

087015548

Universidad de Guadalajara

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES BIOLOGIA



**OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE OPERACION
DE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO PARA LA
PRODUCCION DE ALCOHOL EMPLEANDO CELULAS
INMOVILIZADAS DE *Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S P R O F E S I O N A L

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

PRESENTA

MARIA DE LA LUZ NUÑEZ VALLEJO

GUADALAJARA, JAL.,

ENERO DE 1995

Universidad de Guadalajara



Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias División de Ciencias Biológicas y Ambientales Biología

1571/94

C. MARIA DE LA LUZ NUÑEZ VALLEJO

P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE OPERACION DE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO PARA LA PRODUCCION DE ALCOHOL EMPLEANDO CELULAS INMOVILIZADAS DE *Sacharomyces cerevisiae*" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis la M.en C. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil.

C.U.C.B.A.



DIV. DE CS.
BIOLOGICAS Y
AMBIENTALES

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 15 de Diciembre de 1994

EL DIRECTOR

Fernando Alfaro Bustamante
DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

Guillermo Barba Calvillo
BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

C. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES.
DE LA UNIVESIDAD DE GUADALAJARA.
PRESENTE.

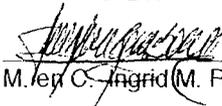
Por este conducto me permito solicitar a Usted se corran los trámites necesarios para el registro de mi anteproyecto de tesis titulado:
OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE OPERACION DE UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO PARA LA PRODUCCION DE ALCOHOL EMPLEANDO CELULAS INMOVILIZADAS DE *Sacharomyces cerevisiae*.

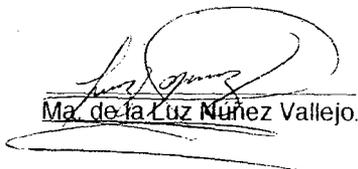
Así mismo pongo a su consideración a la M. C. INGRID RODRIGUEZ BUENFIL como Director de tesis.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más distinguida.

Guadalajara, Jal., a 19 de Septiembre de 1994.

Vo. Bo.


M. en C. Ingrid M. Rodriguez B.


Ma. de la Luz Nuñez Vallejo.

EXCLUSIVO COMISION DE TESIS

SINODALES

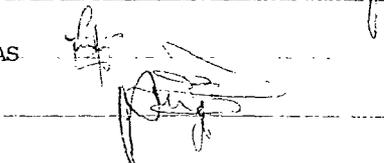
DR. EDUARDO LOPEZ ALCOCER

M.C. LUIS ALFREDO BURGOS RIVAS

Q.F.B. ANGEL PEREZ ZAMORA

FIRMA ENTERADO Y APROBADO





FECHA

11 Nov/94.

19/10/94

19/10/94

**OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE OPERACION DE UN
REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO PARA LA PRODUCCION DE
ALCOHOL EMPLEANDO CELULAS INMOVILIZADAS DE
Saccharomyces cerevisiae.**

Pasante de Biología: María de la Luz Núñez Vallejo.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN
EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y
FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE
BIOTECNOLOGIA.

CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA
EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO
DE JALISCO, A.C.
BAJO LA DIRECCION DE LA M. EN C.
INGRID MAYANIN RODRIGUEZ BUENFIL

AGRADECIMIENTOS

A Dios..

Por ser la Luz que me ilumina el camino y me ayuda a seguir, Gracias señor por permanecer siempre en mi corazón.

A mi papá y hermanos...

Por su amor, confianza y apoyo constante.

A mis tíos Martha y Francisco...

Por su ayuda incondicional brindada en todo el transcurso de mi carrera.

A mi prima Chuy...

Por su ayuda y apoyo constante.

A mis amigos...

Con quienes he vivido lo mejor de la vida, por su amistad y su presencia cuando más los necesite en especial a José Manuel.

A la M.en C.Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil..

Por su amistad, dedicación y apoyo para la elaboración de este trabajo.

Al personal de el laboratorio de Microbiología y Fermentaciones..

En especial al T.Q. Abel Guzmán por su amistad y ayuda brindada a lo largo del presente trabajo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco...

Por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi mamá...

Por todos esos momentos que compartí contigo. por enseñarme a sonreír, a soñar y sobre todo a tener ambiciones en la vida, segura estoy que donde te encuentres estarás colmandome de bendiciones y dandome valor para seguir el camino.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Proceso general de la fabricación de alcohol	3
2.2 Factores que influyen en la fermentación de alcohol	4
2.3 Bioquímica de la fermentación	7
2.4 Problemas que afectan la producción de alcohol	7
2.5 Proceso continuo vs clasico	9
2.6 Inmovilización celular	10
2.7 Bioreactores	14
2.8 Investigaciones realizadas empleando la técnica de inmovilización	17
2.9 Influencia del pH y temperatura en el proceso de fermentación con células inmovilizadas	20
2.10 Metodología de superficie de respuesta	21
III. HIPOTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIAL Y METODOS	24
VI. RESULTADOS	32
VII. DISCUSION	41
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. FIGURAS	51
X. TABLAS	96
XI. ANEXOS	115
XII. BIBLIOGRAFIA	121

RESUMEN

Se optimizaron las variables de pH y temperatura en los medios de fermentación por

medio de la metodología de superficie de respuesta con el fin de obtener altas eficiencias de fermentación, rendimiento así como una elevada productividad, utilizándose una cepa de Saccharomyces cerevisiae proporcionada por el banco de cepas y genes del CIATEJ (BCGC L-024) en forma inmovilizada.

La fermentación se realizó en un reactor de lecho fluidizado empleando medio de melaza a 15°Bx, geles de 2.5 mm de diámetro, flujos de 30 l/h, recirculación del medio por 52 h, pH y temperaturas según el diseño.

La superficie de respuesta encontrada para eficiencia de fermentación correspondió a una meseta de mínimos para la zona de 3.0 - 3.5 de pH y de 36-38°C; obteniendo las más altas eficiencias a un pH de 1.5 - 5.5 y a temperatura de 22 - 28°C.

La superficie de respuesta encontrada para rendimiento correspondió a una meseta de mínimos para la zona de 2.5 - 4.0 de pH y de 35 - 40°C para temperatura; obteniendo los mas altos rendimientos a pH de 1.5 - 5.5 y a una temperatura de 22- 32°C.

La superficie de respuesta encontrada para productividad correspondió a una silla de montar con respuestas mínimas para la zona de 3.5 - 4.5 para pH y de 36 - 38 °C para temperatura; obteniendo las más altas productividades a pH de 2.0 - 5.0 y a temperaturas de 25 - 28°C.

Concluyéndose que la variable que ejerce mayor influencia sobre las respuestas analizadas es la temperatura siendo ésta negativa para las respuestas, a valores de 35 - 40°C, recomendándose 30°C o menos y un pH de 2.5, para obtener altos valores en las respuestas.

I. INTRODUCCION

La producción de alcohol industrial por fermentación es una industria establecida desde hace varios siglos que tuvo su origen en la fermentación natural de los azúcares para la producción de licores y bebidas. Por ello, es una de las fermentaciones más importantes y mejor conocidas hasta nuestros tiempos. (Sturion, 1988).

El proceso clásico de producción empleado es el de lote usando un amplio rango de materias primas; éste ha sido operado exitosamente por cientos, si no miles de años. Compañías individuales han adquirido por siglos la tradición y el arte de sus técnicas de fermentación para la producción de etanol a partir de materias primas tales como melazas y jugo de caña. Un rendimiento de alcohol del 70% con respecto al rendimiento teórico es común, debido a que las fermentaciones son llevadas a cabo de un modo primitivo. Los procesos de fermentación por lote han permanecido virtualmente sin cambios por siglos y únicamente en 1930 se hicieron serios intentos para mejorar los procesos, incluyendo el uso de levaduras recicladas (Guidoboni, 1984), para reducir el crecimiento durante la fermentación (el crecimiento de la levadura representa una pérdida potencial de alcohol).

Actualmente el etanol obtenido por vía fermentativa, como combustible o materia prima química está recibiendo gran atención, debido principalmente al precio del aceite crudo y la sobreproducción de cultivos con alto contenido de azúcares, por ejemplo, caña de azúcar. Así vemos la implementación de programas tales como el Programa Nacional de Alcohol en Brasil, país líder en este aspecto, y el Plan Alconafta de Argentina establecidos desde 1979, los cuales se han empeñado en el aprovechamiento al máximo de estos recursos teniendo como objetivo central reducir el costo total de la producción de etanol.

Consecuentemente, existe gran interés en desarrollar procesos con alta eficiencia, particularmente procesos que empleen procesos de flujo continuo (Abate, y col., 1987). La Biotecnología por lo tanto afronta nuevos retos, ajustar las tecnologías convencionales de producción de alcohol, así como desarrollar sistemas de fermentación con alta eficiencia, inclinándose actualmente a procesos que empleen reactores de flujo continuo.

Además, el descubrimiento del potencial enorme de los microorganismos en la industria química ha favorecido estos hechos, por lo que la modernización de la tecnología de fermentación se desarrolla al 100% con los avances en genética molecular. Por otra parte, la alternativa de limitar la acción de microorganismos a un estado inmovilizado ha atraído el interés de numerosos investigadores, pues la posibilidad de utilizarlos con mayor eficiencia y de operar sistemas continuos ofrece ventajas no sólo económicas, sino también de simplificación de procesos. El utilizar sistemas con células inmovilizadas ofrece la posibilidad de alcanzar altas productividades de etanol y utilización eficiente del sustrato debido a que pueden ser manejados a altas velocidades de operación mientras se mantenga una alta concentración celular dentro del reactor.

De acuerdo con Abbot (1978), cualquier sistema en el cual las células estén inmovilizadas dentro de un reactor y permita su reuso económico es definido como un sistema con células inmovilizadas. Varias técnicas para la inmovilización de células, incluyendo la floculación, han sido empleadas en la producción de etanol usando diferentes clases de microorganismos, sustratos y configuraciones de biorreactores. Los resultados muestran marcadas variaciones pero usualmente la productividad de etanol fue más alta que la obtenida utilizando sistemas por lote.

Así pues, la fermentación con células inmovilizadas a nivel industrial está actualmente en fase de desarrollo, existiendo en el mundo un número reducido de aplicaciones que operan con esta tecnología. Por ejemplo, las células inmovilizadas están empezando a usarse para la producción de aminoácidos (Chibata, Tosa, y Takamatsu, 1987), tratamiento de efluentes (Klein, y Ziehr, 1990), producción de ácidos orgánicos (Chibata, I., 1986 y Yang, Wang, Wei., 1992) así como en la industria de alcohol y bebidas alcohólicas (Norton y D'amore, 1994). Uno de los adelantos más importantes realizados en los últimos 5 años ha sido enfocado hacia el entendimiento de los efectos de la inmovilización en levaduras, ya que dicha inmovilización podría inducir cambios en el medio ambiente de la célula ya sea por cambios en el pH y temperatura, así como en la concentración del sustrato, entre otros, ocasionando grandes pérdidas durante el proceso de fermentación. De aquí que este trabajo se centre en el estudio de organismos inmovilizados, específicamente en la optimización de condiciones como pH y temperatura para lograr un mayor rendimiento en la producción continua de etanol, como primera etapa para el desarrollo de esta tecnología y una futura aplicación a nivel industrial, adaptado a las condiciones y características de operación con que se trabaja actualmente en el país.

II. ANTECEDENTES

2.1 PROCESO GENERAL DE FABRICACION DE ALCOHOL

El proceso general de fabricación de etanol en los ingenios se muestra en la figura No. 1 en donde el sistema de fermentación empleado es el sistema clásico por lote.

Inicialmente, se prepara el mosto ajustando las melazas por dilución con agua a la concentración de azúcar deseada. Posteriormente, se agregan los nutrientes para la levadura, los cuales son básicamente nitrógeno y fósforo. Aunque las melazas contienen de ordinario la mayor parte de las sustancias nutritivas que se requieren para las fermentaciones, es conveniente añadir estos elementos al mosto de fermentación en forma de fosfato y sulfato amónico (Kirk Othmer, 1981; Prescott y Dunn, 1986).

A continuación se hace un ajuste adecuado del pH del mosto, siendo éste indispensable para que la fermentación se efectúe satisfactoriamente. Por lo común, se usa el ácido sulfúrico, aunque también es eficaz el ácido láctico. En el transcurso de la fermentación suele ser añadido un agente antiespumoso, oxígeno si es requerido y un sistema ácido-base que controle el pH (Crueger y Crueger, 1984).

En un sistema de fermentación con células libres, el paso a seguir es la inoculación del mosto por medio de una levadura iniciadora en el tanque de fermentación, en donde la actividad fermentativa comienza rápidamente con desprendimiento de grandes cantidades de bióxido de carbono. El tiempo que se necesita para efectuar toda la fermentación es de 36 a 50 hrs ó mas, lo que depende de la temperatura, la concentración de azúcares y otros factores.

En un sistema de fermentación con células inmovilizadas, las levaduras se someten a la técnica de inmovilización que se desee (en este caso se utilizó el atrapamiento en gel de alginato de calcio), las cuales finalmente actuarán como levaduras iniciadoras de la fermentación alcohólica, haciéndose pasar el mosto a través del reactor que las contenga, dentro del cual se realiza la transformación de azúcares, saliendo posteriormente el mosto fermentado.

Existen básicamente dos sistemas de fermentación, el conocido tradicionalmente, como clásico o por lote y el continuo. Es importante señalar que existen varios sistemas de fermentación continua muy distintos, con un grado de desarrollo tecnológico significativo; cualquiera que sea el sistema elegido, se obtendrán finalmente las melazas fermentadas, las cuales se destilan posteriormente en un alambique continuo para separar el alcohol y otros componentes volátiles. El alcohol se purifica en columnas de rectificación se almacena o se desnaturaliza. (Kirk-Othmer, 1981; Prescott y Dunn, 1976).

2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACION DE ALCOHOL

1.- MATERIAS PRIMAS.- Las materias primas de interés para la producción de alcohol, pueden ser agrupados en:

- a) Materias Primas Azucaradas, que contienen una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa, como el jugo de caña, las mieles y la melaza.
- b) Materias Primas Celulósicas como el bagazo, las maderas, los restos de plantas y los cultivos y, los licores sulfíticos de la producción de pulpa de papel.
- c) Materias Primas ricas en Almidón como la yuca, la papa y el maíz. (Prescott y Dunn, 1976).

Los procesos empleados en la fabricación de etanol por fermentación dependen de la naturaleza de la materia prima. Las materias sacaroideas requieren por lo general poco o ningún tratamiento preliminar además de la dilución; pero las materias amiláceas o celulósicas deben ser hidrolizadas a azúcares fermentescibles antes que actúen sobre ellas las levaduras.

El bajo precio, el rendimiento elevado, la comodidad de la manipulación, la posibilidad de obtener un suministro continuo durante todo el año, la proximidad del mercado y la pureza, son los principales factores que intervienen en la selección de la materia prima (Correa., 1978).

2.- CONCENTRACION OPTIMA DE AZUCARES.- Las ventajas de una alta concentración de azúcares en el mosto incluyen la supresión de contaminantes osmosensitivos y el potencial de los costos de destilación reducidos si la inhibición del etanol puede ser limitada. Las altas concentraciones en el sustrato son sin embargo, inhibitorias para la fermentación. Este efecto está relacionado en parte con el fenómeno osmótico, en el que la plasmólisis de las levaduras ocurre a concentraciones de azúcar por arriba del 14% (w/v), sin embargo ésto también es dependiente de la cepa. (Jones, y col., 1981)

Por otra parte, el alcohol producido por una alta concentración de azúcares puede inhibir la acción de la levadura y, en consecuencia, se prolonga el tiempo de fermentación y puede no transformarse parte del azúcar. Por el contrario el empleo de concentraciones demasiado bajas no resulta económico ya que origina una pérdida de espacio de fermentación y un aumento en los gastos de obtención de una misma cantidad de alcohol en la destilación posterior. Suele ser satisfactoria una concentración del 12% (Prescott y Dunn, 1976).

3.- pH OPTIMO.- El valor del pH elegido depende de la especie del microorganismo usado, de la reacción deseada y de las condiciones del proceso. La concentración de iones hidrógeno es un factor significativo en la fermentación industrial, debido tanto a la importancia del control de la contaminación bacteriana como a su efecto en el crecimiento de la levadura, tipos de fermentación y formación de subproductos.

La fermentación con células libres se efectúa satisfactoriamente cuando se ajusta el pH del mosto entre 4.0 y 5.0. Este pH es favorable a la levadura y bastante bajo para inhibir la multiplicación de muchas bacterias. Este es uno de los factores determinantes para suprimir la esterilización, que no es factible en grandes cantidades de melaza.

Los límites absolutos para el crecimiento de la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* han sido reportados entre 2.4 y 8.6 con un valor óptimo de 4.5. El pH interno de *S. cerevisiae* es independiente del valor del pH externo, variando desde 3.0 hasta 7.0, estando controlado a un valor de pH entre 5.8 y 6.3. (Jones, y col. 1981).

4.- TEMPERATURA.- La temperatura inicial óptima depende de factores análogos a los que controlan el pH. Aunque la mayoría de los microorganismos toleran intervalos de temperatura amplios, existen intervalos óptimos tanto para su crecimiento como para la actividad enzimática. La temperatura óptima para el crecimiento de *S. cerevisiae* libre es de 30°C.

El crecimiento cercano a la temperatura máxima causa una desestabilización de la membrana plasmática y un rápido decremento de la viabilidad de la levadura. La exposición de las levaduras a una temperatura de 55°C por 5 minutos causa la muerte. La temperatura óptima específica para la fermentación por cepas de *S. cerevisiae* excede en 5 a 10°C a la temperatura óptima para su crecimiento, siendo más adecuado a 35°C. La naturaleza exotérmica de la fermentación de azúcar (149.5 cal/g de sacarosa ó 140.2 cal/g de glucosa consumida) requiere que los grandes fermentadores industriales sean también (pero no siempre) enfriados. La elección de la temperatura de operación está influenciada por factores fisiológicos así como por problemas puramente físicos como pérdida de etanol por evaporación y formación de espuma a elevadas temperaturas. (Jones, Pamment, y Greenfield., 1981).

5.-ADICION DE SUSTANCIAS NUTRITIVAS.- El diseño adecuado de los medios de cultivo requiere de un completo entendimiento de la nutrición de los organismos, y para optimizar su crecimiento y actividad metabólica. El crecimiento de los microorganismos requiere nutrientes para el aumento de la masa celular y para asegurar el aporte energético necesario. Aunque cada microorganismo tenga requerimientos específicos, un medio de cultivo balanceado debe incluir una combinación de fuentes de carbono y nitrógeno, fósforo, azufre, elementos traza, vitaminas y promotores del crecimiento. (Pellón., 1986).

Los mayores requerimientos son para los principales componentes de la célula - carbono, hidrógeno, oxígeno- que son suministrados generalmente en las melazas y el nitrógeno que se agrega en forma de amonio, particularmente sulfato de amonio. Menores cantidades son requeridos para componentes secundarios de la célula como el fósforo, suministrado como ácido fosfórico ó fosfato de potasio o amonio; el azufre como sulfato de amonio, aunque algunas veces aparezca como sulfuro o sulfhidrilo; magnesio, potasio y sodio, en forma de sales de sulfato o fosfato. La adición de vitaminas, elementos traza y promotores del crecimiento pueden ser añadidos simultáneamente, utilizando extracto de levadura, el cual satisface todos los requerimientos. (Pellón, 1981; Jones, y col.,1984; Bravo, & González,1991).

6.- INHIBICION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.- Es importante que durante la fermentación los microorganismos contaminantes estén bajo estricto control, pues podrían influir en la productividad y ocasionar fuertes pérdidas. Se han empleado con éxito antisépticos para proteger a los principales microorganismos contra infecciones, que les disputan los nutrientes, de esta forma el empleo de productos químicos ha sustituido enormemente la esterilización que resulta costosa e impracticable cuando se trata de grandes cantidades de melaza.

Sustancias tales como el ácido sulfúrico, compuestos de flúor, ácido láctico, etc., se han empleado satisfactoriamente, adaptándose las levaduras a pequeñas cantidades de éstas, después de varias generaciones, en donde una vez adaptadas pueden propagarse y realizar fermentaciones sin ninguna interferencia.

7.- ELECCION DEL MICROORGANISMO APROPIADO.- El hacer una adecuada selección de cepas para llevar a cabo procesos biotecnológicos con una alta eficiencia es muy importante. La aplicación de las técnicas de la ingeniería genética permite obtener cepas con mejores propiedades en cuanto a diversos aspectos, como tipo de sustrato, temperatura, pH, resistencia a altas concentraciones de productos y velocidad de fermentación (Mansur., Suárez, y col., 1990)

Entre las características indispensables requeridas en los microorganismos están:

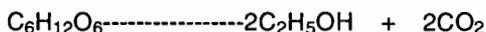
a) ser enzimáticamente estables y realizar el cambio bioquímico necesario en poco tiempo; b) producir el máximo rendimiento posible con un mínimo de atención; c) capacidad de conservación de su actividad de una generación a otra; d) resistente al ataque de otros microorganismos contaminantes; e) alta tolerancia al alcohol y, f) viabilidad en un rango amplio de temperatura.

2.3 BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION

Entre las diversas clases de fermentación de la glucosa encontramos la fermentación alcohólica que se desarrolla anaeróbicamente, mediante la cual los organismos obtienen energía química de varios combustibles orgánicos en ausencia de oxígeno molecular.

Los combustibles más comunes para la fermentación son los azúcares, particularmente la D-glucosa, aunque también pueden emplearse los ácidos grasos, los aminoácidos, las purinas o las pirimidinas según la especie de microorganismos a emplear (Lehninger A.L., 1985).

