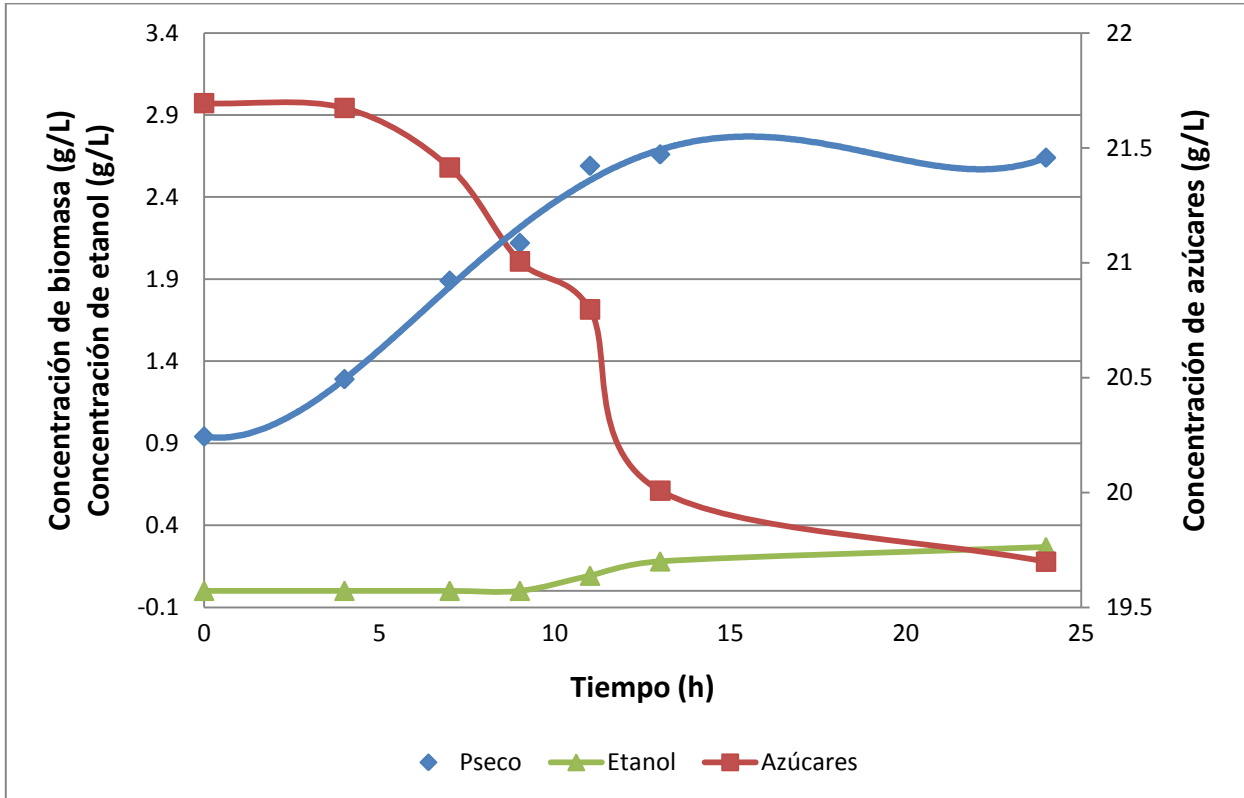


Figura 40. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 35°C y pH 8.5.

Tabla 18. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 35°C con *Z. mobilis*.

Tiempo	pH 5	pH 6.8		pH 8.5
0	-0.0202	-0.0305	-0.0726	-0.0619
4	0.1655	0.2151	0.2070	0.2546
7	0.3001	0.5822	0.5481	0.6366
9	0.4447	0.6678	0.7129	0.7514
11	0.6259	0.8713	0.8961	0.9517
13	0.8020	0.9361	0.9594	0.9708
24	1.0473	1.0986	1.0919	0.9933
26				