La conversión total de glucosa a etanol por levaduras puede ser representada estequiométricamente como:



En esta reacción intervienen varias reacciones intermediarias, las cuales son de cuatro tipos: las reacciones fosforilantes-desfosforilantes, las de oxidación-reducción, las reversibles y las descarboxilantes. Todas ellas catalizadas por enzimas muy específicas.

Durante la fermentación son producidas grandes cantidades de glicerol y alcoholes superiores, estas cantidades dependen de la levadura empleada y de las condiciones de fermentación. De la reacción anterior se puede deducir que un rendimiento teórico (según Gay-Lussac) de 51.1gr de etanol puede ser obtenido de la fermentación de 100gr de glucosa. Rendimientos industriales del 90-95% de este valor son comunes, en donde la pérdida puede atribuirse al crecimiento de la levadura y la formación de subproductos (Jones, y Greenfield., 1981).

La vía principal de la fermentación de los azúcares que se muestra en la figura No.2 presenta el proceso de fermentación alcohólica y está basada en los trabajos de investigación de Embden-Meyerhof -Parnás (Lehninger, A.L., 1985).

2.4 PROBLEMAS QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE ALCOHOL

La producción industrial de alcohol por fermentación solamente es útil si ésta origina productos a precios competitivos. Sin embargo actualmente los ingenios, así como muchas otras industrias productoras de bebidas alcohólicas por fermentación, se enfrentan a diferentes problemas que afectan su producción, entre ellos encontramos:

- 1.-Materia prima de baja calidad
- 2.-Formulación inadecuada del medio de crecimiento y fermentación
- 3.-Empleo de una cepa microbiana con bajos rendimientos y poca tolerancia al etanol
- 4.-Esquema de fermentación inadecuado
- 5.-Personal sin entrenamiento técnico y pocos conocimientos básicos sobre el proceso que se maneja
- 6.-Destilación tardía y usos de sistemas obsoletos
- 7.-El almacenamiento inadecuado del producto

Por lo general, la combinación de más de un factor ocasiona dificultades aún más serias para la solución de tales problemas, generando pérdidas cuantiosas para estas industrias (Rodríguez, B., 1990).

Las constantes investigaciones (Nuñez y Lema, 1987) para enfrentar estos problemas tienen como objetivos centrales lograr:

- a) Alta producción de etanol, por el completo aprovechamiento de la materia prima, la cual absorbe 2/3 de los costos totales.
- b) Alta productividad, así como la reducción de los costos fijos.
- c) Alta concentración de etanol, lo cual contribuye a,
- d) Reducir el costo de utilidades.

A pesar de que la productividad potencial de la fermentación alcohólica es alrededor de 200 g/lh los procesos convencionales en realidad tienen productividades de sólo alrededor de 5 g/lh. Los dos factores principales responsables de estas diferencias son:

A.- La reacción es inhibida por el producto, cuya concentración por lo tanto, debería ser baja y

B.- La dificultad de mantener la catálisis de células viable dentro del reactor.

Las soluciones que se han propuesto (Nuñez y Lema, 1987) para mejorar la productividad de alcohol por fermentación son:

- 1.- Mediante la disminución del efecto inhibitorio del producto
- 2.- Mediante el incremento de la concentración de células (tabla No. 2).

2.5 PROCESO CONTINUO VS. CLASICO

La producción pobre de alcohol en un sistema de fermentación es más frecuentemente el resultado de problemas biológicos que de problemas mecánicos en el proceso. No obstante, la mejoría en el diseño y desarrollo de sistemas de fermentación, inclinándose mayormente por el sistema continuo, actualmente, ha resultado en procesos microbiológicos más eficientes (Gil, y col., 1991).

Se están conduciendo muchas investigaciones hacia el desarrollo de sistemas de fermentación continuos, ya que la producción de etanol por procesos convencionales en lote no es eficiente económicamente, debido a que requiere grandes volúmenes de fermentación que redundan en el costo de capital y costos de operación (Loung, y Tseng., 1984).

La filosofía del diseño de procesos químicos y técnicos usados para la operación continua fueron aplicados al proceso de operación tradicional por lote y se reconoció que el proceso de fermentación continua puede ofrecer ventajas como:

- 1.- Reducción substancial del costo capital a través de mejorar la eficiencia volumétrica.
- 2.- Facilidad de control operacional con las condiciones de fermentación estacionarias.
- 3.- Aumentar el rendimiento por operación continua bajo condiciones de fermentación automatizadas.
- 4.- Ausencia de alzas o picos de demanda en el consumo.
- 5.- Composición uniforme y constante de los productos de fermentación, resultando mejores en la operación de destilación y columnas de rectificación.
- 6.- Resistencia inherente a infecciones por microorganismos contaminantes debido a que la mayoría de los tanques de fermentación continua operan con altas concentraciones de etanol y bajo azúcar residual hasta que finaliza la corrida. Esto está en contraste con el modelo tradicional, donde al inicio de la fermentación el contenido de azúcares está al máximo y la concentración de alcohol en cero, condiciones de crecimiento ideales para la mayoría de los microorganismos contaminantes.

Estas ventajas han estimulado considerablemente la investigación y desarrollo de trabajos en los campos académico e industrial con un marcado énfasis en el mejoramiento de la eficiencia volumétrica (Guidoboni., 1984).

Por otro lado, los sistemas clásicos o por lote muestran las siguientes desventajas:

- 1.-No hay recuperación de las levaduras.
- 2.-Agotamiento de uno o varios nutrientes.
- 3.-Acumulación de productos tóxicos.
- 4.-Ciclos de fermentación muy largos .

- 5.-Menor eficiencia por el aumento en el crecimiento celular.
- 6.-Mayor inversión de capital fijo.
- 7.-Mayores gastos de operación pues no se puede automatizar.
- 8.-Mayor consumo de energía en la destilación, entre otros.(Abbott,Bernard J., 1978).

2.6 INMOVILIZACION CELULAR

La inmovilización celular data de 1820 usada por Schutzenbatch para la obtención rápida de vinagre. Cuando las primeras inmovilizaciones comenzaron a ser estudiadas en los 60's el esfuerzo fue dirigido principalmente hacia la inmovilización de enzimas, sin embargo su uso fue limitado a reacciones simples que no involucran cofactores, cuya recuperación de residuos es muy difícil. Como resultado de ésto se incrementó el interés a principio de los 70's por la inmovilización de células enteras, las cuales pueden catalizar múltiples reacciones, involucrando una serie completa de enzimas diferentes (Nuñez y Lema., 1987).

La inmovilización de microorganismos puede ser definida como una técnica que limita la libre migración de las células. La movilidad celular puede ser restringida por agregación de las células ó por confinamiento de ellas dentro de ó por adhesión a un soporte sólido (Scott, 1987).

El principal objetivo de la inmovilización de un agente biológico activo está en concentrar su actividad a un volumen tan pequeño como sea posible. Las células son confinadas o inmovilizadas en soportes particulares, al mismo tiempo que retienen o mantienen su actividad microbiana alta y/o viabilidad.

Roseveard ha definido estas técnicas como "Un proceso en el que se confina una enzima activa catalíticamente, o células completas, en el interior de un reactor y previene su entrada de la fase móvil transportando el sustrato y el producto. La manera en que es llevado a cabo el confinamiento, diferencia los variados métodos de inmovilización (Nuñez, y Lema., 1987).

Algunas ventajas potenciales que revelan el por qué las investigaciones en la tecnología de células inmovilizadas se ha expandido rápidamente se muestran a continuación. Aunque las ventajas específicas dependen del método de inmovilización empleado y de las características de los procesos usados para la comparación.

Entre las principales ventajas están: la reutilización o reciclamiento de los microorganismos, lo cual proporciona un recurso para hacer un proceso en lote continuo y mantener una alta población celular, y con esto lograr una velocidad de reacción rápida. Los procesos con células inmovilizadas pueden ser operados usando células que no se están multiplicando, lo cual puede ser ventajoso para la producción de algunos productos celulares. En la fig.No.3 se muestran los diferentes estados en que pueden estar las células para su inmovilización.

Además, esta técnica facilita el uso de densas poblaciones microbianas mediante la alteración de las propiedades reológicas del medio suspendido. Puesto que la viscosidad del fluido es más baja que cuando las células están suspendidas libremente, ésta contribuye a mejorar el mezclado y las propiedades de transferencia de masas en el reactor.

Comparada con las enzimas inmovilizadas, las células inmovilizadas tienen la ventaja de no requerir enzimas aisladas o procesos de purificación, catalizando una serie de reacciones secuenciales de multienzimas. Además la regeneración de cofactores puede ocurrir dentro de las células y evitar los sistemas de regeneración de cofactores especiales que los enzimas pueden requerir.

Puesto que la inmovilización de células no es una panacea, deben ser consideradas las desventajas potenciales asociadas con su uso en esta tecnología, que a continuación se mencionarán:

Las células contienen numerosas enzimas activas catalíticamente. En algunos procesos, estas enzimas pueden catalizar reacciones colaterales no deseadas, por otro lado también puede resultar en una pérdida de alguna actividad catalíticamente deseable. Estas pérdidas pueden ser debidas a la inactivación de la enzima durante la inmovilización o a las barreras difusionales que impiden el acceso del sustrato a los microorganismos. Como barreras difusionales podemos encontrar: a) la misma membrana celular y en algunos procesos debería ser destruida para llevar a cabo altas velocidades de reacción; b) la capa de agua en reposo (capa de Nernsts) que rodea las partículas; c) las células adyacentes a la película no pueden tener acceso a los sustratos, a menos que las células estén adheridas a las partículas como una monocapa; d) en masas de células o "pellets" las células fundamentales pueden precisamente funcionar como un soporte matriz para las células externas y no participar catalíticamente en la reacción.

La adsorción de nutrientes en una matriz sólida puede proporcionar células adheridas a la matriz para catalizar reacciones más rápidas. Sin embargo la adsorción de los productos de reacción al soporte puede reducir precisamente la productividad si el microorganismo es sensible a la inhibición del producto. Otros compuestos tóxicos que son producto de la reacción también pueden acumularse y disminuir la productividad. Si la matriz y el sustrato tienen la misma carga neta, la repulsión electrostática podría limitar el acceso del sustrato a las células en la superficie de las partículas.

Las células inmovilizadas como película o masa no son retenidas permanentemente en su estado inmovilizado. Las pérdidas de biomasa ocurren por desprendimiento y fricción mecánica. Para la mayoría de propósitos prácticos la inmovilización permanente puede ser realizada por atrapamiento de células en matrices poliméricas (Abbott, B. J.1977).

A continuación se muestra un resumen de las ventajas y desventajas del uso de células inmovilizadas con respecto a las células libres:

Ventajas:

- 1.- Elevada densidad celular.
- 2.- Posibilidad de operar a altas velocidades de flujo.
- 3.- Menor contaminación microbiana a altas velocidades de flujo.
- 4.- Productos fácilmente purificados.
- 5.- Por lo tanto, los bioprocesos pueden ser operados eficiente y económicamente.

Desventajas:

- 1.- Necesidad de asegurar la difusión del sustrato y los productos.
- 2.- Posibles cambios metabólicos.
- 3.- Costos de inmovilización, dependiendo de la técnica utilizada.

2.6.1 Métodos de Inmovilización

La inmovilización de bacterias o levaduras para la producción de etanol es realizada principalmente por: Adsorción y Atrapamiento (Nuñez, y Lema., 1987). La figura 4 muestra estos tipos de inmovilización.

2.6.2 Técnica de atrapamiento

Todos los métodos de atrapamiento se basan en la oclusión de una célula dentro de una estructura lo suficientemente compacta para prevenir la difusión de su contenido al medio circundante pero sí permitir la penetración del sustrato. Es más popular que la adsorción porque las pérdidas de células son reducidas, logrando con ésto altas concentraciones de células. Algunas de las ventajas de este método son:

- a). Las células pueden ser contenidas sin una modificación química o enlace que pueda conducir a la pérdida de actividad.
- b) Sistemas enzimáticos pueden ser manejados fácilmente ya que el atrapamiento es esencialmente el método que las células vivientes usan para retener sus sistemas enzimáticos.
- c). Además el atrapamiento no tiene una dependencia significativa con las propiedades celulares.

Sin embargo, el atrapamiento presenta algunas desventajas, entre ellas: puede originarse una pérdida de células por fuga de la misma, hay limitaciones de transferencia de masa, los problemas de difusión ponen algunas restricciones en el diseño de reactores (Nuñez y Lema., 1987).

Todos los anteriores métodos emplean alguna forma de soporte, así es como una gran variedad de matrices han sido probadas, y, de estos estudios se han establecido las propiedades que un buen acarreador o soporte debe poseer, entre estas propiedades encontramos las siguientes:

1.-Requerimientos para llevar a cabo la inmovilización:

- a) Debe ser posible el control del tamaño y porosidad del medio atrapante, especialmente en reactores a escala industrial.
- b) Los agentes atrapantes forman una matriz estable en medio acuoso a temperatura y pH compatible con el bienestar de los microorganismos que son atrapados.
- c) Todos los soportes deben ser baratos y fácilmente aprovechables y el costo de los procesos de inmovilización deben ser tan bajos como sean posibles.

2.-Requerimientos para la producción:

- a) Todos los acarreadores deben poseer ambas características:
 - Estabilidad mecánica, resistir largos períodos en el reactor donde se usarán.
 - Estabilidad química en presencia de otros componentes del sustrato.
- b) Todos los acarreadores deben ser inertes para los microorganismos empleados.
- c) El medio atrapante debe permitir la libre difusión del sustrato, productos y otros metabolitos, y los dos últimos especialmente puesto que ellos podrían inhibir la reacción.
- d) Todos los soportes deben tener una capacidad de acarreamiento celular tan alta como sea posible, especialmente cuando las células en la fase de crecimiento están siendo usadas.

2.6.3 Técnica de inmovilización de levaduras por atrapamiento en alginato de calcio

La técnica de inmovilización de células microbianas por atrapamiento en gel de alginato de calcio fue introducida por Hackel y colaboradores, desde entonces ha sido ampliamente descrita (Johansen, y Flink., 1985). Las Fig. 5 y 6 muestran el esquema del procedimiento de inmovilización celular.

La técnica de atrapamiento es simple. Una suspensión de células es mezclada con una solución de ácido algínico, cuya concentración está usualmente entre 1 - 4 % para asegurar un fortalecimiento de gel razonable, mientras que al mismo tiempo se mantiene la viscosidad lo suficientemente baja a la temperatura de operación deseable fisiológicamente. La mezcla es entonces goteada dentro de una solución endurecedora para formar burbujas de células cuyo principal diámetro depende del tamaño del orificio a través del cual es pasada la mezcla. Este principio es independiente de si la operación es llevada a cabo manual o mecánicamente. Las partículas así formadas pueden ser mantenidas en solución endurecedora por un tiempo ó transferidos a un sustrato, dependiendo de su aplicación (Nuñez, y Lema., 1987).

Se eligió el gel de alginato de calcio, pues presenta importantes propiedades físicas, químicas y biológicas acordes con los objetivos propuestos para la inmovilización celular para la producción de etanol. Entre dichas propiedades encontramos:

- 1.- Alta afinidad por el agua
- 2.- Carece de toxicidad
- 3.- Capacidad para formar geles rápidamente en presencia de iones calcio
- 4.- Son cadenas lineales de fracciones enlazadas de (1-4) β -D- ácido manurónico y ácido δ -L-gulurónico. De su peso molecular dependen propiedades tales como: Rigidez mecánica y Características de engrosamiento y encogimiento.
- 5.- Permite una alta actividad celular
- 6.- Productividad de 40 mg de alcohol/g de gel h
- 7.- Soluble en solución alcalina
- 8.- La fuerza del gel es constante entre pH 3 y 9
- 9.- Bajo costo.

2.7 BIORREACTORES

Recientemente se ha mostrado un interés considerable en el estudio y análisis de reactores para células inmovilizadas. Uno de los mayores usos de dichos reactores es la producción de etanol a partir de carbohidratos (Camberbach, y col., 1986). La sobreproductividad de un proceso con biopartículas inmovilizadas y por consiguiente la factibilidad de su uso industrial, depende en gran medida de la elección del sistema reactor, en el caso de la producción de alcohol por fermentación, un estudio reciente ha concluido que el reemplazo de los procesos en lote por sistemas continuos con células inmovilizadas puede resultar en la reducción del 50 y 75 % en los costos de producción e inversión, respectivamente.

Los reactores para células inmovilizadas pueden ser clasificados de acuerdo a sus aplicaciones en tres categorías:

- 1.- Reactores de bioconversión, los cuales generalmente usan células muertas ó células viables sin crecimiento.
- 2.- Reactores para la obtención de productos que no están asociados con el crecimiento celular.
- 3.- Reactores para la producción de metabolitos primarios o asociados al crecimiento celular.

La producción de alcohol por fermentación pertenece a la tercera categoría (Nuñez, y Lema., 1987).

La productividad de los reactores con células inmovilizadas varía con un número de parámetros incluyendo flujo, cantidad y velocidad de crecimiento de las levaduras, tamaño de la burbuja y tipo de medio. La variación de estos parámetros tiene un efecto pronunciado en la velocidad de reacción (Chien, y Sofer., 1985).

Para el diseño de fermentadores se debe considerar la necesidad de mantener la actividad de los microorganismos, debe ser asegurado el grado necesario de crecimiento celular, éste último por medio de un adecuado suministro de nutrientes y de oxígeno.

Los principales problemas de los bioreactores con sistema continuo, que son los preferentemente usados para células inmobilizadas, son: asegurar la adecuada difusión del sustrato y oxígeno a través de la matriz y lograr una adecuada difusión de CO₂, etanol y otros metabolitos fuera de la matriz. Una pobre difusión puede limitar severamente la productividad de un bioreactor, ésta puede deberse: a) la velocidad de flujo en el reactor, b) la difusión a través del gel empleado y c) el tamaño de las partículas conteniendo las células.

Además existen otros factores que también deben ser considerados como inhibición por los productos, costos, entre otros (Nuñez, y Lema., 1987).

La mayoría de bioreactores que están siendo estudiados actualmente para células inmobilizadas son sistemas de columnas continuas, tales como sistemas de lecho fluidizado o de lecho empacado. De hecho tales sistemas exigen que los organismos sean inmobilizados para evitar que sean arrastrados a velocidades de flujo relativamente altas que son los que se manejan (Scott, C. D., 1987). También existe otro tipo de reactores que son los bioreactores de membrana.

2.7.1 Biorreactores de lecho empacado

En éstos se emplea una técnica que consiste en empacar partículas conteniendo células dentro de un tanque cilíndrico con una relación L/D alta y que opera a velocidades de flujo que aseguran una alta velocidad de conversión. Este sistema es apropiado cuando los tiempos de retención son relativamente largos y la biomasa externa es mínima. Aquí ha habido algunas innovaciones en el diseño y operación de dichos reactores, incluyendo el diseño de un lecho empacado horizontal, un sistema seco o de fase gaseosa, y columnas múltiples en secuencia. Sin embargo estos sistemas enfrentan varias limitaciones en la práctica. (Nuñez, y Scott., 1987).

2.7.2 Biorreactores de membrana

Los biorreactores que utilizan membranas para la retención de células son usados por un pequeño número de investigadores. La mayoría del trabajo en esta área es llevado a cabo en reactores con fibras huecas, pero otros sistemas de membranas tales como la ultrafiltración de células son también usados. La mayoría de las aplicaciones son para sistemas celulares que tienen velocidades de crecimiento relativamente bajas puesto que un incremento significativo en la biomasa inmobilizada podría resultar en la ruptura de la membrana.

Este fenómeno probablemente continuará restringiendo el uso general de este reactor (Scott, C. D., 1987).

2.7.3 Biorreactores de lecho fluidizado

En este tipo de reactores las burbujas de gel son mantenidas en suspensión por el flujo del alimento y el gas desprendido o las burbujas de gas en el reactor. Los principales tipos son:

- a) Reactores con lecho expandido
- b) Reactores con lecho circulando
- c) Reactores con lecho empacado

El más común es el primero y enfocaremos nuestra atención en éste pues fue el empleado en este trabajo.

Los fermentadores con lecho expandido tienen dos ventajas importantes sobre otros CSTRs: Su aproximación al flujo tapón y la mayor facilidad con la cual la biomasa es retenida en el reactor.

Sus ventajas sobre los reactores de lecho empacado consisten en la facilidad con la cual los gases pueden ser suministrados o extraídos, la simple eliminación de la biomasa suelta y la posibilidad de procesar sustratos con sólidos en suspensión. Puesto que no se corre el riesgo de atascamiento o la formación de vías de flujo preferenciales, las burbujas pueden ser mucho menores que las burbujas empacadas, las cuales junto con las altas velocidades de flujo en la superficie, reducen grandemente los problemas de transferencia de masas. Por esta razón, la productividad de los reactores de lecho fluidizado puede ser substancialmente mayor que aquellos reactores de lecho empacado al mismo tiempo que se mantiene una densidad celular relativamente baja.

El buen funcionamiento de los reactores de lecho fluidizado depende de la concentración de microorganismos en la fase sólida. El problema de la dispersión axial, llega a ser difícil si las bajas velocidades lineales son usadas en reactores grandes. Los coeficientes de transferencia de masa depende de la diferencia entre las densidades de las esferas y el medio. En el caso de la producción de etanol, donde los agentes de inmovilización usuales son geles, la diferencia entre la densidad de las esferas y aquellas del medio debe ser suficiente para asegurar coeficientes de transferencia altos.

Para minimizar las desventajas de los bioreactores de lecho fluidizado mientras se mantienen sus ventajas, han sido tratadas las siguientes modificaciones:

- 1.- Incrementar la relación L/D simultáneamente a la velocidad de flujo del gas
- 2.- Emplear reactores de lecho fluidizado en series
- 3.- División de una columna del reactor en diferentes zonas por platos, con el objeto de moderar la dispersión axial del reactor
- 4.- Reactores con flujo cruzado gas/alimento (Nuñez, y Lema., 1987).

*CSTRs: Reactores de tanque de agitación continua

2.8 INVESTIGACIONES REALIZADAS EMPLEANDO LA TECNICA DE INMOVILIZACION

Las primeras investigaciones hechas con la tecnología de inmovilización se centraron inicialmente en la tecnología de inmovilización de sistemas enzimáticos simples que no requerían de cofactores. A medida que fueron evolucionando estos sistemas las investigaciones se orientaron hacia la inmovilización de la célula entera, debido a las ventajas substanciales que ésta involucra, mencionadas ya anteriormente. Así tenemos trabajos como el de Kierstan, M. y Bucke, C. quienes en 1977 utilizando alginato de calcio como matriz de inmovilización atraparon organelos celulares, enzimas y levaduras, puesto que este trabajo se enfoca a la inmovilización de levaduras para la producción de alcohol, los resultados que a continuación se muestran hacen referencia únicamente a este tipo de inmovilización. Kierstan, M. y Bucke, C. inmovilizaron *S. cerevisiae* en forma de fibras empacadas en una pequeña columna de 8 x 2.4 cm², usando un medio sintético con 10 % w/v de glucosa y un tiempo de residencia de alrededor de 10 hrs para la producción de etanol. Obtuvieron una eficiencia del 90 % del máximo teórico. Así mismo estos resultados demostraron el uso del alginato como un excelente medio atrapante. Tales sistemas poseen una vida media de alrededor de 10 días y han sido operados para una eficiente producción continua de etanol sobre un periodo total de 24 hrs.

En concordancia con estos investigadores, diversos trabajos han sido publicados en los que se demuestra al alginato de calcio como una buena matriz de inmovilización, la cual es capaz de mantener la biocatálisis viable por tiempos prolongados; ejemplo de éstos es el trabajo realizado por Bravo, P. y González, G. quienes en 1990 utilizaron *S. cerevisiae* en esta matriz para la producción de etanol a partir de melaza de betabel en un reactor de lecho fluidizado, encontraron que las esferas conteniendo las levaduras inmovilizadas después de trabajar con éstas por 55 días consecutivos y dejándolas en un medio enriquecido por 30 días para posteriormente empezar a trabajar nuevamente, observaron que después de dos días de empezar a trabajar en la fermentación, los resultados obtenidos fueron muy similares a aquellos obtenidos en el reactor usando células frescas. Probaron también dos diámetros de esferas: 1.6 mm y 3.5 mm, logrando una gran concentración de etanol, productividad y coeficiente de utilización con el diámetro menor, esto debido quizás a la menor resistencia interna del gel. Probaron que la productividad fue máxima (12 g/lh) a un tiempo de retención hidráulica (HTR) de 4 hrs, pero decreció conforme aumento el HRT. Después de operar por 55 días observaron un incremento de alrededor del 1 % en peso por día y el índice de viabilidad de las levaduras dentro de las esferas fue mantenido sobre el 90 %.

Además se han hecho estudios donde se investigaron las propiedades difusionales del alginato de calcio como matriz de inmovilización puesto que es muy importante asegurar el transporte eficiente de sustratos y productos en las biocatálisis inmovilizadas, así tenemos los trabajos de Martinsen, Storro y Skjak-Brack quienes en 1991 utilizando seroalbúmina bovina inmovilizada en alginato, probaron la distribución de ésta en el gel, comprobando que la velocidad de difusión de la albúmina fuera de las burbujas de alginato de calcio incrementa con

el contenido de bloques de cadenas de ácido gúlcrico en las moléculas de alginato. Esta también incrementa con el decremento de la concentración de alginato, y que el proceso de difusión depende fuertemente del método de preparación de los geles de alginato, y éste es más rápido en geles homogéneos formados en presencia de iones sodio. También encontraron que debido a que la matriz de gel de alginato está cambiada negativamente, el pH influye la difusión de los sustratos y productos cargados, en la proteína.

Por otra parte, haciendo un breve análisis de todos los factores anteriormente expuestos es posible observar toda una serie de parámetros implicados en la productividad de los reactores que utilizan levaduras inmovilizadas y que la variación de alguno de éstos origina algunos efectos pronunciados en la velocidad de reacción. En trabajos anteriores a éstos se han estudiado algunos otros factores que de manera directa influyen en la producción de etanol con sistemas inmovilizados, tal como se observa en el trabajo de Chien, N. K. y Sofer, S. S., publicado en 1984, en el cual se probaron los rangos típicos de productividades y se demostraron los patrones de cambio que tienen lugar cuando el tamaño de la esfera, flujo y medio de reacción son variados; usaron *S. cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio para la producción de etanol a partir de medio sintético que contenía glucosa como fuente de carbono. Encontraron que la productividad con levaduras inmovilizadas en un reactor batch o por lote (0.2 g etanol/g de lev.h) fue solo 2/3 que la de las células suspendidas libremente con una cantidad de células equivalente (0.3g etanol/g de lev. h), esto puede ser atribuido a la resistencia a la transferencia de masa al rededor de la esfera que llevan a los gradientes de concentración de glucosa y alcohol formado alrededor y dentro de la burbuja. Fueron usadas diferentes velocidades de flujo y tamaño de las esferas para optimizar la productividad. La productividad de esferas de 3.34 mm de diámetro a un flujo de 8.8 l/h (velocidad superficial: 0.12 cm/s) fue 95 % mayor que a 1.0 l/h, esto es debido a que son mejoradas las propiedades de transferencia de masa al incrementar la velocidad de flujo, pues la resistencia interparticular es reducida hasta que la velocidad al rededor de la esfera aumenta, por lo tanto, la velocidad de reacción total es mejorada a altas velocidades de flujo.

A velocidades de flujo de 8.8 l/h para esferas de 3.34 mm, la productividad sobrepasó (0.34 g/g lev. h) a aquellas de las células libres (0.30 g/g lev. h), esto quizás debido a que el diámetro de la esfera es ahora suficientemente pequeño para que la resistencia a la transferencia de masas sea despreciable; sin embargo se debe tomar en cuenta para esta suposición dos aspectos:

1.- Debido a que el atrapamiento físico podría afectar el comportamiento de las levaduras con respecto a la producción de etanol, una comparación directa no puede ser justificable.

2.- El grado de agitación por movimiento en el caso de células libres es menos efectiva.

Las productividades máximas de 0.34, 0.27 y 0.22 g/g lev h fueron obtenidas (a una velocidad de flujo de 8.8 l/h) para 9.2 % de burbujas de 3.34, 4.45 y 5.65 mm de diámetro respectivamente.

Puesto que el éxito de la inmovilización celular mantenida por períodos prolongados depende, entre otros factores, principalmente de la estabilidad de la fuerza mecánica del gel, el proceso de gelificación implicado en el mecanismo de inmovilización fue estudiado por Gilson, C. D. y col. en 1990. Ellos investigaron el efecto del diámetro de la burbuja, concentración de alginato, temperatura, concentración de CaCl_2 y la presencia de levaduras inmovilizadas en el tiempo de gelificación completa. Encontraron que el tiempo de gelificación completa ocurre en menos de 30 minutos para una variedad de condiciones determinadas; esto está en contraste con los largos tiempos usados en otros trabajos, y que ese tiempo incrementó con el aumento en el diámetro de la esfera sobre el rango de 2 mm a 5 mm con un aumento en la concentración de alginato sobre el rango 1 % a 6 % en peso. El tiempo de gelificación decreció con el aumento de la concentración del CaCl_2 sobre el rango de 0.02 M a 1.0 M y con el incremento de la temperatura sobre el rango de 0°C a 50°C. La reducción en la difusividad con el incremento en la concentración de CaCl_2 puede ser debida a las fuerzas intermoleculares entre la matriz de alginato la cual reduce la difusividad del CaCl_2 . La adición de levaduras a la solución de alginato en cantidades por arriba del 10 % (peso seco) antes de la gelificación tuvo el efecto de aumentar el tiempo de gelificación por arriba del 3 %.

Numerosas configuraciones de reactores involucrando células inmovilizadas han sido propuestas para la fermentación de etanol a escala de laboratorio y comercial. Así, tenemos el empleo de reactores de lecho fluidizado desarrollados para una gran variedad de aplicaciones en procesos biológicos, y que específicamente para la producción de etanol Tzeng, J. W.; Gon Y. R. y col. en 1991 utilizaron este tipo de reactor con multietapas. Ellos inmovilizaron *S. carlabergensis* en alginato de calcio utilizando medio sintético y examinaron los efectos de las condiciones de operación en la concentración de etanol en la salida del reactor y la productividad volumétrica. Ellos encontraron que este tipo de reactores disminuyen los problemas asociados con la evolución del CO_2 y provee una buena mezcla de fases sólida y líquida y que no se producen acumulación ni canales de gas. La productividad volumétrica varió desde 14.90 hasta 17.41 g/lh con 87 a 97 % de conversión y 66.8 a 98.3 g/l de concentración de etanol a la salida.

2.9 INFLUENCIA DEL pH y TEMPERATURA EN EL PROCESO DE FERMENTACION CON CELULAS INMOVILIZADAS.

Para la regulación en la operación de bioreactores usando células de levadura inmovilizada es muy importante conocer con precisión el efecto del pH y de la temperatura en el medio de fermentación para el crecimiento de la célula y producción de etanol. Muchos estudios realizados acerca de la influencia del pH y temperatura en el crecimiento de microorganismos han sido publicados, en éstos reportes el pH y la temperatura óptimos para el crecimiento así como para el proceso de fermentación son indicados. Pero el criterio para determinar el pH y la temperatura óptimos no han sido explicados (T.N. Semushina et al., 1974). En los trabajos publicados por Eroshin, and Skryabin., 1976. demuestran que el pH y la temperatura óptimos para el crecimiento no son los mismos que para la fermentación. Ellos realizaron un análisis matemático del coeficiente de producción del sustrato (medio sintético) utilizando el pH y temperatura en una superficie cerca del óptimo, los parámetros usados fueron independientes uno del otro. Resultando un máximo coeficiente de producción del sustrato en las coordenadas: $\text{pH}=4.1$ y $\text{Temperatura}=28.5^{\circ}\text{C}$. Estas conclusiones son importantes para el desarrollo del control computarizado de procesos de fermentación.

Consecuentemente, un considerable interés ha sido mostrado en el estudio y análisis de células inmovilizadas en reactores ya que podrían operar a gran escala contando con parámetros de temperatura y pH bien establecidos para lograr un máximo rendimiento del sustrato en un corto tiempo (Bandyopadhyay and Ghose., 1980).

Por otra parte la concentración de iones hidrogeno en el medio ambiente de la célula es un factor que puede afectar el crecimiento y producción de metabolitos, es por ello (que las últimas investigaciones se han enfocado al estudio de la influencia del pH en microorganismos tanto libres como inmovilizados. Así tenemos los trabajos de Wasungu y Simard en 1982, quienes obtuvieron un máximo crecimiento de la levadura del pan entre un rango de 3.5 a 5.0 encontrándose el óptimo a un pH de 4.5. Los trabajos de Buzás, Dallmann, y Szajani en 1988, demuestran que existe una gran influencia del pH dentro de la célula, ellos examinaron el efecto tanto en células libres como en inmovilizadas encontrando que las levaduras libres tienen muy poco crecimiento logrando un 8×10^7 cel/gel a un pH de 4.0, mientras que las levaduras inmovilizadas logran un crecimiento de 8.5×10^7 cel/gel a un pH de 2.3. También durante la fermentación se observó que en las células inmovilizadas en alginato de calcio se lograba una fermentación a un pH de 2.5, mientras que en células libres se lograba la fermentación a un pH de 4.0. Con éstos resultados se demuestra que las células atrapadas en alginato de calcio son protegidas de las alteraciones de su medio ambiente, permitiendo así manipular un poco los rangos de pH con el fin de lograr una mayor producción de alcohol sin que exista el problema de contaminación tomando en cuenta el uso a gran escala de las materias primas utilizadas.

Por otro lado la optimización de la temperatura ha sido enfocada específicamente a sistemas enzimáticos, existiendo muy pocas investigaciones relacionadas al efecto dentro de la célula. Sin embargo es importante señalar lo que ocurre en éstos sistemas puesto que participan en todas las reacciones bioquímicas ya sea dentro o fuera de la célula. En los últimos años el uso de enzimas inmovilizadas ha tenido gran desarrollo, ya que existen numerosas ventajas como: recuperación y reutilización en reactores en operación discontinua, desarrollo de reactores enzimáticos de funcionamiento continuo, posibilidad de sistemas multienzimáticos, entre otras; y quizás la consideración mas importante en el uso a gran escala de enzimas inmovilizadas sea la estabilidad, y en general ésta estabilidad puede ser lograda mediante el proceso de inmovilización, es decir, depende de la naturaleza del gel donde es adherida la enzima. En muchos de los casos, la estabilidad térmica de células inmovilizadas se incrementa con la presencia de iones covalentes tales como; Ba, Mg, Mn, entre otros, ya que ayudan a prevenir una inactivación. En una comparación de células libres con células inmovilizadas en los trabajos de Chibata, y Tosa (1979), demuestran que existe una similitud entre células inmovilizadas y células libres, ellos emplearon una serie de enzimas tanto inmovilizadas como libres, las incubaron en una solución salina por 30 min. a una temperatura de 45°C y 60°C, las células inmovilizadas perdieron su actividad más rápidamente que las células libres, sin embargo, cuando las células son agregadas durante el tratamiento de calor, la activación de las células inmovilizadas queda estable e incluso existe un incremento en su actividad. Esto fundamenta que al usar células inmovilizadas podemos tener una mayor estabilidad dentro de ella y así mantenerla al momento de cambiar parámetros como en este caso temperatura y pH, con el fin de lograr una fermentación más rápida y eficiente sin dañar su actividad.

2.10 METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM).

La metodología de superficie de respuesta es un colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para analizar problemas en que varias variables independientes influyen en una variable dependiente o respuesta, y la meta es optimizar esta respuesta. Cuyo objetivo eventual es determinar una región del espacio de los reactores en que se satisfagan especificaciones de operación (Box y Youle, 1995).

Por lo tanto la RSM puede ser definida como un método estadístico que usa datos cuantitativos de diseños experimentales apropiados para determinar y simultáneamente resolver ecuaciones multivariantes, ecuaciones que pueden ser representadas gráficamente como una superficie de respuesta la cual puede ser utilizada para describir cómo las variables probadas afectan la respuesta, para determinar las interacciones entre ellas y para describir el efecto combinado de todas las variaciones probadas en la respuesta. (Giovanni, 1983).

Básicamente la RSM es un proceso de cuatro pasos:

1. Identificación de las variables: identificar dos o tres variables críticas del proceso bajo estudio, esto es, los factores que tienen mayor influencia sobre la respuesta analizada. Estos pueden ser determinados por experimentos preliminares, bibliografía o por la experiencia del investigador. El número de variables estudiadas se limita generalmente a dos o tres para simplificar el modelo estadístico.

2. Definición de los niveles de las variables: definir los rangos a probarse para cada variable, Si estos rangos son muy amplios y el óptimo no es definido claramente por RSM, entonces se hace un segundo experimento, usando un rango más estrecho.

3. Diseño experimental: Establecer los experimentos a realizarse usando un diseño experimental adecuado. Estos diseños seleccionan un grupo de experimentos, de todos los experimentos posibles, lo cual reduce el número total de pruebas. Después de que los experimentos son especificados, son realizados y así obtenemos los datos cuantitativos que se utilizarán en el análisis estadístico.

4. Análisis de datos: Analizando los datos cuantitativos por medio de un adecuado programa de computación, las conclusiones hechas de estos análisis deberán de ser confirmados con pruebas posteriores, en donde se trabajará con los valores óptimos encontrados para las variables (Giovanni,1983).

La habilidad de los métodos de superficie de respuesta para predecir rendimientos sobre un amplio rango de condiciones de operación, hace una herramienta ideal que permite la rápida determinación de condiciones óptimas de operación cuando se da una serie de obstáculos.

Además la elaboración de gráficas de superficie de respuesta, pueden usarse para determinar las condiciones óptimas de operación, y una vez que las ecuaciones de regresión han sido obtenidas, el proceso puede ser modelado para una amplia variedad de situaciones.(Bowman y Geiger.,1984).

Es por esto que se eligió esta técnica de RSM para optimizar el pH y la Temperatura de operación del proceso de producción de alcohol empleando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada.

III. HIPOTESIS

La optimización de las condiciones de operación de un reactor de lecho fluidizado utilizando células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* , aumentará la productividad , rendimiento, y eficiencia de fermentación.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

4.1.1 Determinar la influencia de variables de operación en la producción de alcohol, utilizando un reactor de lecho fluidizado con / células de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas y melazas de caña como materia prima.

4.1.2 Optimizar mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) las variables que tengan mayor influencia en las respuestas de rendimiento, eficiencia y productividad de alcohol en g/l.h.

4.2 Objetivos específicos.

4.2.1 Estandarizar las técnicas analíticas

4.2.2 Determinar la influencia de pH y Temperatura de operación.

4.2.3 Realizar un análisis estadístico de resultados.

4.2.4 Optimizar el pH y la Temperatura empleando la metodología de superficie de respuesta.

4.2.5 Verificar la validez del modelo matemático obtenido.

V. MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMO:

El microorganismo utilizado fue *Saccharomyces cerevisiae* BCGC L-024 productora de etanol a partir de melazas de caña la cual fue proporcionada por el Banco de Cepas y Genes del CIATEJ.

MEDIOS:

Medio de Propagación:

Mosto de melaza a 15°Bx y pH 4.5

0.47 g/l de Sulfato de Amonio

0.544 g/l de Fosfato de Potasio

Medio de Fermentación:

Mosto de melaza a 15°Bx.

VARIABLES A OPTIMIZAR: X1= pH X2= Temperatura

Para el primer diseño factorial un rango de:

X₁: 2.5-----3.5-----4.5
(-) (o) (+)

X₂: 30-----34-----38
(-) (o) (+)

Para el segundo diseño factorial:

X₁: 2.09-----4.9
√-2 √+2

X₂: 28.36 -----39.64
√-2 √+2

REACTIVOS:

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico y obtenidos de fuentes comerciales conocidas.

EQUIPO:

Espectrofotómetro UV/VIS lambda 2 Perkin Elmer, Balanza analítica OHAUS GA 2000, Balanza granataria Mettler PE 1600, Estufa de alta temperatura Felisa, Estufa de incubación Felisa, Microscopio compuesto One Ten American Optical, Autoclave Infra, Potenciómetro Beckman, Centrifuga, RC5C, Orbital rotatorio New Brunswick, Campana de flujo laminar VECO, Cámara de Newbawer American Optical, Micropipetas Gilson, Placa magnética y de calentamiento Perkin Elmer, Microdestilador de vidrio, Bomba peristáltica COLE-PARME, Baño maría HAAKE-D1, Reactor de vidrio VICOSA, Vortex Fisherbrand.

TECNICAS

1.- Técnica de Azul de metileno para conteo directo de células.

(Lee, Robinson, y Wang., 1981)

Reactivos utilizados:

- a) Azul de metileno 1 g/l.
- b) Citrato de sodio 20 g/l.

Procedimiento:

En un matraz aforado de 50 ml, poner 5 ml de muestra, 2.5 ml de azul de metileno y aforar con agua destilada.

Tomar con una micropipeta de 20 μ l una muestra y con ayuda de una cámara de Newbawer contar la población total al microscopio. Esta técnica nos permite conocer la viabilidad, ya que la pared celular de las levaduras muertas absorben el colorante y de esta forma es fácil identificar las células muertas de las vivas.

2.- Técnica para la determinación de azúcares reductores totales por el método de fenol-sulfúrico. (Dubois y colaboradores, 1956).

Reactivos utilizados:

- a) Acido sulfúrico concentrado
- b) Fenol al 5 %.

Procedimiento:

A 1 ml de la solución problema se le adiciona 1 ml de fenol al 5 %, enseguida se agregan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de hidrólisis. Se deja enfriar durante 10 min. a temperatura ambiente, se agita y posteriormente se coloca a baño de agua fría durante 10 min. Finalmente se lee la absorbancia a 490nm.

3.- Técnica para la determinación de etanol por el método de Dicromato de potasio. (Bohringer y Jakob, 1964).

Reactivos utilizados:

- | | |
|--------------------------------------------|------------|
| a) Dicromato de potasio ($K_2 Cr_2 O_7$) | 33.768 g/l |
| b) Acido sulfúrico (H_7SO_4) | 325.00 ml. |

Preparación:

Se diluye el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 ml de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200 ml de agua destilada, por último se afora a 1 litro con agua destilada.

Procedimiento:

A 1 ml de muestra se agregan 2 ml de solución de dicromato de potasio y se agita, se deja reposar durante 10 min. y posteriormente se agregan 5 ml de agua destilada, para finalmente agitar y leer la absorbancia a 585 nm.

4.- Técnica de inmovilización por atrapamiento en alginato de calcio.

A partir de crema de levadura (fig.5 y 6):

A partir de un matraz con 200ml de medio crecido por 8 h a 30°C /250 rpm se centrifuga a 7000 rpm/20 min para obtener la crema celular la cual es resuspendida con solución salina estéril y mezclada con ácido algínico al 2% en una proporción 1:2, quedando una dilución de células en el gel de 1:50. Posteriormente esta mezcla es goteada a una solución de cloruro de calcio 0.2 M a través de una bomba peristáltica con cabezal No. 14 a una velocidad de 0.5 y con una aguja 21x 32 mm sin vicel, una vez terminada la inmovilización el cloruro de calcio es eliminado y los geles son colocados durante 5 min en solución de $Al(NO_3)_3$ al 2% para el endurecimiento de los mismos. Terminando el tiempo requerido son enjuagados con agua estéril, estando listos para su posterior utilización.