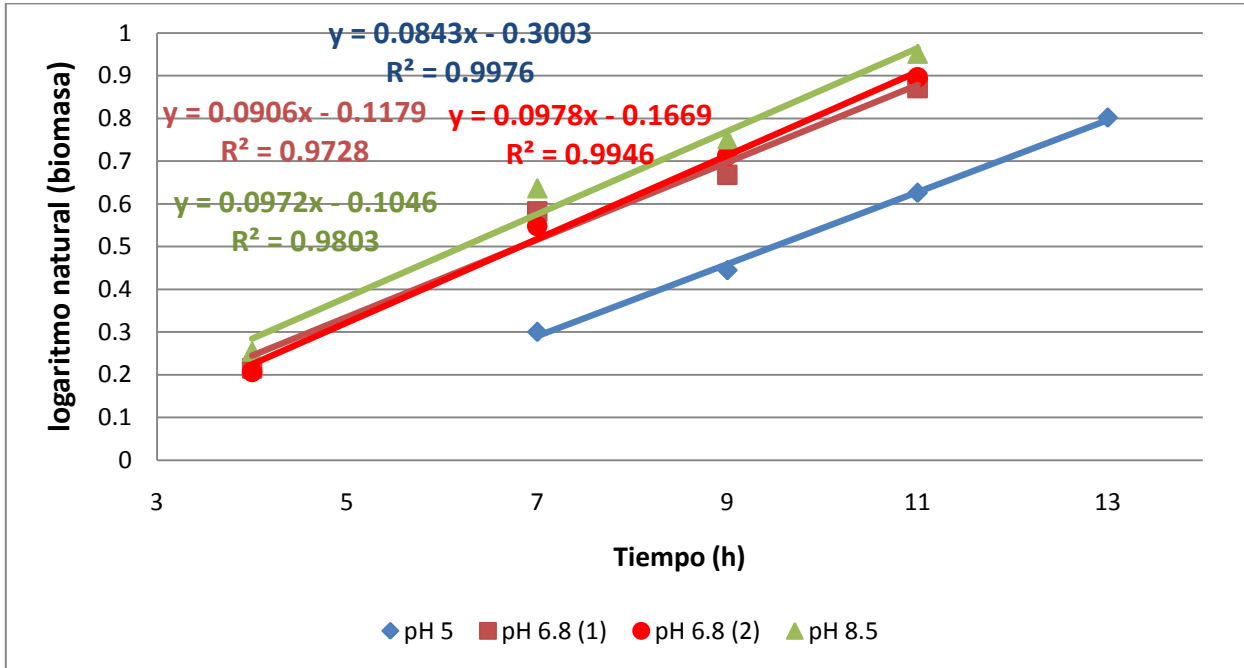


Figura 41. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de *Z. mobilis* a 35°C.

A continuación se muestran las gráficas y los datos obtenidos para la caracterización de *Z. mobilis* a temperatura de 40°C.