A partir de levadura liofilizada (fig. 8):

Se mezclan 2 gr de levadura liofilizada en 133 ml de solución salina fisiológica estéril y 266 ml de ácido algínico al 2% (proporción 1:2), quedando una dilución de células en el gel de 1:50. Posteriormente esta mezcla es goteada a una solución de cloruro de calcio 0.2 M a través de una bomba peristáltica con cabezal No. 14 a una velocidad de 0.5 y con una aguja 21 x 32 mm sin vicel, una vez terminada la inmovilización el cloruro de calcio es eliminado y los geles son colocados durante 5 min en aproximadamente 450 ml de solución de $Al(NO_3)_3$ al 2% para el endurecimiento de los mismos. Terminando el tiempo requerido son enjuagados con agua estéril y posteriormente son colocados en 900 ml de melaza a 15°Bx y pH de 4.5 estéril, para su incubación a 30°C/250 rpm por 42 h.

V. METODOLOGIA

5.1 ESTANDARIZACION DE TECNICAS ANALITICAS

5.1.1 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales.

Se realizó una curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales por medio del método fenol-sulfúrico, usando una solución patrón de sacarosa a una concentración de 0.1 g/l. El rango de concentraciones a probar fue de 0.01 a 0.1 g/l de sacarosa, para obtener así una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de azúcares presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

5.1.2 Curva de calibración para la determinación de etanol

Se realizó una curva de calibración para determinar etanol por medio de la técnica de dicromato de potasio, usando una solución patrón de etanol de 20 g/l. El rango de concentraciones a probar fue de 2 a 20 g/l de etanol, para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de etanol presente en una muestra a partir de una absorbancia dada.

5.2 DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES

Para realizar las pruebas que a continuación se describen se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BCGC L--024 inmovilizada por la técnica de atrapamiento en alginato de calcio previamente estandarizada y cuyo procedimiento se describió anteriormente, y un reactor de vidrio que se ilustra en la figura No. 7.

5.2.1 Pruebas de velocidad de flujo.

Previo a las pruebas de velocidad de flujo se realizó una prueba de almacenamiento de geles, éstos se dividieron en 3 partes, una se puso en agua estéril, otra se dejó en cloruro de calcio recién preparado y la otra se dejó en el cloruro de calcio donde se efectuó la inmovilización, los tres matraces fueron guardados a una temperatura de 5°C por 24 h, después se les determinó población y viabilidad de la levadura en los geles, así como el tiempo que tardaron en desintegrarse al adicionarles a 1 ml de geles, 5 ml de solución amortiguadora de citrato de sodio a un pH de 8.5 y agitarlos en el vortex, comparándose con la población de los geles inmediatamente después de inmovilizados. Posteriormente se realizaron las pruebas de velocidad de flujo, en la primera prueba se usó una bomba peristáltica con cabezal No. 18 para determinar a las diferentes velocidades del control, el flujo de alimentación que se obtendría para el reactor.

Se emplearon 5 litros de melaza de caña a 21°Bx y se midió el tiempo que tardaban en desalojarse 2 litros de medio para posteriormente calcular el flujo. Asimismo, se midió la altura del lecho a las diferentes velocidades probadas. Después se realizó una prueba similar con la diferencia de que en lugar de mosto de melaza se empleó agua destilada. En un experimento posterior se determinaron las velocidades de flujo a las condiciones mencionadas anteriormente, empleándose melaza de caña a 21°Bx, para dos diámetros diferentes de gel, lo cual se consiguió con la técnica de inmovilización pero empleando agujas de 21x32 mm (esferas con \varnothing 2.5 mm) y de 22x32 mm (esferas con \varnothing 1.6 mm) para esta última fue necesario emplear cabezal No. 13 en el procedimiento de inmovilización .

Por último se realizaron experimentos con estos geles de diferentes diámetros (2.5 y 1.6 mm) a diferentes concentraciones de azúcares en la melaza, esto es a 5°Bx, 10°Bx y 15°Bx, determinándose la velocidad de flujo obtenida para cada condición probada en los diferentes números de velocidad del controlador de la bomba peristáltica con cabezal No. 18.

5.2.2 Pruebas de pH del medio de alimentación

Se realizaron dos fermentaciones en el reactor de lecho fluidizado utilizando 5 litros de medio de melaza a 15°Bx a pH de 4.5 y pH 3.0 respectivamente, se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada de la forma descrita con anterioridad, utilizándose geles con diámetro de 2.5 mm, los cuales estuvieron en reposo por 24 hr en solución de cloruro de calcio a 5°C, habiéndose obtenido a partir de un matraz de crecimiento, aproximadamente 310 ml de geles que alcanzaron una altura de 20 cm en el reactor. Antes de realizar la fermentación en el reactor, éste fue limpiado y puesto en condiciones asépticas mediante la recirculación de una solución de alcohol al 70 % entre 12-14 horas, después de lo cual se lavó con agua destilada.

Los geles antes de ser introducidos al reactor, se ponen en 1 litro de melaza a 15°Bx en un matraz de 2 litros, dejándose en reposo por 30 minutos, posteriormente se carga el reactor con ellos y se llena con medio fresco de melaza dejándose nuevamente en reposo por aprox. 45 minutos, después de lo cual se inicia la recirculación continua del medio a través de una bomba peristáltica con cabezal No. 18 y a una velocidad No. 2, lo cual da un flujo de alimentación de 300 ml/min. La temperatura es mantenida a 35°C por recirculación de agua de un baño de temperatura constante. El esquema del reactor se muestra en la figura No. 7.

Se tomaron 10 ml de muestra del medio, a la salida del reactor cada 2 horas durante 48 horas para la primera fermentación (pH 4.5) y durante 24 horas para la segunda (pH 3.0), las cuales se centrifugaron por 20 min a 5000 rpm y posteriormente, fueron analizadas en cuanto a su contenido de azúcares y de etanol. Por otro lado se muestrearon geles a los tiempos: 0,4,8,12 y 24 h para determinarles población celular y % de viabilidad.

Posteriormente, se realizó nuevamente una fermentación con melaza a 15°Bx y pH de 3.0 de la misma manera a la descrita arriba con la diferencia de que la solución de alcohol se recirculó por 12 horas antes de cargar el reactor con el medio con geles, y la velocidad del regulador de la bomba peristáltica, se cambió a 2.5 (aprox. 30 l/h). La fermentación se siguió por 24 horas sacando muestras de manera similar a la ya descrita.

5.2.3 Pruebas empleando levadura liofilizada para la inmovilización

Primeramente se determinó el peso seco en la mezcla de crema de levadura - solución salina empleada normalmente para mezclar con el ácido algínico en la técnica previamente estandarizada de inmovilización, así como la población celular por gel que queda después de inmovilizar. Se calculó la cantidad de levadura liofilizada que es necesario mezclar con la solución salina para obtener geles con una población celular similar a la obtenida con el procedimiento tradicional.

Para el procedimiento de inmovilización se partió de 2 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada, los cuales se disolvieron en 133 ml de solución salina estéril y posteriormente fue mezclada con 266 ml de ácido algínico para después continuar con el proceso de inmovilización de la manera ya descrita (fig. 8). Con los geles así obtenidos ($\phi = 2.5$ mm) se realizó una fermentación en el reactor empleando 5 litros de melazas de caña a 15°Bx a pH de 3.0 con una velocidad de flujo de alimentación de aprox. 30 l/h. La fermentación se siguió por 72 horas y se tomaron muestras a diferentes tiempos para determinar etanol y azúcares reductores totales en el medio de salida del reactor y se muestrearon geles para determinar población total y % de viabilidad. Se probó una solución de citrato de sodio 0.1 M para disolverlos. (30 geles con 5 ml de solución de citrato de sodio).

Se realizó una segunda fermentación partiendo de levadura liofilizada para realizar la inmovilización pero con la variante de que una vez formados los geles, éstos se incubaron en 1 litro de melaza a 15°Bx a 30°C /250 rpm por 48 horas durante las cuales se tomaron a los tiempos: 0, 24 y 48 horas muestra de los geles para determinar población total y % de viabilidad, después de esta incubación se cargó el reactor con los geles junto con el medio en que habían estado incubándose y se procedió a llenar el reactor con el medio de melaza fresco a 15°Bx pH de 3.0. La fermentación se siguió por 30 horas, sacándose muestras del medio cada dos horas y de geles cada 4 horas. A las muestras del medio se les determinó contenido de etanol y de azúcares totales.

En seguida se realizaron dos fermentaciones con levadura liofilizada e inmovilizada y previamente incubada por 48 horas a 30°C /250 rpm empleando medio de melaza a 15°Bx y pH de 4.5 una y la otra a pH de 3.0 ambas a 35°C. La fermentación se siguió por 28 horas y se sacaron muestras de la manera ya descrita anteriormente.

5.2.4 Pruebas de Temperatura

Se realizarón dos fermentaciones con levadura inmovilizada con su previa incubación empleando melaza a 15°Bx, pH de 4.5 y temperatura de 35°C una y la otra a pH de 4.5 y a una temperatura de 30°C. La fermentación se siguió por 52 horas y se sacaron muestras de la manera ya descrita anteriormente, determinándoseles contenido de etanol, azúcares reductores totales cada 2 horas y población de geles cada 4 horas.

5.3. ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

Se realizaron análisis de varianza de una vía para pH y posteriormente para temperatura empleando el paquete estadístico de cómputo llamado "Statgrafics".

5.4. OPTIMIZACION DE pH Y TEMPERATURA EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM).

5.4.1. 1º Diseño Factorial

Se utilizó un diseño experimental tipo factorial 2^n , siendo n igual a 2. Esto es, se probaron 2 variables (pH y temperatura) a dos niveles cada uno, con 3 puntos centrales y un modelo polinomial de primer orden de acuerdo con el diseño que se muestra en la tabla No. 3, siendo las respuestas analizadas rendimiento, eficiencia de fermentación y productividad total de alcohol.

Las variables codificadas (+1,-1,0) se calcularon en base a las siguiente formula:

$$X^*1 = \frac{X^*1 - P.C}{\Delta}$$

Por ejemplo para el caso de pH (X1) y temperatura (X2) las fórmulas serían:

$$X^*1 = \frac{X^*1 - 3.5}{1}$$

$$X^*2 = \frac{X^*2 - 35}{4}$$

* variable codificada que se sustituirá por +1,-1 y 0.

' valor real a probar para la variable, valor buscado

P.C punto central para el rango de la variable

Δ incremento de el extremo del rango (+ 1 ó - 1) al punto central

VI. RESULTADOS

6.1 ESTANDARIZACION DE TECNICAS ANALITICAS

La curva de calibración utilizada para la determinación de azúcares reductores totales se muestra en la fig. 9. La ecuación obtenida fue $Y = 2.090919E -03 + 8.433636 (X)$ y es aplicable a los rangos de absorbancia de 0 a 0.85 que correspondieron a una concentración de 0 a 0.1 g/l, con un coeficiente de regresión de 0.99972 para 11 puntos.

La curva de calibración utilizada para la determinación de etanol se muestra en la figura 10. La ecuación obtenida fue $Y = 7.045445 - 03 + 5.433615E - 02 (X)$ y es aplicable en los rangos de absorbancia de 0 a 0.94 que correspondieron a una concentración de 0 a 18 g/l de alcohol, con coeficiente de regresión de 0.99952 para 10 puntos, ya que como se puede observar en esta figura, la absorbancia obtenida a 20 g/l de etanol no sigue el comportamiento lineal.

6.2 DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES

6.2.1 Pruebas de velocidad de flujo

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al tiempo de desintegración, población celular y % de viabilidad en los geles de alginato de calcio sometidos a almacenamiento a diferentes condiciones. En ella se puede observar que los geles que tardaron mas tiempo para disolverse por completo son los geles obtenidos inmediatamente después de la inmovilización, es decir, sin almacenamiento, siguiendole los geles que fueron almacenados en el $CaCl_2$ que se utilizó en la inmovilización, con tiempos de desintegración de 53:49 min y 50:00 min. respectivamente. Los geles que se disolvieron mas rápido (33:10 min.) son los que se almacenaron en agua estéril. En lo referente a la viabilidad de la levadura contenida en los geles, se puede observar en esta tabla que en general fueron altas para todos los geles probados independientemente de la forma de almacenarlos, siendo el rango de viabilidad del 96 al 99 % , y en cuanto a la población celular contenida en los geles se puede apreciar que esta se mantiene en 2×10^6 cel/gel para los geles inmediatamente después de la inmovilización y cuando se mantuvieron en almacenamiento en agua destilada y subió a una población de 3×10^6 cel/gel para los otros dos casos de almacenamiento.

Por otro lado las velocidades de flujo determinadas con el cabezal No. 18 empleando melaza de caña a 21°Bx, así como la altura del lecho dentro del reactor se muestran en la tabla 6. En ella se puede observar que el flujo obtenido fue de 4.9 litros / h para la velocidad 1 y para la mayor velocidad probada que fue la No. 5 se obtuvo un flujo de 103 litros / h. La altura del lecho de geles inicial en el reactor fue de 20 cm la cual no se expandió hasta la velocidad 3 con un flujo de 31.3 litros / h a una altura total de 25 cm, al ir aumentando la velocidad del flujo el lecho se expandió rápidamente no siendo posible su medición.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en un experimento similar al anteriormente descrito, con la diferencia de que se empleó agua destilada para medir los flujos. Los flujos obtenidos variaron de 9.5 l/h para la velocidad No.1 hasta 68.57 l/h para la velocidad No.5. La altura del lecho inicial fue de 20 cm, la cual se expandió hasta la velocidad No. 2 a 30 cm de altura total, la cual fue en aumento al ir aumentando las velocidades del flujo hasta alcanzar a expandirse en la totalidad de la columna (altura de 100 cm) en la velocidad 5.

En un experimento posterior se determinaron las velocidades de flujo empleándose melaza de caña a 21 °Bx, para un diámetro de gel menor (1.6 mm) al que se estaba utilizando, los resultados se muestran en la tabla 8 donde se puede apreciar que las velocidades de flujo son superiores para algunas de las velocidades probadas, a las obtenidas con geles de diámetro de 2.5 mm (tabla 6), ya que los flujos variaron de 7.8 l/h para la velocidad No. 1 hasta 84.7 l/h para la velocidad No.5. La altura del lecho inicial fue de 17 cm la cual se expandió en la velocidad No.2 hasta 23 cm de altura, a diferencia de los geles de diámetro de 2.5 mm los cuales a la misma velocidad no lograron expandir la altura inicial del lecho de 20 cm; la expansión del lecho en todo el largo de la columna (100cm), se alcanzó en la velocidad 5.

Por último se realizaron experimentos con estos geles de diámetros diferentes (2.5 y 1.6 mm) a diferentes concentraciones de azúcares en la melaza cuyos resultados se muestran en la tabla 9. En ella se puede observar que a medida que se aumenta la velocidad para una misma concentración de melaza, el flujo aumenta grandemente, pero cuando se aumenta la concentración de la melaza de 5 a 10 °Bx el flujo alcanzado a las velocidades 1 y 2 es similar (ligeramente superior) no siendo el caso para la velocidad 3 donde el flujo obtenido a 10 °Bx (37.8 l/h) es inferior al flujo obtenido a 5 °Bx (43.6 l/h). Al aumentar la concentración de melaza a 15 °Bx nuevamente los flujos obtenidos a las velocidades 1 y 2 son similares a los obtenidos a las otras concentraciones de melaza y a la velocidad No. 3 el flujo es ligeramente superior al obtenido a 10 °Bx pero inferior al obtenido a 5 °Bx.

Cuando se probó la melaza a 5 °Bx, la altura del lecho alcanzada en la velocidad No. 1 (28 cm) se expandió gradualmente al aumentar la velocidad de flujo, alcanzándose en la velocidad 3 (43.6 l/h) una altura del lecho de 80 cm en total, no siendo el caso cuando se utilizó melaza de caña a 10 °Bx, donde a la misma velocidad 3 (37.8 l/h) se alcanzaron 60 cm de altura del lecho en el reactor. Para el caso donde se utilizó melaza a 15 °Bx, la completa expansión del lecho en el reactor se alcanzó con la velocidad 2 (18.6 l/h).

Comparando los diferentes diámetros de geles probados a la misma concentración de melaza, se puede observar que a las velocidades probadas se obtienen flujos mas altos para los geles con diámetro de 1.6 mm lo cual sucede tanto a 5°Bx como a 10 °Bx. La expansión del lecho de geles también es mayor para los de diámetro de 1.6 mm a todas las velocidades probadas, alcanzándose la completa expansión del lecho a la velocidad No. 3 para los geles con diámetro de 1.6 mm y melaza a 10 °Bx.

6.2.2 Pruebas de pH del medio de alimentación

En las figuras 11 y 12 se pueden observar los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas en el reactor de lecho fluidizado a pH de 4.5 y a pH 3.0 respectivamente. En ambas gráficas se muestra que a medida que aumenta la producción de alcohol disminuye la cantidad de azúcares reductores totales en el medio, estabilizándose la producción a partir de las 16 h de fermentación en el experimento con pH de 3.0 y en el experimento con pH de 4.5 empieza a estabilizarse a partir de las 24 h de fermentación siendo 29 g/l y 25.4 g/l la máxima concentración de etanol obtenida a pH de 3.0 y 4.5 respectivamente. La población inicial dentro de los geles fue de 2×10^6 , posteriormente se tomaron muestras de los geles cada 4 h terminando a las 48 h con 20×10^6 cel/gel. En la tabla 10 se muestran los rendimientos, eficiencias de fermentación y productividades obtenidas para los dos valores de pH probados, en ella podemos ver que el más alto rendimiento (0.2913) el cual corresponde a una eficiencia de fermentación de 57.1% y a una productividad de 1.05 g/l.h se obtuvo en la fermentación realizada a un pH de 3.0.

Los resultados de la repetición de la fermentación realizada a pH de 3.0 se muestran en la figura 13. En ella se puede observar que la máxima concentración de etanol obtenida fue de 24 g/l a las 24 h de fermentación (no observándose estabilización en la producción), tiempo en el cual la concentración de azúcares reductores totales era de 55 g/l y la población dentro de los geles de 11×10^6 cel/gel. El Yp/s obtenido para esta fermentación fue de 0.3076 lo cual corresponde a un 60.3 % de eficiencia de fermentación, con una productividad de 1.0 g/l.h, valores cercanos a los obtenidos anteriormente.

6.2.3. Pruebas empleando levadura liofilizada para la inmovilización

Los resultados obtenidos en la fermentación con levadura liofilizada durante 72 h, se muestran en la figura 14. En ella se puede observar una fase de adaptación larga de aprox. 48 h, durante las cuales la población celular, la producción de alcohol y el consumo de azúcares permaneció constante y sin cambio notorio al valor inicial. Posteriormente comienza paulatinamente la producción de alcohol alcanzando un valor máximo de 28.1 g/l a las 72 h de fermentación con una concentración de azúcares residuales de 29.1 g/l. La población celular en los geles aumentó de 2×10^6 cel /gel al inicio a 5×10^6 cel/gel a las 50 horas, permaneciendo posteriormente constante. El Yp/s obtenido en esta fermentación fue de 0.3878, lo cual corresponde a un 76 % de eficiencia de fermentación, y a una productividad de 0.4041 g/l.h.

La figura 15 muestra los resultados obtenidos en la segunda fermentación con levadura liofilizada para realizar la inmovilización con previa incubación de geles por 42 horas. En esta gráfica se puede observar que contrariamente a la vez anterior, no existe una fase de adaptación y la producción de alcohol aumenta gradualmente durante la fermentación, así como el consumo de azúcares reductores totales, alcanzándose la máxima concentración de alcohol de 33.1 g/l a las 24 h tiempo en el cual la concentración de azúcares totales era de 22 g/l y a partir de lo cual se estabiliza. La población inicial dentro de los geles era de 5×10^6 cel/gel la cual fue en aumento durante toda la fermentación alcanzando una población final de 9×10^6 cel/gel. El Yp/s obtenido en esta fermentación fue de 0.4383, lo cual corresponde a una eficiencia del 85.9 %, con una productividad de 1.273 g/l.h, valores mayores a los obtenidos en la fermentación anterior, a condiciones de pH similares.

Por último se realizaron dos fermentaciones por duplicado cada una con levadura liofilizada y previamente incubada por 42 h empleando medio de melaza a 15°Bx y pH de 3.0 y 4.5 y a una temperatura de 35°C los resultados obtenidos se muestran en las figuras 16 y 17 respectivamente. En donde se observa que la producción de alcohol empieza en aumento lineal, a partir de las 12 h de fermentación, la cual sigue aumentando hasta alcanzar una máxima producción a las 52 h en ambos casos (que corresponden al final del muestreo), la cual fue de 35.1 g/l para pH de 3.0 y para pH de 4.5 de 33.7 g/l tiempo en el cual la concentración final de azúcares era de 19 g/l y 17 g/l y la población dentro de los geles de 7×10^6 cel/gel para ambos casos. La tabla 11 muestra los rendimientos (Yp/s), eficiencias de fermentación así como las productividades obtenidas en cada fermentación, en ella se muestra que el rendimiento mas alto (0.4073), la eficiencia de fermentación de 79% y la productividad mas alta de 0.683 g/l.h se obtuvieron en las fermentaciones realizadas a pH 3.0, comparado con las fermentaciones realizadas a pH de 4.5 donde la eficiencia de fermentación fue de 69.8%, el rendimiento de 0.3116 y la productividad de 0.648 g/l.h.

6.2.4 Pruebas de temperatura

Se realizaron dos fermentaciones por duplicado cada una con levadura liofilizada y previamente incubada por 42 h empleando medio de melaza a 15°Bx, pH de 4.5 y temperaturas de 35°C y 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 18 y 19 en donde se puede observar que en la fermentación a 35°C existe una ligera fase de adaptación durante las primeras 12 h a partir del cual se observa un comportamiento lineal hasta las 32 h y a partir de entonces se empieza a estabilizar la fermentación alcanzando una máxima producción de alcohol de 26.1 g/l a las 52 h tiempo en el cual la concentración de azúcares reductores era de 8.0 g/l y la población de 4×10^6 cel/gel. por otro lado en la fermentación a 30°C se observa que la producción de alcohol fue casi lineal desde el inicio hasta el final de la fermentación alcanzando una máxima producción de alcohol de 33.5 g/l a las 52 h tiempo en el cual la concentración final de azúcares era de 12.0 g/l y la población de 6×10^6 cel/gel.

La tabla 12 muestra los rendimientos (Y_p/s), las eficiencias alcanzadas, y las productividades en g/l.h, en ella se puede apreciar que el rendimiento mas alto (0.3700), la eficiencia de (72.4%) y la productividad mas alta de (0.620 g/l.h) se obtuvieron en las fermentaciones a 30°C. en cambio en las fermentaciones realizadas a temperatura de 35°C se observan valores mas bajos de 0.2825, 54%, y 0.501 g/l.h respectivamente.

6.3 ANALISIS ESTADISTICO

Las tablas 13 y 14 muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza para eficiencia de fermentación, a los diferentes pH y temperaturas probadas, en donde podemos ver que la F calculada para los pH probados es mayor que la F de tablas, las cuales tienen valores de 20.1 y 18.5 respectivamente. Para las temperaturas probadas la F calculada es mucho mayor que la F de tablas, las cuales tienen valores de 62.1 y 18.5. En seguida en las figuras 20 y 21 se encuentran graficados los promedios de la eficiencia de fermentación con su error estándar para cada uno de los experimentos, en donde se observa que los valores promedio de eficiencia mas altos de 79% se obtiene a un pH de 3.0 y los valores mas bajos de 71% se obtienen a pH 4.5, lo mismo se observa en la grafica de las temperaturas probadas donde los valores mas altos de 68 a 72% se obtienen a 30°C mientras que en la temperatura a 35°C se alcanzan valores de eficiencias mas bajos de 56%.

6.4 OPTIMIZACION DE pH Y TEMPERATURA EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM).

6.4.1 1º Diseño Factorial

De acuerdo con el primer diseño factorial se realizaron 8 cinéticas con diferentes valores para las variables X_1 y X_2 (tabla 3). La producción de alcohol en g/l y el consumo de azúcares reductores totales a los diferentes tiempos de muestreo se pueden apreciar en las figuras de la 22 a la 29. En la figura 22 se observa una ligera fase de adaptación durante las primeras 8 h de fermentación, a partir del cual se logra una producción lineal hasta las 24 h de fermentación, donde posteriormente se estabiliza la producción hasta las 48 h que corresponden al tiempo final de muestreo, alcanzándose una producción de 15.2 g/l tiempo en el cual la concentración final de azúcares totales era de 36.5 g/l y la población dentro de los geles de 4×10^6 cel/gel. En la figura 23 se observa un tiempo de adaptación de 12 h a partir de lo cual la producción de alcohol es lineal alcanzando una máxima producción de alcohol de 31.4 g/l a las 48 h de fermentación, no habiéndose observado un estabilidad de la producción, el consumo de azúcares fue gradualmente en aumento conforme se producía el alcohol y la población final dentro de los geles fue de 6×10^6 cel/gel. En la figura 24 se observa el mismo tiempo de adaptación de 8 h que se observó en el experimento anterior, teniendo despues una producción lineal de alcohol hasta las 24 h, quedando posteriormente estabilizada la producción alcanzándose 13.6 g/l de alcohol, el azúcar residual fue de 56.0 g/l y la población dentro de los geles fue de 2×10^6 cel/gel.

En la figura 25 podemos ver que existe una producción lineal de alcohol desde el inicio de la fermentación y a partir de las 24 h hasta las 48 h es estabilizada la producción en la cual se obtiene 26.0 g/l de alcohol, la concentración final de azúcar fue de 22 g/l, la población dentro de los geles permaneció constante (5×10^6 cel/gel) durante las primeras 24 h, sin embargo al término de la fermentación se reporta una población de 3×10^6 cel/gel. En las figuras 26 y 27 se observa una similitud entre ambos, puesto que tienen el mismo tiempo de adaptación (4 h) y a partir del cual comienza una producción lineal de alcohol, siendo hasta las 52 h donde se alcanza una máxima producción de alcohol 23.0 g/l en ambos casos, tiempo en el cual la concentración de azúcares finales fue de 21.4 y 18.6 g/l respectivamente, la población dentro de los geles (3×10^6 cel/gel) permanece constante durante toda la fermentación en ambos experimentos. En la figura No.28 se observa que a medida que aumenta la producción de alcohol disminuye la cantidad de azúcares reductores en el medio, alcanzándose una máxima producción de alcohol de 27.0 g/l a las 48 h de fermentación tiempo en el cual la concentración de azúcares era de 12 g/l y la población dentro de los geles de 3×10^6 cel/gel. En la figura 29 se observa una producción de alcohol un poco mas lineal que en el exp. anterior y por consiguiente se logra una mayor producción de alcohol de 32.2 g/l a las 48 h de fermentación tiempo en el cual la concentración de los azúcares era 6 g/l y la población dentro de los geles de 3×10^6 cel/gel.

Los resultados del primer diseño factorial, tomando como respuestas el % de eficiencia, rendimiento (Y_p/s) y productividad total de alcohol en g/l.h se muestran en la tabla 15, donde se puede observar que en el exp. No. 2 que corresponde a un pH de 2.5 y a una temperatura de 30°C se obtienen los valores mas altos en cuanto a eficiencia de fermentación y rendimiento lográndose un 77.4% y 0.3953 respectivamente. También se puede apreciar que la eficiencia mas baja de 50% y el rendimiento mas bajo de 0.2559 se obtuvieron en el exp. No. 6 con un pH de 3.5 y una temperatura de 34°C.

La productividad mas alta se obtuvo en el exp. No. 8 que corresponde a un pH de 3.5 y 34°C, en donde se alcanza un valor de 0.6708 g/l.h, observandose productividades mas bajas en los demas experimentos.

Los resultados se sometieron a un análisis de regresión múltiple para cada una de las respuestas determinadas (anexo 1). El coeficiente de regresión para el modelo lineal fue de 0.3159, 0.3150 y 0.4919 para las respuestas de eficiencia de fermentación, rendimiento y productividad total de alcohol en g/l.h.

En las tablas 16, 17 y 18 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza para el ajuste al modelo lineal en la eficiencia de fermentación, rendimiento y productividad de alcohol, donde se puede observar que la F calculada es mucho menor que la F de tablas en ambos casos.

6.4.2 2º Diseño Factorial

De acuerdo con el segundo diseño factorial se realizaron 4 experimentos más, cuyas gráficas del consumo de azúcares reductores totales y producción de alcohol en g/l se pueden observar en las figuras 30,31,32 y 33 para los experimentos 9,10,11 y 12 respectivamente, en donde podemos ver que en el exp. No. 9 (fig. 30) existe una fase de adaptación de aproximadamente 12 h, posteriormente comienza paulatinamente una producción de alcohol lineal alcanzándose una máxima producción de alcohol de 12 g/l a las 48 h, tiempo en el cual la concentración de azúcares era de 66.6 g/l y la población dentro de los geles de 2×10^6 cel/gel. Contrariamente se observa que en el exp. No. 10 (fig.31) la producción de alcohol fue casi lineal desde el inicio de la fermentación hasta aproximadamente 32 h de fermentación donde se alcanza una producción de alcohol de 24.1 g/l, tiempo en el cual el azúcar final era de 48.0 g/l y la población de 3×10^6 cel/gel observándose posteriormente una estabilización. En el exp.No. 11 (fig.32) se observa que la producción de alcohol fue lineal desde el inicio de la fermentación alcanzándose una máxima producción de alcohol de 27.0 g/l a las 48 h, donde la concentración final de azúcares era de 45 g/l y la población dentro de los geles de 4×10^6 cel/gel. En el exp. No. 12 (fig.33) se observa una ligera fase de adaptación de 8 h en donde posteriormente comienza una producción de alcohol mas o menos lineal durante toda la fermentación, no observándose una estabilidad durante el tiempo que se siguió la fermentación, la máxima producción de alcohol se obtuvo a las 52 h de fermentación la cual fue de 26.0 g/l reportándose una concentración de azúcar final de 15 g/l y una población de 4×10^6 cel/gel.

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos en el segundo diseño factorial, tomando como respuestas las mismas que en el primer diseño. En ella se puede observar que las eficiencias de fermentación mas altas de 62.7%,62.5% y 63.3% y los rendimientos mas altos de 0.3202, 0.3191 y 0.3230 se obtuvieron en los experimentos 9,10 y 11 respectivamente. En cuanto a la productividad se puede ver que existe una máxima productividad de alcohol en g/l.h de 0.5666 en el experimento No. 11 mientras que en los demás experimentos se obtienen valores mas bajos.

Los resultados obtenidos en los dos diseños factoriales, se sometieron conjuntamente a un análisis de regresión múltiple (anexo 2), obteniéndose un coeficiente de resgresión para el modelo de segundo orden de 0.7208625, 0.7215739 y 0.6633128 para las respuestas de eficiencia de fermentación, rendimiento y productividad total en g/l.h respectivamente.

La figura 34 muestra la forma básica de la superficie de respuesta para la eficiencia de fermentación la cual pertenece a una meseta de mínimos y las figuras 35 y 36 muestran los contornos de esta superficie donde se puede observar el área donde se alcanzan eficiencias de 53 a 65% y de 65 a 95 % respectivamente. En estas se observa que a un rango de pH de 3.0 a 3.5 con un rango de temperatura de 38 a 40°C se obtienen eficiencias bajas del 52 %; sin embargo conforme se toman valores bajos de temperatura al igual que el pH aumenta la eficiencia de fermentación, es decir que a un rango de temperatura de 22 a 25°C con un rango de pH de 1.5 a 2.5 se obtiene una eficiencia de fermentación del 95%.

La figura 37 muestra la forma básica de la superficie de respuesta para rendimiento la cual pertenece a una meseta de mínimos, en la figura 38 se observan los contornos de esta superficie en donde existen rendimientos de 0.27 a 0.35, y en la figura 39 son ampliados estos contornos de 0.30 a 0.45, observándose un comportamiento similar al obtenido en la eficiencia de fermentación, es decir que a medida que se disminuye la temperatura a un rango de 32 a 23 el rendimiento aumenta, también se observa que en un rango amplio de pH de 2.5 a 5.5 con una temperatura constante de 26°C se obtienen rendimientos (Y_p/s) entre 0.40 y 0.45.

La figura 40 muestra la forma básica de la superficie de respuesta para la productividad de alcohol en g/l.h la cual se caracteriza por presentar una forma de silla de montar. La figura 41 muestra los contornos de esta superficie de .40 a .60 g/l.h en donde se puede apreciar una zona de valores mínimos de 0.45 en un rango de pH de 3.5 a 4.5 y con un rango de temperatura de 36 a 41°C. posteriormente en la figura 42 se muestran los contornos mas amplios del .50 a .80 aquí se observa mas claramente que conforme se disminuye el rango de temperatura aumenta la productividad por otro lado el utilizar un rango amplio de 2.0 a 4.5 con una temperatura de 27°C aprox. se obtienen productividades del 0.75 al .80 y conforme se aumenta la temperatura la productividad decrece considerablemente.

6.5 VALIDACION DE LAS ECUACIONES OBTENIDAS PARA LA EFICIENCIA DE FERMENTACION, RENDIMIENTO Y PRODUCCION DE ALCOHOL EN g/l.h.

En la figura 43 se muestra la cinética de fermentación a un pH de 2.0 y a una temperatura de 30°C correspondiente al experimento No. 13 en donde se observa una ligera fase de adaptación durante las primeras 24 h de fermentación tiempo en el cual comienza paulatinamente una producción lineal de alcohol alcanzándose una máxima producción de 17 g/l a las 48 h de fermentación y posteriormente es observada una estabilidad, la concentración final de azúcares fue de 64.0 g/l y la población dentro de los geles de 3×10^6 cel/gel con una viabilidad de 65 %.

El segundo experimento de validación (pH de 2.5 y 30°C) se muestran en la figura 44 donde se observa una ligera fase de adaptación durante las primeras 8 h de fermentación observándose una producción lineal hasta las 24 h en la cual se alcanza una máxima producción de alcohol de 16.0 g/l y posteriormente es observada una estabilización hasta el termino de la fermentación de 52 h donde se reporta una concentración de azúcares de 34.0 g/l y una población dentro de los geles de 4×10^6 con una viabilidad de 70%.

La tabla 20 muestra las eficiencias de fermentación predichas de 83.31 y 75.53 contra las eficiencias experimentales de 69.0 y 77.37 obteniendo un % de error de 17.19 y 2.43 para los experimentos 13 y 14 respectivamente.

Los rendimientos predichos fueron de 0.4237 y 0.3826 contra los rendimientos experimentales de 0.3510 y 0.3953 lo que da un % de error de 17.15 y 3.31 respectivamente.

Los valores de la producción de alcohol en g/l.h predichos fueron 0.4752 y 0.5661 contra los valores experimentales de 0.2807 y 0.63 lo que da un % de error de 40.9 y 11.2 para los experimentos 13 y 14.

6.6 FERMENTACION CON NUTRIENTES

En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de fermentación, en ella se puede observar la producción de alcohol en g/l y el consumo de azúcares reductores totales, la producción de alcohol fue en aumento conforme se consumían los azúcares reductores totales, teniendo una producción de alcohol de 17.0 g/l durante el tiempo de fermentación de 52 h, tiempo en el cual la concentración final de azúcar era de 61.0 g/l y la población dentro de los geles de 3×10^6 . La eficiencia de fermentación rendimiento y productividad de alcohol fueron de 84.3%, 0.43 y 0.236 g/l.h respectivamente los cuales a excepción de la productividad, fueron mas altos que los obtenidos en el experimento No. 14 a las mismas condiciones de pH y temperatura.

VII. DISCUSION

7.1 ESTANDARIZACION DE TECNICAS ANALITICAS

De acuerdo con la tabla 21 que ilustra los coeficientes de correlación mínimos aceptables (dependiendo del número de puntos que se prueban) para considerar un buen ajuste al modelo lineal con un 95 y 99 % de confianza, se puede observar que el coeficiente mínimo aceptable con un 99 % para ART es de 0.6835 y 0.7079 para la determinación de etanol; puesto que los coeficientes de correlación obtenidos para las curvas de calibración utilizadas en la determinación de ART y etanol fueron de 0.99972 para 11 puntos y 0.99952 para 10 puntos en etanol, se demuestra así que las curvas de calibración utilizadas para la determinación de ART y etanol presentan un 99 % de confianza y pueden ser utilizadas para predecir la concentración a partir de una absorbancia dada.

7.2 DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE VARIABLES DE OPERACION

En base a los trabajos realizados por Bravo y González., 1990 en los cuales al realizar varios experimentos en un reactor de lecho fluidizado utilizando melaza de betabel y células de *S. cerevisiae* inmovilizada en ácido alginico, estudiaron la influencia de varios parámetros de operación como son tiempo de residencia (velocidad de flujo), diámetro de la esfera y concentración del sustrato, concordaron en sus resultados que el utilizar flujos de alimentación muy altos decrece la productividad, por otro lado probaron dos diámetros de esferas (3.5mm y 1.6mm) concluyendo que con las esferas de 1.6 mm de diámetro se obtiene un mayor rendimiento del sustrato y una mayor productividad, también reportan que a una concentración de sacarosa de 10% se logra mayor eficiencia en todo el proceso debido probablemente a la pequeña resistencia interna de la matriz del gel. En base a estos resultados se hicieron varios experimentos con el fin de determinar que tamaño de esfera, concentración del sustrato, así como la velocidad de flujo se emplearían en los experimentos posteriores a nuestro trabajo.

7.2.1 Pruebas de velocidad de flujo

Las pruebas de almacenamiento de los geles se realizaron debido a que por lo general, las cinéticas de fermentación fueron realizadas al día siguiente al de la inmovilización celular por lo tardado de ésta técnica, siendo necesario el almacenamiento de los geles por 24 h a 5°C, pero era necesario determinar en que solución podrían almacenarse sin sufrir ablandamiento y a la vez sin alterar la viabilidad de la población celular contenida en los geles. Como se comenta en los resultados los geles que tardaron mas tiempo en disolverse por completo son los obtenidos inmediatamente después de la inmovilización, es decir, sin almacenamiento, siguiéndole los geles que fueron almacenados en el CaCl_2 que se utilizó en la inmovilización, por lo que lo mas conveniente sería realizar las fermentaciones inmediatamente después de inmovilizar la levadura, en caso de no ser posible esto, almacenarlos en el cloruro de calcio que se utilizó en la inmovilización. Definitivamente almacenarlos en agua estéril no es conveniente ya

que el ablandamiento excesivo que sufren, lo cual se refleja en el tiempo de desintegración de los mismos, provocaría ruptura de los geles en el reactor con lecho fluidizado ya que se manejan flujos altos y por largo tiempo. El factor de viabilidad y población celular no se afectó con las formas de almacenamiento probadas, por lo que sería indistinto cualquiera pero el factor de resistencia del gel es crítico y es el que determinó la elección de la solución de cloruro de calcio utilizado en la inmovilización.

Con el objetivo de determinar la velocidad de flujo necesaria para lograr el lecho fluidizado de los geles en el reactor, se realizaron pruebas para medir bajo diferentes condiciones los flujos que se obtenían a las diferentes velocidades del control de una bomba peristáltica con cabezal No. 18. La primera prueba se realizó con melaza de caña a 21 °Bx, concentración que se pensaba emplear para las fermentaciones. Los resultados demostraron que es necesario un flujo muy grande (31.3 l/h) para lograr que se comenzara a expandir la altura del lecho original en el reactor, sin embargo no se pudo determinar a que flujo se logró expandir el lecho a lo largo de toda la columna del reactor debido a que los geles no se alcanzaban a distinguir por el color tan oscuro de la melaza, por lo que se decidió realizar un segundo experimento empleando únicamente agua destilada. En este experimento se pudo observar el efecto que ejerce en el flujo obtenido la densidad del medio, ya que a los mismos valores de velocidad probados, se obtuvieron flujos de alimentación mas grandes logrando que la altura del lecho original de geles comenzara a expandirse a un flujo de 24 l/h, y a un flujo de 68 l/h se logró la expansión en toda la columna del reactor. Puesto que estos flujos son muy altos todavía, lo cual impediría una adecuada conversión de azúcares a alcohol y adicionalmente se requeriría de cantidades de mosto grandísimas si se pretende un proceso en continuo, se decidió probar geles con diámetro inferior a fin de determinar si a flujos menores se podía lograr el lecho fluidizado en el reactor y a la vez se decidió volver a probar la melaza ya que la prueba en agua no sería representativa porque las fermentaciones se realizan con mosto de melaza. En este experimento se obtuvieron velocidades de flujo superiores para algunas de las velocidades probadas, a las obtenidas con geles de diámetro de 2.5 mm en melaza, y la expansión del lecho de geles comenzó a un flujo de 19.6 l/h la cual es inferior incluso al flujo necesario para lograr ésto en la prueba con agua destilada, pero para lograr la completa expansión del lecho fue necesario un flujo de 84.7 l/h. Estos resultados no fueron muy alentadores debido a que el propósito de emplear geles de diámetro inferior era poder lograr la completa expansión del lecho de geles a una velocidad que no fuera muy grande y esto no fue posible ya que el flujo necesario para lograr ésto fue alto, adicionalmente el tiempo que se requiere para inmovilizar geles de menor diámetro es mucho mas largo. Probablemente la concentración de azúcar (21°Bx) en el medio era muy alta para permitir que los geles se movieran con facilidad por lo que se decidió realizar pruebas con diferentes concentraciones de azúcar en el medio y emplear los geles con diferentes diámetros para cada una de ellas.

En base a los resultados obtenidos en esta prueba, se decidió emplear una concentración de 15°Bx, la cual aportara una buena cantidad de azúcares para la producción de alcohol, un flujo de 30 l/h (velocidad 2.5) con lo cual se logra la completa expansión de los geles en la columna y un diámetro de gel de 2.5 mm. Las pruebas a 15°Bx no se pudieron realizar con los geles de 1.6 mm de diámetro debido a que éstos se rompieron en la prueba de 10°Bx a la velocidad 4 del control de la bomba peristáltica, pero considerando la diferencia tan grande en el tiempo requerido para la inmovilización, se eligió el diámetro 2.5 mm. Podría ser conveniente en un futuro probar nuevamente los geles con diámetro inferior y evaluar el rendimiento y eficiencia durante una fermentación alcohólica en el reactor, empleando melaza a 15°Bx, pues aparentemente se obtienen flujos mas altos y por lo tanto se expande el lecho a velocidades inferiores del regulador, para este diámetro de gel comparado con el de 2.5 mm; esto probablemente este relacionado con lo comentado por Bravo y González (1990), a que pudiese haber menor resistencia de la matriz del gel a la transferencia de masas.

7.2.2 Pruebas de pH del medio de alimentación

Debido a que la velocidad de flujo de alimentación del medio requerida para obtener el lecho fluidizado es alta, se decidió que éste estuviera con recirculación al reactor el tiempo necesario para lograr la máxima conversión posible de los azúcares del medio a alcohol, y posteriormente, se pasara en continuo. Dado que las levaduras estaban atrapadas dentro de un gel y que esto permitía alterar las condiciones ambientales necesarias para una óptima producción de alcohol, se decidió probar pH de 4.5 y 3.0 en el medio de fermentación y determinar si existía diferencia en el rendimiento y eficiencia de fermentación obtenidos para cada caso, resultando mayores rendimientos y eficiencias de fermentación en los experimentos con un pH de 3.0. nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Buzás, Dallmann y Szajani en 1988, en donde utilizan un rango de pH de 2.5 a 4.0 tanto en la fermentación con levadura libre como en la fermentación con levadura inmovilizada obteniéndose una fermentación mucho mas eficiente con levaduras inmovilizadas a un pH de 2.5 deduciendo que con pH menores que el óptimo (4.5) para levaduras libres, se obtiene una mayor eficiencia de fermentación.