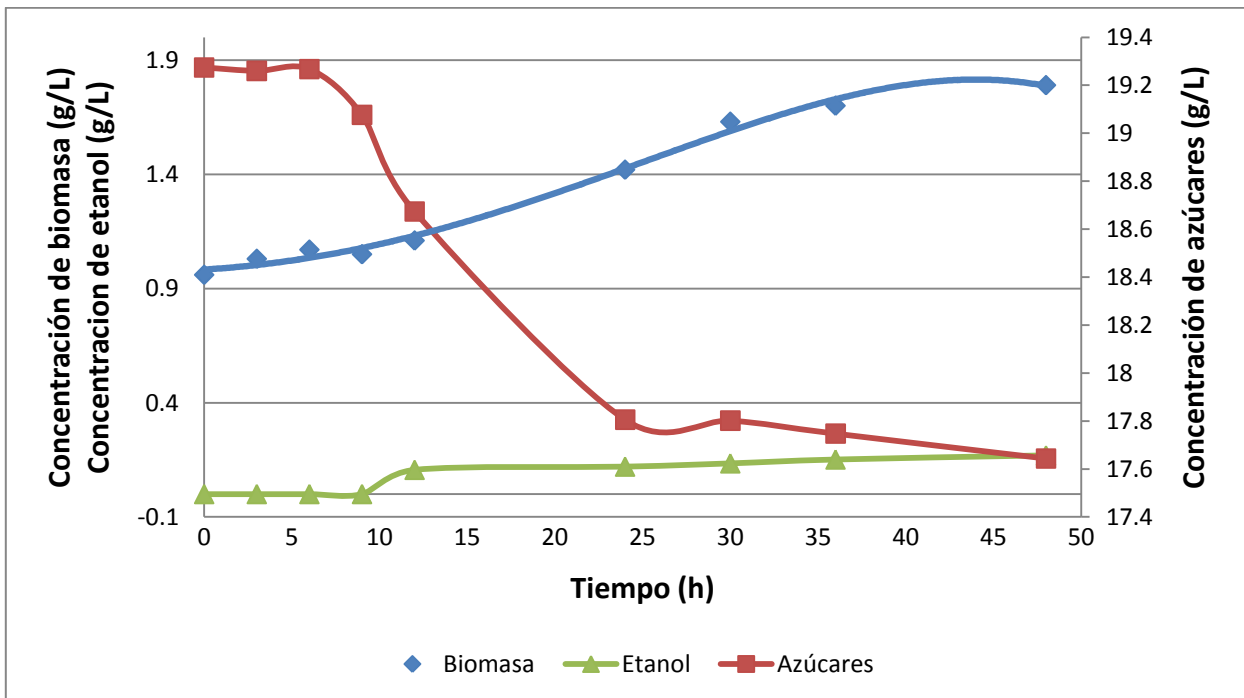


Figura 42. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 40°C y pH 5.