7.2.3 Pruebas empleando levadura liofilizada para la inmovilización

Se decidió realizar pruebas empleando levadura liofilizada para la inmovilización, en lugar del procedimiento tradicional de crecerla en medio líquido y posteriormente obtener una crema con la cual se realiza la inmovilización. Esto con el objetivo de ahorrarnos mucho trabajo y sobre todo tiempo y así poder realizar las cinéticas de fermentación alcohólica en el reactor en menor tiempo, ya que la diferencia entre utilizar una u otra forma para inmovilizar podía representar una semana menos de tiempo previo para poder realizar cada una de las fermentaciones en el reactor, pero sería necesario determinar en base a rendimientos y eficiencias de fermentación, si emplear una levadura liofilizada afectaría negativamente estos parámetros.

Los resultados obtenidos en la fermentación con levadura liofilizada durante 72 h, pusieron de manifiesto una fase de adaptación larga de aprox. 32 h, durante las cuales la población celular, la producción de alcohol y el consumo de azúcares permaneció constante y sin cambio notorio al valor inicial, probablemente esto sea debido a que la levadura liofilizada requiere activarse nuevamente ya que estuvo sin actividad metabólica por un tiempo considerable (aprox. 1 año tenía de liofilizada), sin embargo, la producción de alcohol, el rendimiento y la eficiencia de fermentación fueron mayores a los que se habían obtenido anteriormente bajo circunstancias similares pero con crema de levadura activa. En base a estos resultados se decidió que antes de introducirlos al reactor, los geles con levadura liofilizada fueran incubados por 42 h, con el objetivo de permitir su activación y reproducción en el interior del gel antes de realizar la fermentación alcohólica en el reactor. Como ya se comentó en el capítulo de resultados, no hubo una fase de adaptación y la producción de alcohol aumentó gradualmente durante la fermentación, así como el consumo de azúcares reductores totales. El rendimiento y eficiencia de fermentación obtenidos fueron mayores todavía a los alcanzados en el experimento anterior, con lo cual quedó demostrado que es factible emplear levadura liofilizada para la inmovilización lo que nos da un ahorro de trabajo y tiempo previo siendo posible realizar las fermentaciones en el reactor cada semana en lugar de cada quince días.

Una vez establecido esto, se decidió realizar nuevamente fermentaciones con diferentes pH empleando levadura liofilizada para la inmovilización, confirmándose nuevamente que el rendimiento y eficiencia de fermentación mas alto se obtuvieron con el pH de 3.0.

7.2.4 Pruebas de temperatura

En base a una comparación de células libres con células inmovilizadas por Chibata y Tosa en 1979, demuestran que las células inmovilizadas son más resistentes a cambios de temperatura; ellos prueban temperaturas de 45 y 60°C en un medio sintético en el cual concluyen que las células inmovilizadas tienen una mayor resistencia a los cambios en su medio externo, en base a estos resultados se decidió probar diferentes temperaturas del medio y determinar si existía diferencia en el rendimiento y eficiencia de fermentación obtenidos para cada caso. En estos experimentos se obtuvo mejores resultados a una temperatura de 30°C, sin embargo en las fermentaciones a 35°C el rendimiento y eficiencia obtenidos fueron bajos siendo necesaria una posterior confirmación y análisis estadístico para determinar si realmente tiene un efecto significativo sobre las respuestas y de ser así posteriormente optimizar esta variable.

7.3 ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

Se realizaron análisis de varianza para determinar si existía una diferencia significativa en la eficiencia de fermentación: debido a diferentes valores de pH y/o las diferentes temperaturas probadas.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico ponen de manifiesto que si existe una diferencia significativa entre los pH usados así como las temperaturas, ya que la F calculada en ambos casos fue mayor que la F de tablas rechazándose así la hipótesis nula en ambos casos. En base a las figuras 20 y 21 se puede decir que de los dos valores probados para pH y temperatura, los mejores resultados de eficiencia de fermentación se obtuvieron a pH 3.0 y 30°C.

7.4 OPTIMIZACION DE pH Y TEMPERATURA EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM).

En base a trabajos realizados por Eroshin y Skryabin, 1976; en los cuales cuantificando el coeficiente de consumo del sustrato optimizan el pH y la temperatura (medio sintético) donde concluyeron que a un pH de 4.1 y a una temperatura de 28.5°C se logra una máxima producción del sustrato; y puesto que el pH y temperatura son factores muy importantes y determinantes para lograr un buen proceso de fermentación; y que incluso generalmente están correlacionados, se decidió determinar mediante la metodología de superficie de respuesta, los valores óptimos de estas dos variables con el fin de lograr mayores eficiencias, rendimientos y productividades en el proceso de fermentación alcohólica con células inmovilizadas.

Por otro lado, en otros experimentos realizados por Chibata y Tetsuya., 1979 donde prueban rangos de temperaturas de 45 a 60°C en un medio sintético con levaduras inmovilizadas se demostró que éstas levaduras atrapadas en el gel de alginato de calcio resistían a cambios bruscos de temperatura; tomándose también estos resultados como referencia

7.4.1 1er. Diseño Factorial

Como se mencionó con anterioridad en los antecedentes, una de las grandes ventajas de la metodología conocida como RSM es que emplea un diseño factorial que selecciona un grupo de experimentos (combinación de valores inferiores, superiores y centrales del rango seleccionado), de todos los experimentos posibles lo cual reduce grandemente el número total de experimentos a realizar, para encontrar así los valores óptimos con ahorro de tiempo y dinero.

los resultados en función de la eficiencia de fermentación, rendimiento y productividad total en g/l.h para las variables de pH (2.5 - 4.5) y temperatura (30 - 38) del primer diseño factorial (tabla 3) al ser sometidos a un análisis de regresión múltiple (anexo 1) se obtuvieron coeficientes de regresión de 0.3159, 0.3150 y 0.4919 respectivamente, lo cual demuestran falta de ajuste a un modelo lineal; confirmandose esto con el análisis de varianza realizado en donde la F calculada-

fue menor que la F de tablas con lo cual se acepta la hipótesis nula de que no hay un ajuste al modelo lineal, lo cual demostró que estábamos en una región cercana al óptimo donde existe curvatura.

7.4.2 2do. Diseño Factorial

En base a los resultados obtenidos en el primer diseño factorial se decidió realizar un segundo diseño factorial incluyendo los términos rotatables (tabla 4) para hacer el ajuste a un modelo de segundo orden, la región explorada se amplió de 2.09 a 4.9 para pH y para temperatura de 30 a 39°C, con el objetivo de localizar la zona óptima con precisión.

El análisis de regresión múltiple de los resultados mostraron un ajuste al modelo polinomial de segundo orden (anexo 2) con un coeficiente de regresión de 0.7208 para eficiencia de fermentación, 0.7215 para rendimiento y 0.6633 para productividad, con lo cual era notorio que existía un ajuste al modelo de segundo orden para las 2 primeras respuestas y en menor grado para la respuesta de productividad lo cual indicó que estábamos ya en la región de los óptimos.

En las figuras 35 y 37 se pueden observar las superficies de respuesta obtenidas para la fermentación y rendimiento las cuales corresponden a una meseta de mínimos y en la figura 40 se muestran las productividades obtenidas la cual tiene una forma de silla de montar donde se aprecian valores mínimos. Los contornos de estas superficies se observan en las figuras 35, 36, 38, 39, 41 y 42 respectivamente. en donde podemos observar que en la región de 3.0 - 3.5 para pH y de 36 - 38°C para temperatura se obtienen las mas bajas eficiencias de fermentación y las mas altas a pH de 1.5 - 5.5 y a temperatura de 22°C. Así mismo a partir de estas figuras donde son mostradas las eficiencias se puede observar que las variables pH y temperatura están estrechamente ligados pero tiene mayor influencia sobre las respuestas la temperatura es decir que tomando valores fijos de pH (2.5) y variar la temperatura (fig. 36) podemos ver que la respuesta va disminuyendo drásticamente, por el contrario si mantenemos fija una temperatura como 25°C y voy variando el pH, la caída en la respuesta es mas lenta.

Los contornos para la respuesta de rendimiento son observados en las figuras 38 y 39, en donde podemos ver que en la región de 3.0 a 3.5 para pH y de 35 a 40°C para temperatura se obtienen los más bajos rendimientos y los más altos rendimientos a pH de 1.5 a 5.5 y a temperaturas de 22 a 24°C; lo que confirma que la variable de pH no afecta la respuesta tanto como los valores de temperatura; por lo que se puede concluir que la variable X_2 (temperatura) es la que tiene mayor influencia en la respuesta, ya que si mantenemos fijo un pH (ejem:2.5) y vamos variando la temperatura vamos cayendo en diferentes zonas de rendimiento muy rápidamente. En el caso contrario, si mantenemos fija la temperatura (31°C) y vamos variando el pH podemos ver que prácticamente estaremos siempre en una misma zona para rendimiento, aunque ambas variables tienen efecto sobre la respuesta.

Las figuras 41 y 42 muestran los contornos para la respuesta de productividad total en g/l.h en donde podemos ver que en la región de pH de 3.5 a 4.5 y en la región de temperatura de 36 a 38°C se obtienen las mas bajas productividades y las más altas se obtienen a pH de 2.0 a 5.0 y a temperatura de 25 a 26°C. Así mismo se puede observar que las dos variables pH y temperatura tienen la misma influencia en la productividad en un rango de 2.0 - 3.0 de pH y 30 - 40°C (fig. 41), ya que si variamos cualquier variable la productividad baja considerablemente, pero la situación cambia cuando el rango de temperatura es inferior a 30°C (30-25°C, fig.42), ya que en este caso, se puede ver que la variación de pH a una temperatura fija, no causa un efecto pronunciado en la productividad.

Todas estas gráficas que muestran los contornos de la superficie de respuesta son muy útiles para poder visualizar el efecto que tendrán las variables sobre la respuesta de interés, y en nuestro caso podemos concluir que la temperatura es la variable que ejerce mayor influencia sobre las diferentes respuestas analizadas, y que a una temperatura de 30°C y hacia abajo de este valor, son las mas adecuadas para obtener altas respuestas, en el proceso de producción de alcohol empleando células inmovilizadas, prefiriéndose emplear pH ácido (2.5) para impedir contaminación por bacterias y por que además en el caso de rendimiento y eficiencia de fermentación, es mas favorable para obtener los mas altos resultados. La temperatura se decidió fijarla a 30°C como el valor mas conveniente debido a que, dado que la fermentación alcohólica es exotérmica (desprende calor) sería muy costoso el sistema de enfriamiento que se necesitaría para obtener temperaturas de reacción por debajo de 30°C.

7.5 VALIDACION DEL MODELO

Las ecuaciones finales obtenidas en la regresión para el modelo de segundo orden de la eficiencia de fermentación, rendimiento y productividad representa el modelo matemático con el cual se puede predecir la respuesta que se alcanza según los valores asignados para las variables X1 y X2.

Se probó este modelo eligiendo los valores de pH de 2.0 y 2.5 puesto que nuestra ecuación al igual que los contornos de la superficie de respuesta obtenida indicaban que en estos rangos se encontraba el óptimo, la temperatura usada en ambos experimentos fue de 30°C, los cuales según la ecuación encontrada para eficiencia de fermentación predecía un 83.31% y 75.53% respectivamente, que al ser analizados contra los valores alcanzados experimentalmente de 69% y 77% con lo cual se obtuvo un error estándar de 17.19 y 2.43 este porcentaje de error esta dado de acuerdo a la diferencia existente entre los valores predichos y experimentales, es decir que el modelo matemático nos indica que obtendremos mayores eficiencias a un pH de 2.0 y por debajo de éste, lo cual no se puede obtener experimentalmente debido a que las condiciones de pH menores de 2.5 no son las óptimas para una fermentación eficiente tomando en cuenta que el rango de pH para crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es 2.4 - 8.6, como lo predice el modelo matemático, el cual no toma en consideración fenómenos biológicos de este tipo, y es por esto el % de error tan grande obtenido en este experimento, no siendo el caso para el experimento No. 14, en donde el valor de

pH probado cae en el rango de crecimiento para *S. cerevisiae*, por lo tanto, en este valor es válida la ecuación, lo que se refleja en el % de error tan pequeño obtenido para las respuestas de rendimiento y eficiencia de fermentación. Con esto concluimos que el pH óptimo encontrado para una buena eficiencia de fermentación es de 2.5.

Los rendimientos esperados mediante la ecuación fueron de 0.4237 y 0.3826 que contra los valores experimentales de 0.3510 y 0.3953 obtenemos un porcentaje de error de 17.15 y 3.3, lo cual nos indica que el modelo matemático al igual que en la eficiencia nos predice valores óptimos de pH de 2.0 y por debajo de este valor; sin embargo con estos parámetros no puede ser posible una fermentación puesto que estos valores son demasiados bajos para que las levaduras realicen satisfactoriamente la fermentación alcohólica como se mencionó anteriormente. Con lo que se concluye que el pH óptimo es de 2.5.

Las productividades esperadas mediante la ecuación fueron de 0.4752 y 0.5661 contra los valores experimentales de 0.2807 y 0.63 obtenemos un porcentaje de error de 40.9 y 11.2, en esta respuesta también obtuvimos valores óptimos de pH por debajo de 2.0 los cuales no pueden ser comprobados experimentalmente debido a que en la práctica no es posible efectuar una fermentación con estas condiciones :por los motivos explicados ya y dado que a un pH de 2.5 el % de error es mayor al 10%, esto quiere decir que la ecuación obtenida para esta respuesta no es confiable, lo cual está relacionado con el hecho de que el coeficiente de determinación para el modelo de 2do. orden fue mas bajo para esta respuesta que para las 2 primeras, lo que significa que para optimizar la productividad hubiese sido necesario realizar mas experimentos (pendiente ascendente) para obtener un modelo matemático confiable, lo cual se reflejaría en un porcentaje de error pequeño para el mismo.

En la tabla 20 se puede observar las cantidades predichas contra las alcanzadas experimentalmente, lo cual pone de manifiesto que el análisis de resultados mediante la metodología de superficie de respuesta es efectiva (siempre y cuando se tengan consideraciones biológicas que el modelo no interpreta) ya que los % de error obtenido para rendimiento y eficiencia, así lo confirman.

Sin embargo, la aplicación estricta que marca el modelo matemático en un contexto industrial no es posible, ya que al hacer el escalamiento como lo demostró Fuentes Ochoa A. 1990, aumenta el % de error; No obstante esto, los valores óptimos encontrados sirven como un marco de referencia para una optimización final con el método de evolución operativa, con el cual se logra un ajuste fino sin cambiar drásticamente los valores de producción y con muy pocos experimentos, lo que es fundamental, ya que en una planta industrial no se puede detener la producción para hacer muchas pruebas experimentales pues esto implica una pérdida considerable en las ganancias.

Casi siempre en un problema se desconoce la relación funcional entre las respuestas y el conjunto de variables independientes. Por ello en la metodología de superficie el primer paso consiste en llevar a cabo o diseñar un modelo que nos prediga una relación entre las respuestas a optimizar con las variables por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre las regiones de las variables independientes (modelo de aproximación de primer orden). El uso de este polinomio es apropiado para determinar si existe poca curvatura en el sistema y en ese caso aproximarnos más rápido al punto máximo; una vez que encontramos la región óptima es conveniente emplear un modelo polinomial cuadrático (segundo orden) ésta superficie contiene términos lineales, términos cuadrados y términos cruzados; el utilizar este modelo nos proporciona el "ascenso a una loma" donde la cima representa el punto máximo de respuesta.

Considerando las ecuaciones obtenidas en análisis de regresión múltiple para cada una de las respuestas se puede apreciar que el origen de la respuesta se encuentra en el centro del sistema ya que los valores de X1 y X2 son negativos esto quiere decir que si movemos en alguna dirección X1 y X2 resultaría una pérdida cuadrática en la respuesta. Por ejemplo; en la respuesta del % de eficiencia encontramos un óptimo para X1 de 2.5 y para X2 de 30°C debido a que X1 es mayor (-63.2571) que X2 (-19.129) esto nos indica que la caída en la respuesta es mayor en la dirección de X1 que en la dirección X2, esto quiere decir que el pH afecta en mayor grado que la temperatura.

7.6 FERMENTACION CON NUTRIENTES

Se realizó una fermentación con nutrientes con el fin de comprobar si existía una diferencia significativa entre el usar un medio con nutrientes y un medio sin nutrientes debido a que en un momento dado podría minimizarse el costo de los procesos de fermentación a gran escala utilizando directamente las melazas de caña, en este trabajo se comprobó que se obtiene mayores rendimientos y eficiencias de fermentación con la adición de nutrientes como Nitrógeno y Fosforo, resultando que en una fermentación a pH de 2.5 y a una temperatura de 30°C sin nutrientes obtenemos 77.37 % de eficiencia de fermentación, un Yp/s de 0.3953 y una productividad total en g/l.h de 0.63. y en una fermentación con nutrientes obtenemos una eficiencia de fermentación de 84.3 %, un Yp/s de 0.43 y una productividad total en g/l.h de 0.24.

VIII. CONCLUSIONES

1.- Se concluye que las curvas de calibración empleadas para la determinación de azúcares reductores totales y etanol son confiables en un 99% y por lo tanto pueden ser utilizadas para predecir la concentración a partir de una absorbancia.

2.- Las condiciones de operación establecidas en un reactor con lecho fluidizado empleando la levadura BCGC L-024 liofilizada e inmovilizada por atrapamiento son las siguientes:

- a). Diámetro de los geles empleados : 2.5 mm
- b). Altura inicial en el reactor: 20 cm
- c) Flujo de alimentación: 30 l/h:
- d). Medio empleado: melaza de caña de azúcar
- e). Concentración de azúcar en el medio: 15°Bx
- f). pH del medio: 3.0
- g). Temperatura del reactor: 30°C
- h). Sistema de flujo del medio: con recirculación por 52 hr.

3.- Es posible utilizar levadura liofilizada para la inmovilización (siempre y cuando los geles obtenidos se incuben previamente por 42 h) lo que trae consigo ahorro de tiempo y trabajo.

4.- El análisis de varianza puso de manifiesto que existe diferencia significativa debido a los dos pH probados y a las temperaturas, en cuanto a eficiencia de fermentación, siendo superior el pH de 3.0 y la temperatura de 30°C.

5.- Mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) se encontró que el pH y la temperatura óptimos para realizar una fermentación eficiente son de 2.5 y 30°C respectivamente y que la variable que ejerce mayor influencia sobre las respuestas analizadas, es la temperatura de reacción.

6.- Los modelos matemáticos obtenidos para eficiencia de fermentación y rendimiento (Y_p/s) son confiables debido al % de error tan pequeño que presentaron.

7.- Los modelos matemáticos obtenidos no contemplan fenómenos biológicos como lo es la inhibición del crecimiento y producción de alcohol para *Saccharomyces cerevisiae* a pH inferiores a 2.4, por lo que es necesario para interpretarlos tomar en cuenta este tipo de consideraciones.

8.- Se concluye que es mejor el utilizar un medio de fermentación con nutrientes (sulfato de amonio y fosfato de amonio), ya que en nuestros resultados se registró una diferencia en las respuestas de eficiencia de fermentación y rendimiento.