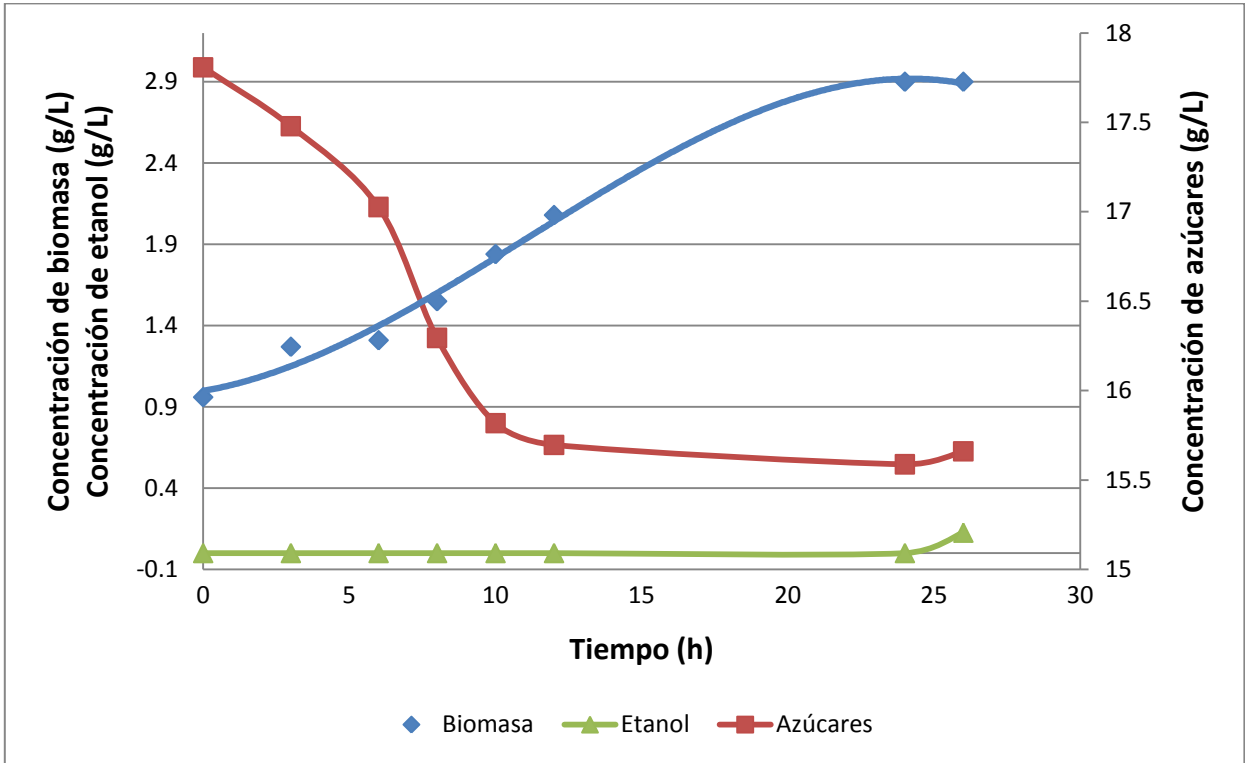


Figura 43. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 40°C y pH 6.8.

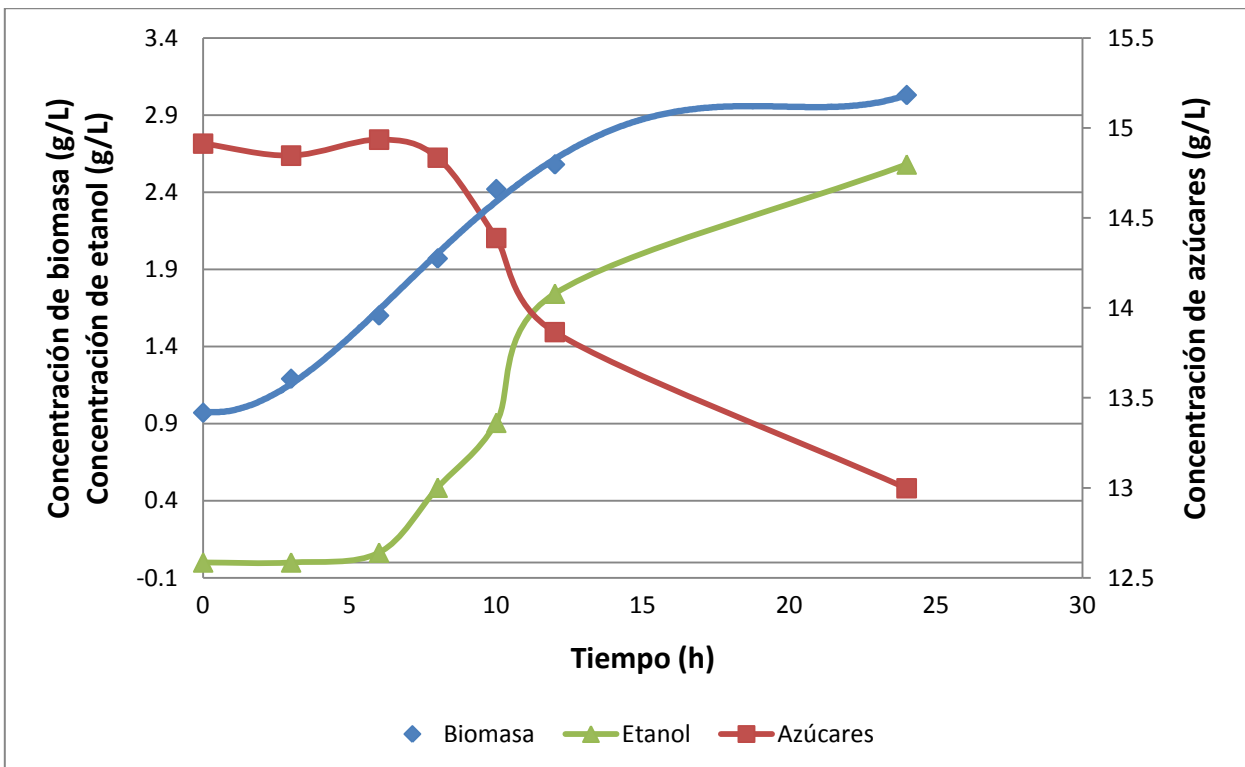


Figura 44. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* a 40°C y pH 8.5.