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA00441

Autor:

Núñez Vallejo María de la Luz

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Folio Duplicado No. 50 con diferente informacion

VIII. FIGURAS

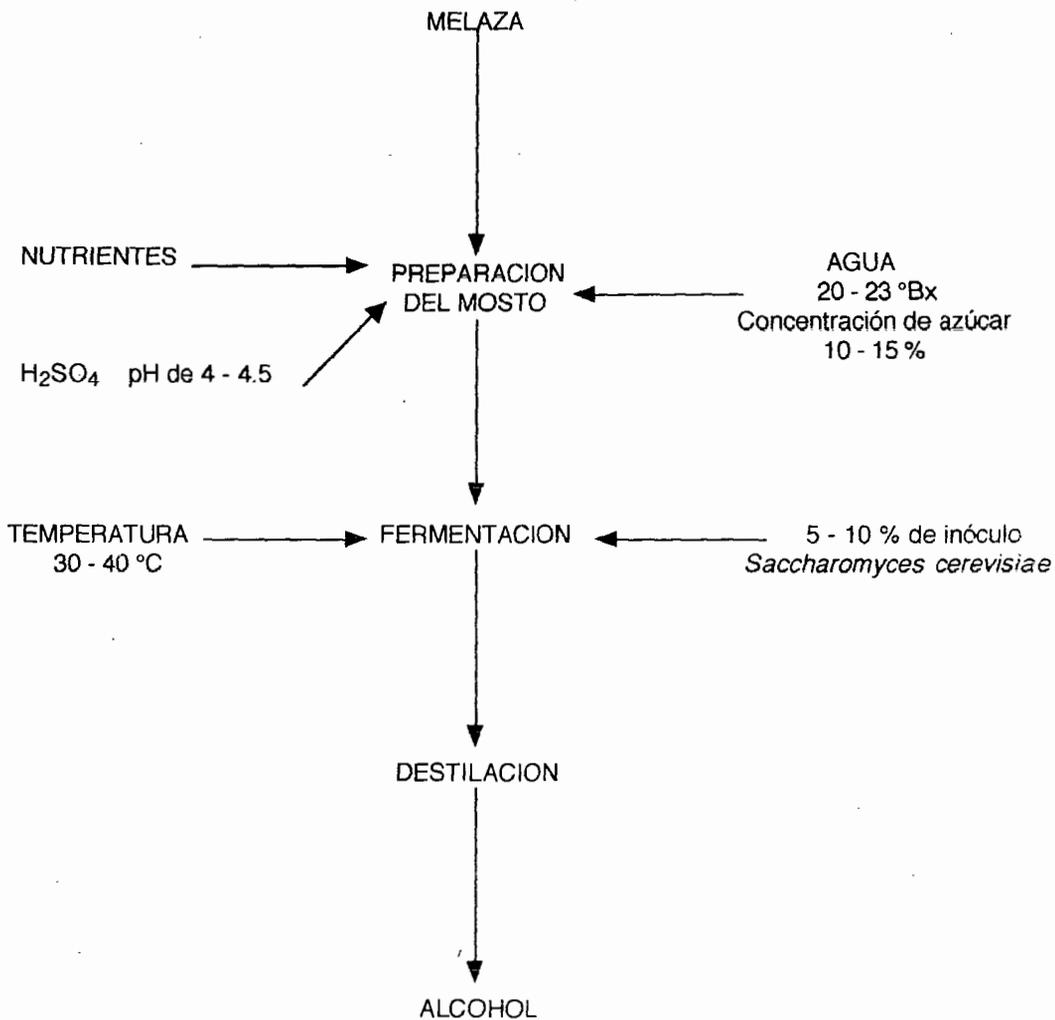


FIG.1 Esquema general de la fabricación de alcohol

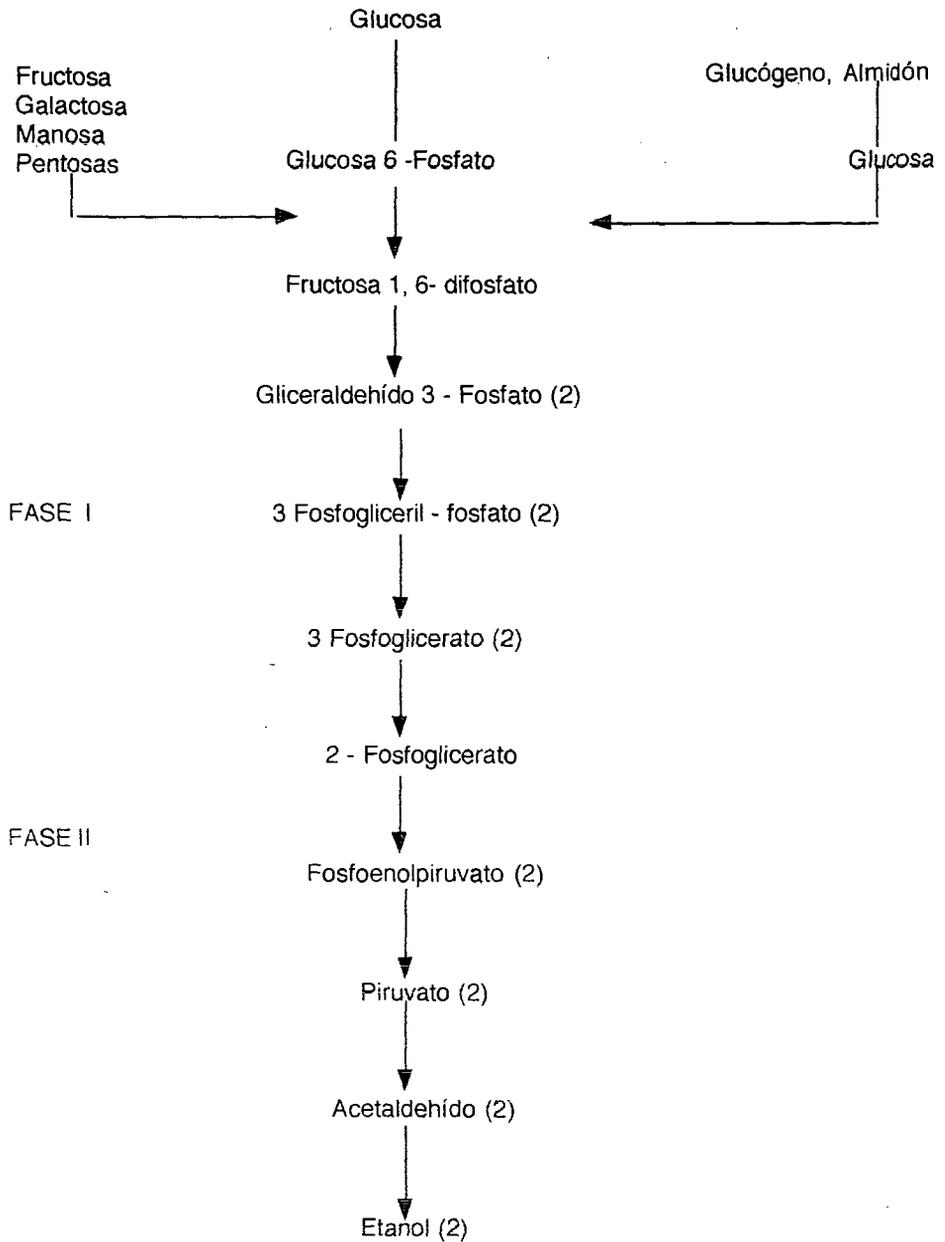


FIG.2 Vía Embden-Meyerof-Parnás (EMP) para la fermentación de glucosa a etanol.

Fuente: (Lehninger, 1985)

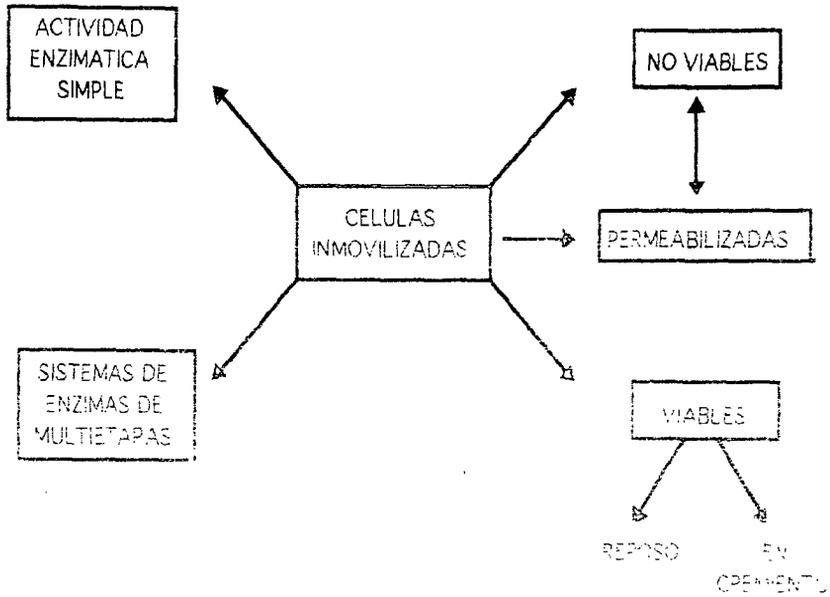


FIGURA 3 ESTADOS DE CELULAS INMOVILIZADAS QUE PUEDEN SER UTILIZADOS.

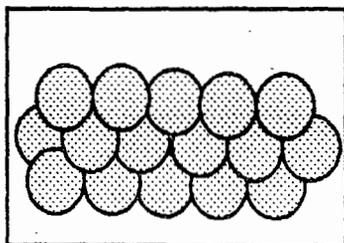


Fig.4a FLOCULACION

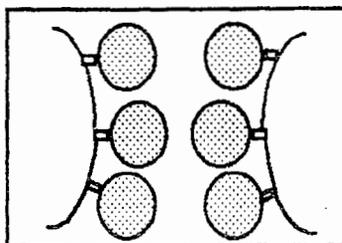


Fig. 4b ENLACE COVALENTE

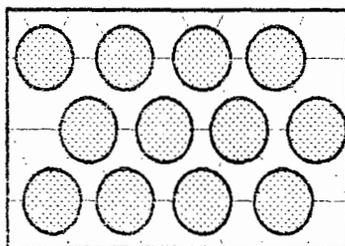


Fig. 4c ESTRECRUZAMIENTO

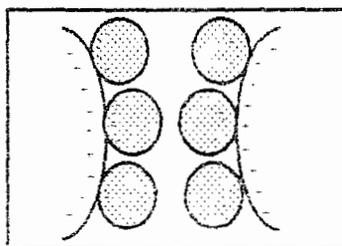


Fig. 4d ADSORCION

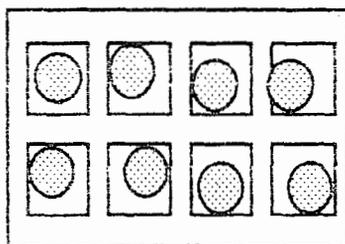


Fig. 4e ATRAPAMIENTO

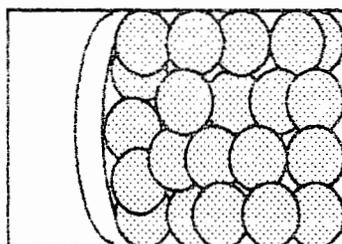


FIG 4f CONFINAMIENTO EN MEMBRANA

FIGURA 4 METODOS DE INMOVILIZACION

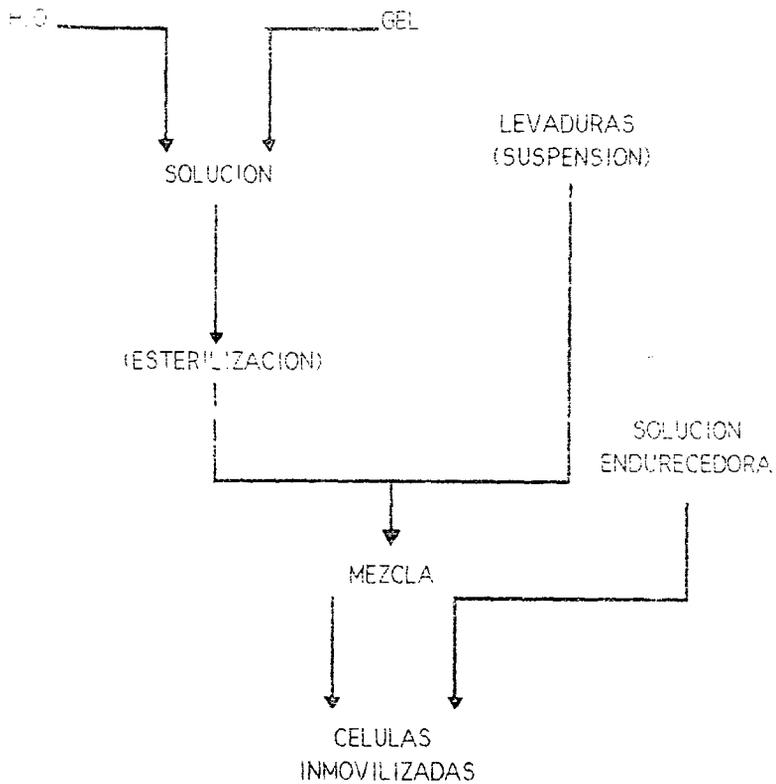


FIGURA 5 ESQUEMA DE LA TECNICA DE INMOVILIZACION CELULAR.

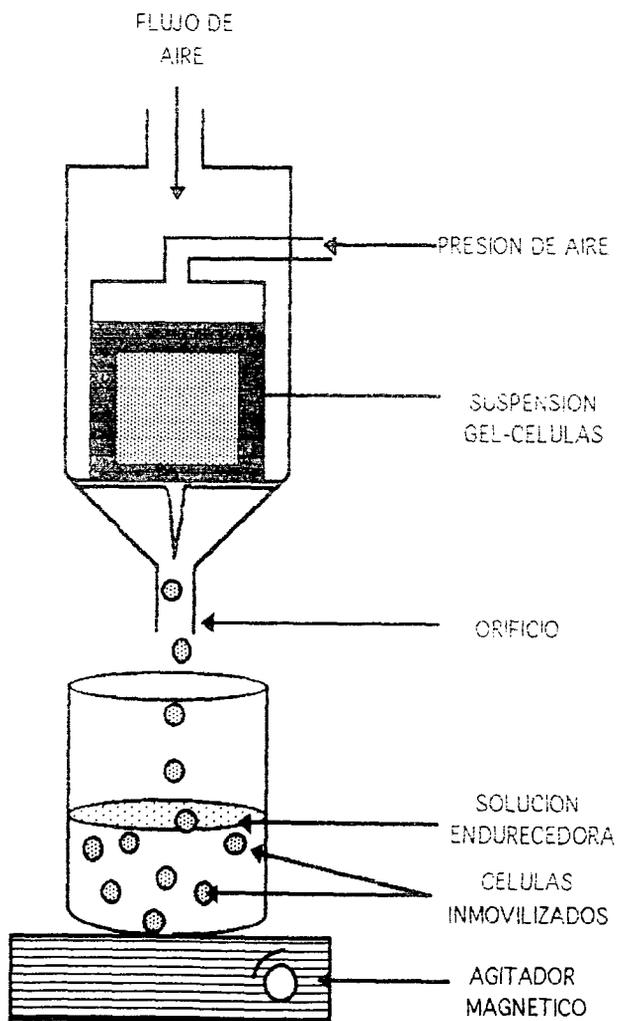
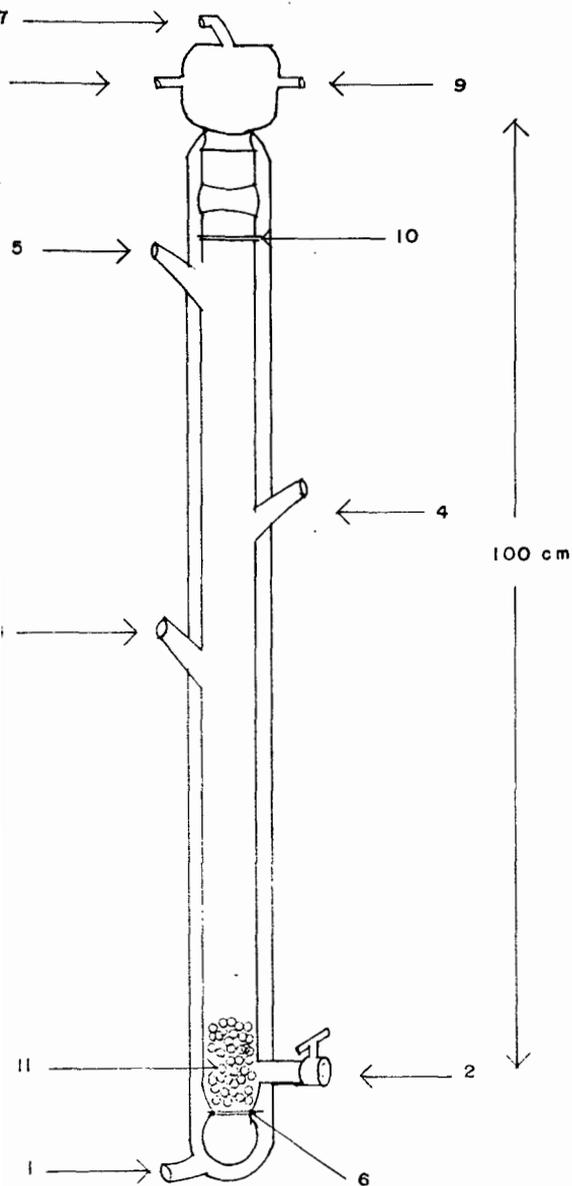
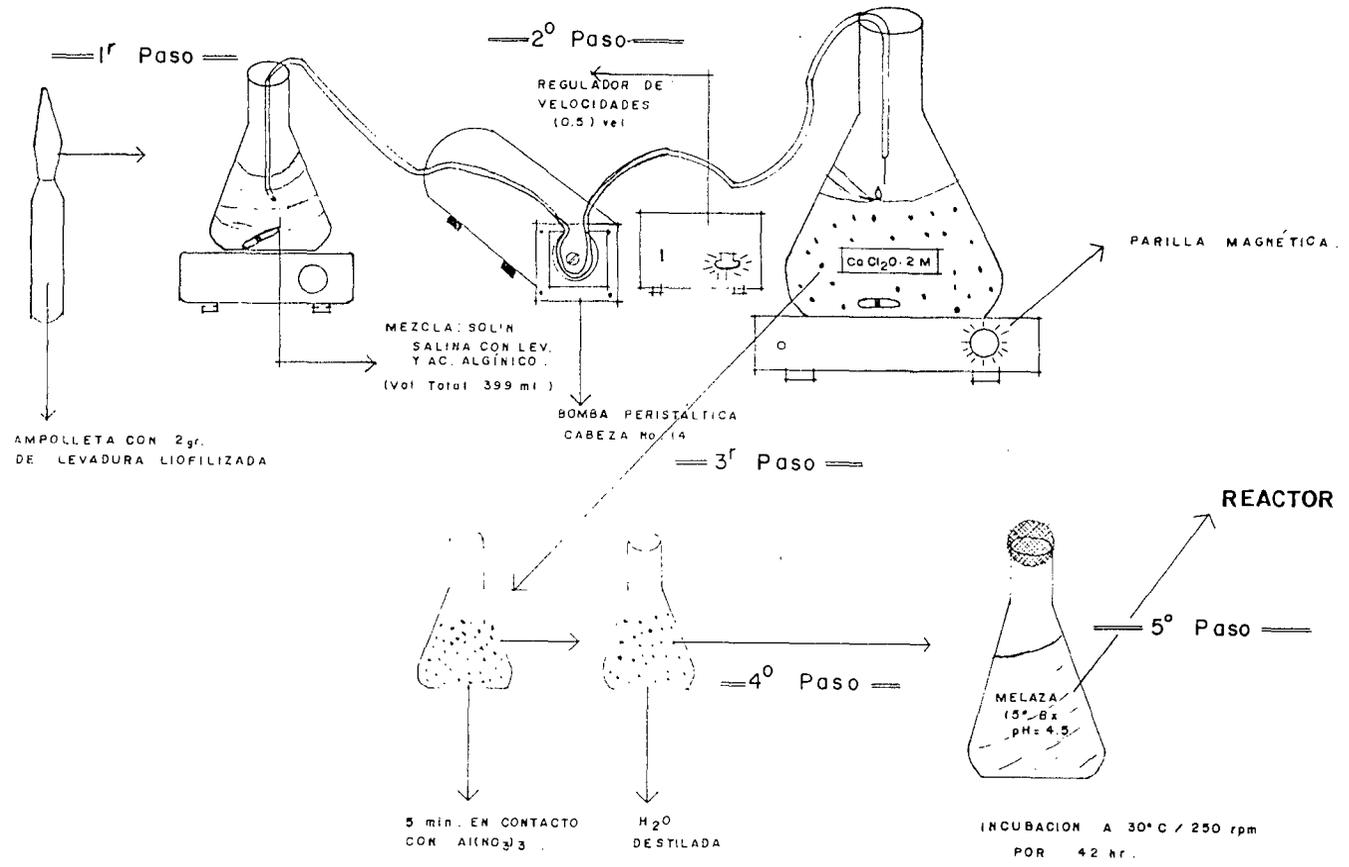


FIGURA 6 PROCEDIMIENTO PARA LA INMOVILIZACION CELULAR.



- 1.-Entrada de mosto.
- 2.-Salida para muestras de Geles.
- 3.-Entrada para Termómetro.
- 4.-Entrada para el electrodo de P.H.
- 5.-Entrada para carga de Geles.
- 6.-Rejilla de soporte.
- 7.-Salida de gases.
- 8.-Recirculación de medio.
- 9.-Salida de medio en continuo.
- 10.-Rejilla de retención.
- 11.-Geles de levadura.

FIGURA 7 . REACTOR LECHO FLUIDIZADO



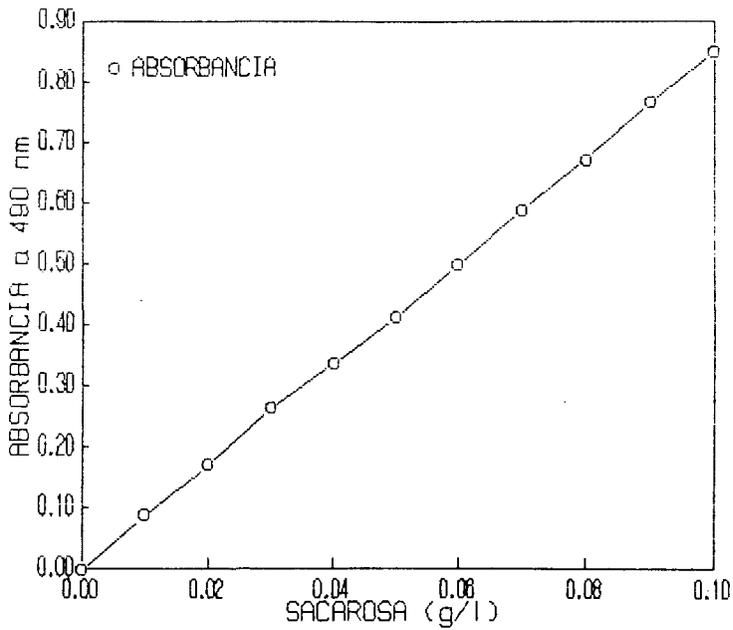


Figura 9. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

Ecuación: $Y = 2.090919E-03 + 8.433636(X)$

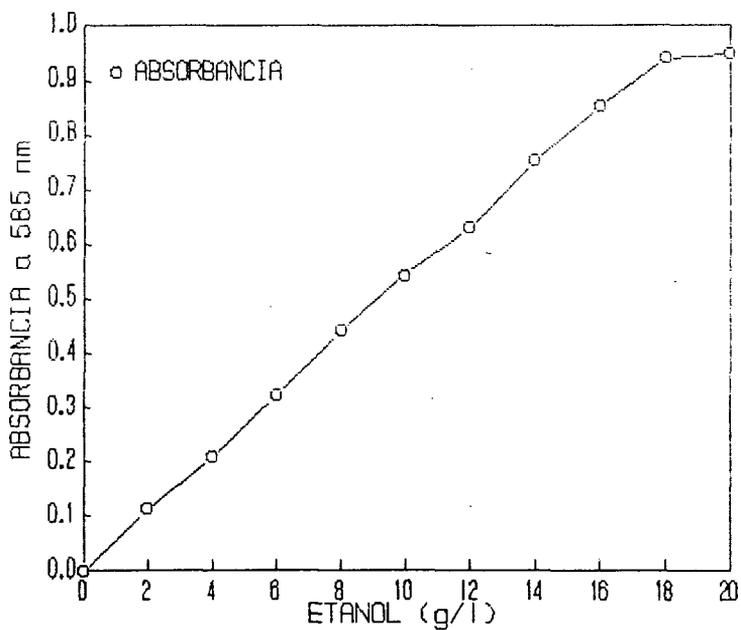


Figura 10. Curva de calibración para la determinación de etanol mediante la técnica de dicromato de potasio. (Bohringer y Jakob., 1964).