Tabla 19. Datos linealizados de las cinéticas realizadas a 40°C con *Z. mobilis*.

Tiempo	pH 5	Tiempo	pH 6.8	pH 8.5
0	-0.0408	0	-0.0408	-0.0305
3	0.0296	3	0.2390	0.1740
6	0.0677	6	0.2700	0.4700
9	0.0488	8	0.4383	0.6780
12	0.1044	10	0.6098	0.8838
24	0.3507	12	0.7324	0.9478
30	0.4886	24	1.0647	1.1086
36	0.5306	26	1.0647	

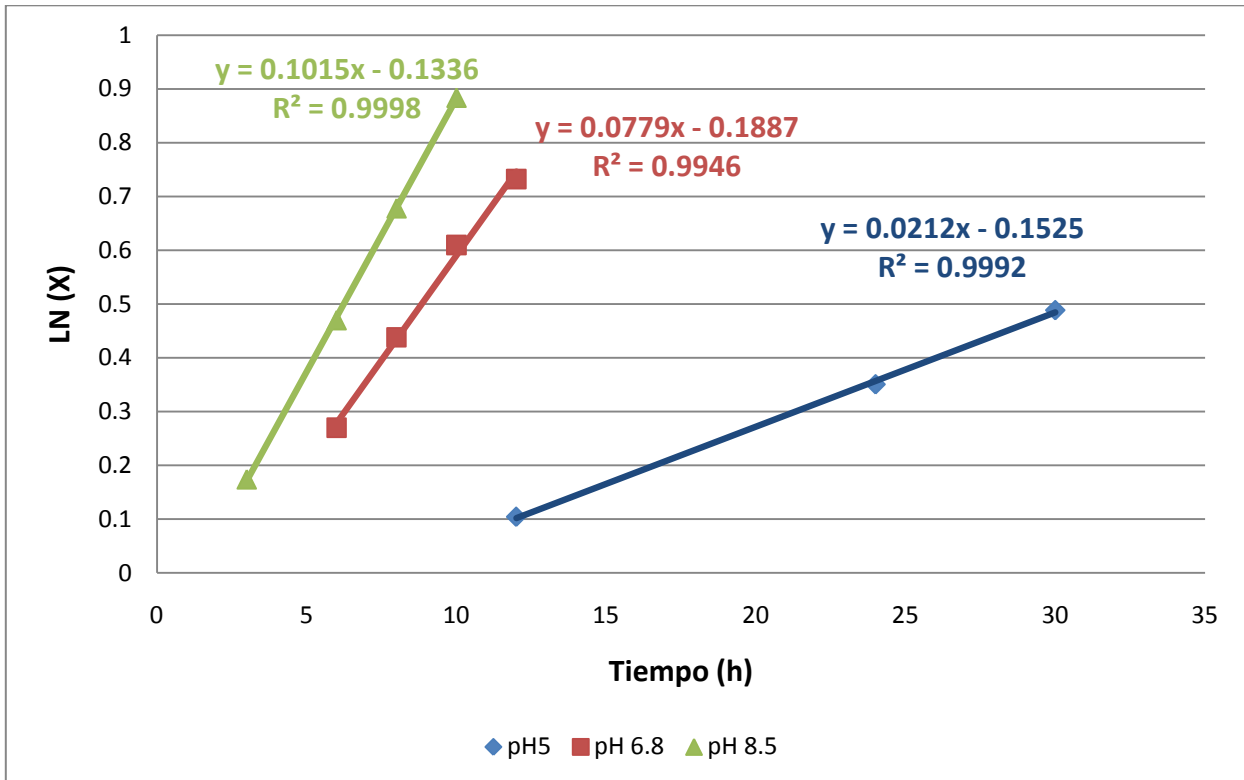


Figura 45. Gráficas de los datos linealizados de la fase exponencial, para la obtención de la velocidad específica de crecimiento de *Z. mobilis* a 40°C.