Ecuación: $Y = 7.045445 - 03 + 5.433615E - 02(X)$

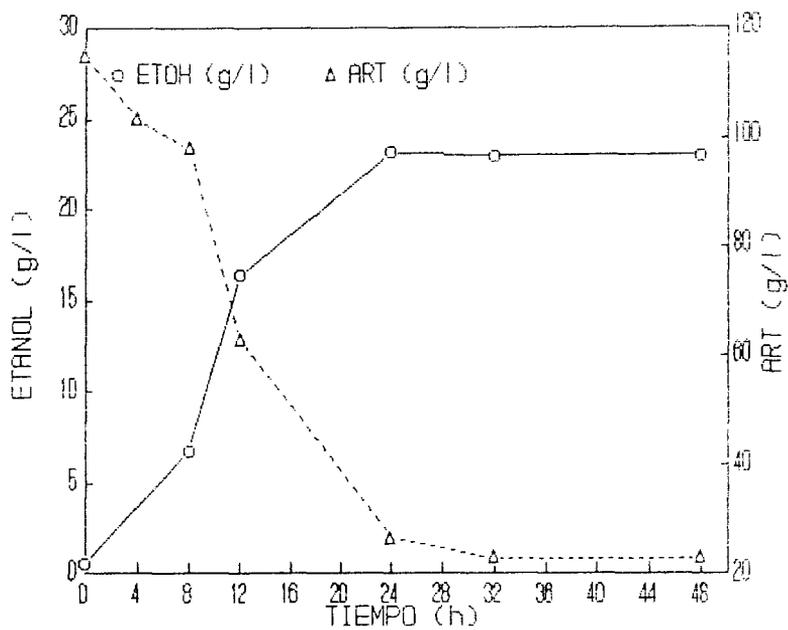


Figura 11. Cinética de fermentación en el reactor con mosto de melaza a 15°Bx, pH de 4.5 con geles de 2.5 mm de diámetro.

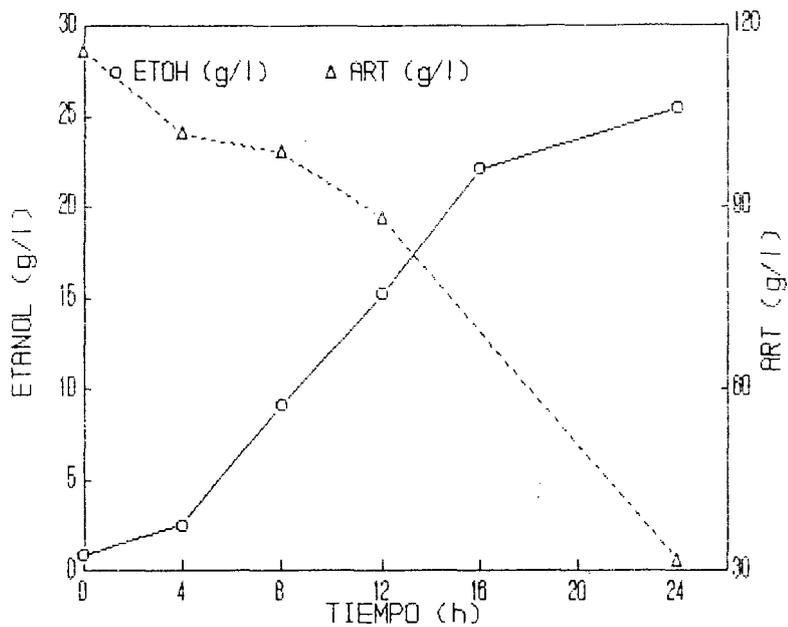


Figura 12. Cinética de fermentación en el reactor con mosto de melaza a 15°Bx, pH de 3.0 con geles de 2.5 mm de diámetro.

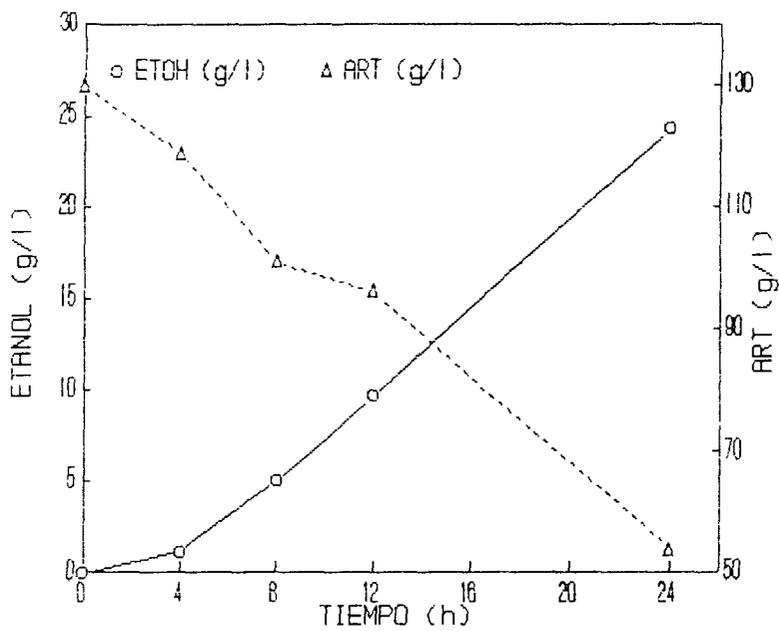


Figura 13. Cinética de fermentación con mosto de melaza a 15°Bx y pH de 3.0.

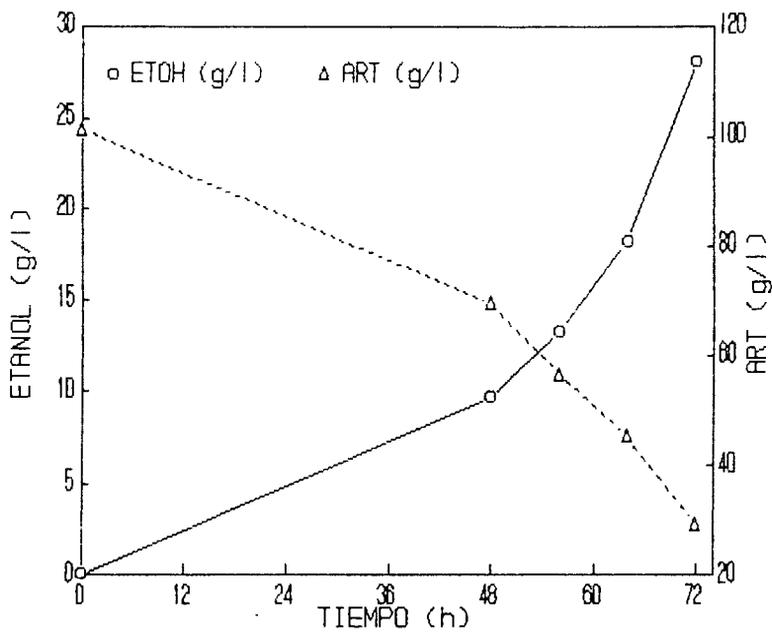


Figura 14. Cinética de fermentación empleando levadura liofilizada e inmovilizada y pH de 3.0.

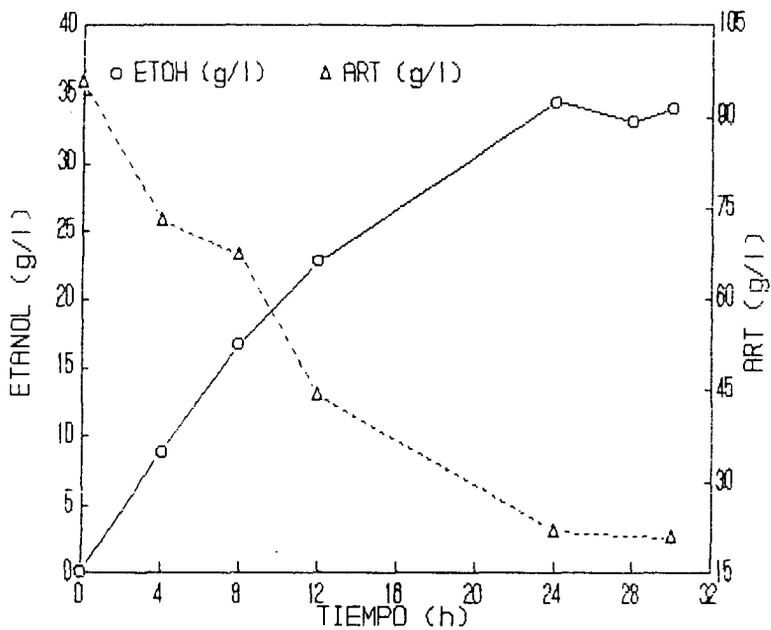


Figura 15. Cinética de fermentación utilizando levadura liofilizada inmovilizada previamente activada por 48 hrs. y a un pH de 3.0.

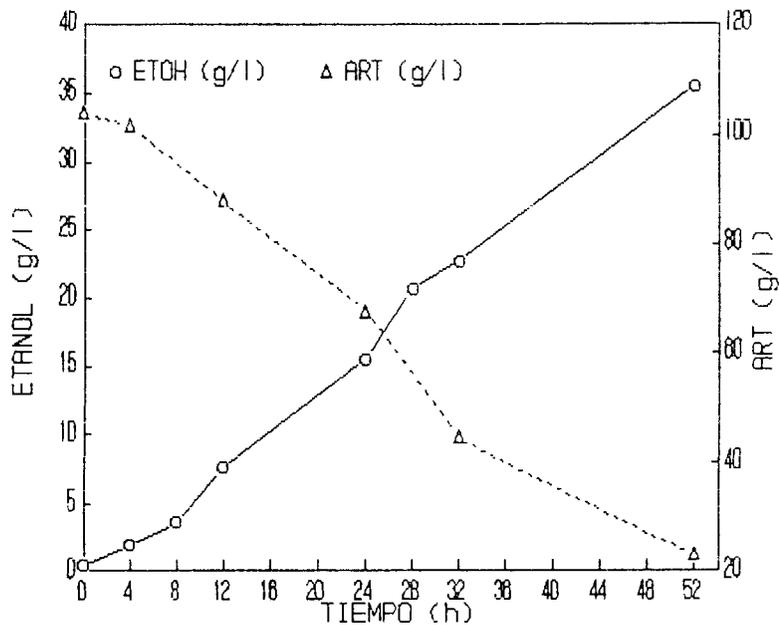


Figura 16. Cinética de fermentación a pH 3.0.

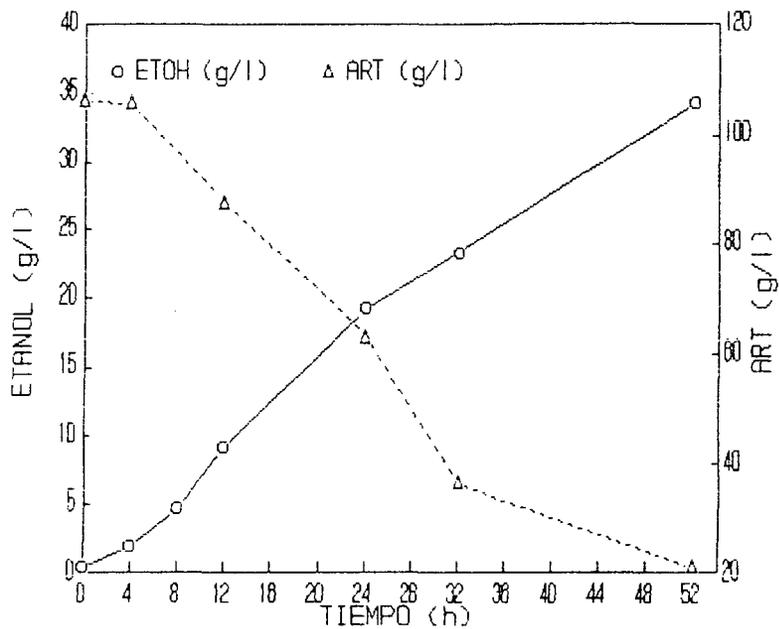


Figura 17. Cinética de fermentación a pH 4.5.

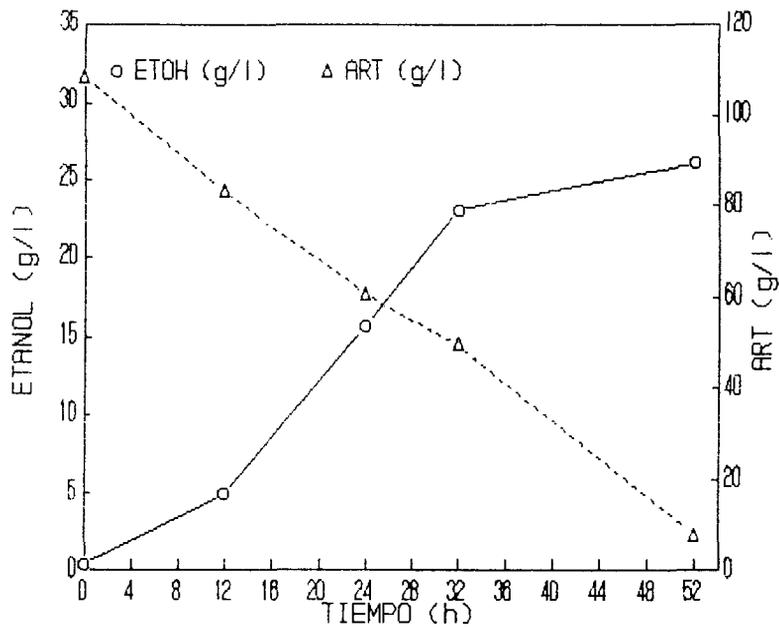


Figura 18. Cinética de fermentación a pH 4.5 y temperatura de 35°C.

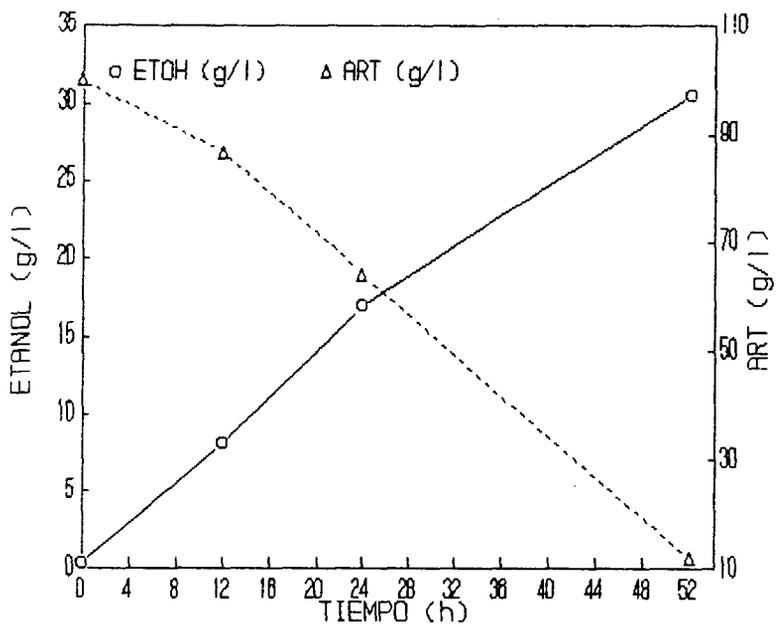


Figura 19. Cinética de fermentación a pH 4.5 y temperatura de 30°C.

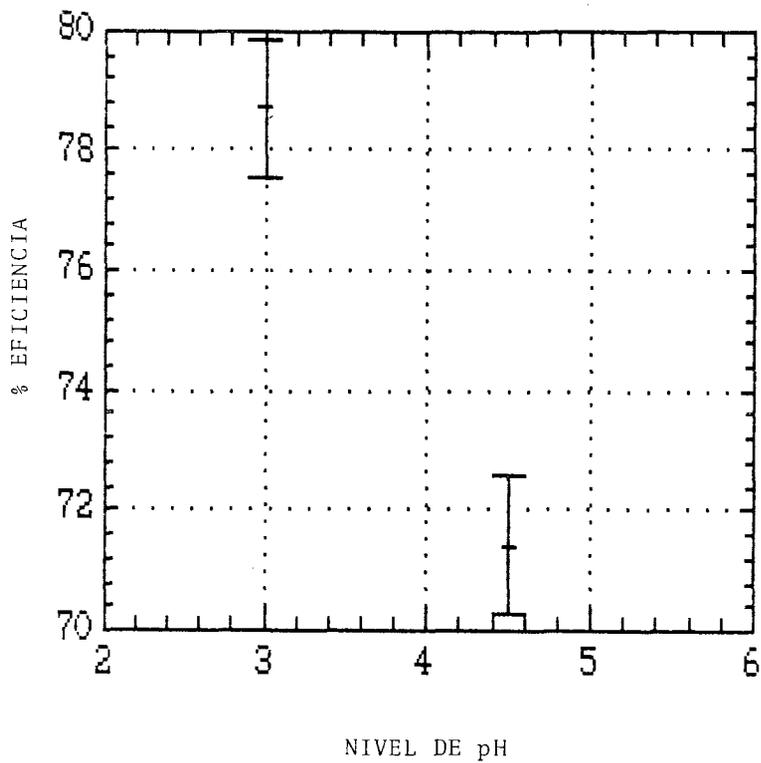


Figura 20. Promedios de la eficiencia de fermentación con su error estandar para pH de 3.0 y 4.5

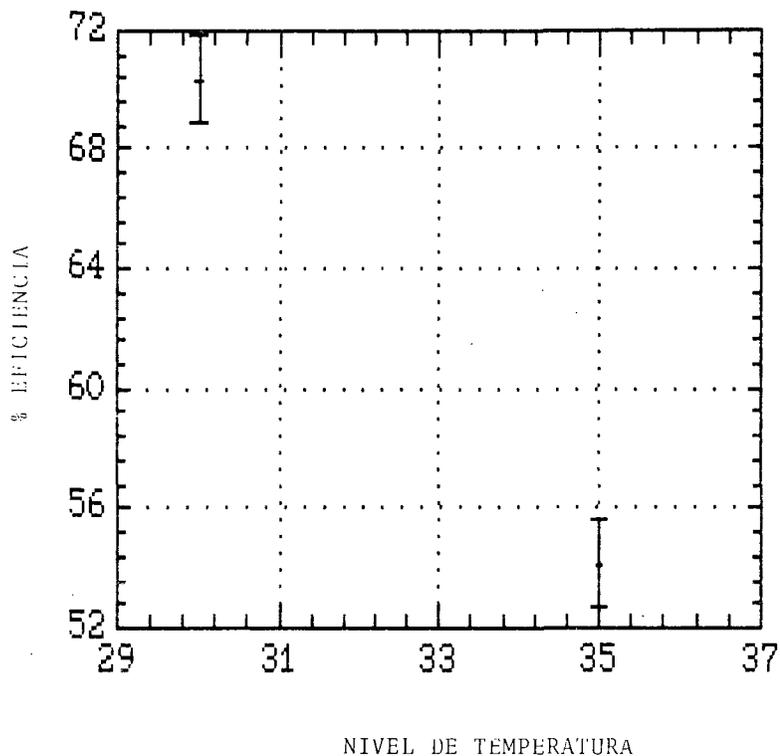


Figura 21. Promedios de la eficiencia de fermentación con su error estandar para temperaturas de 30 y 35°C.

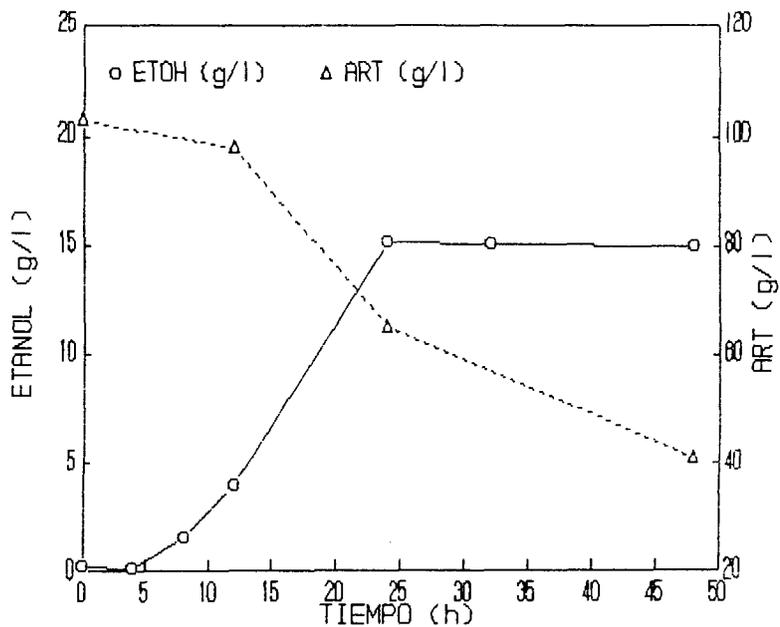


Figura 22 Cinética de fermentación en el exp. No. 1 del primer diseño factorial.

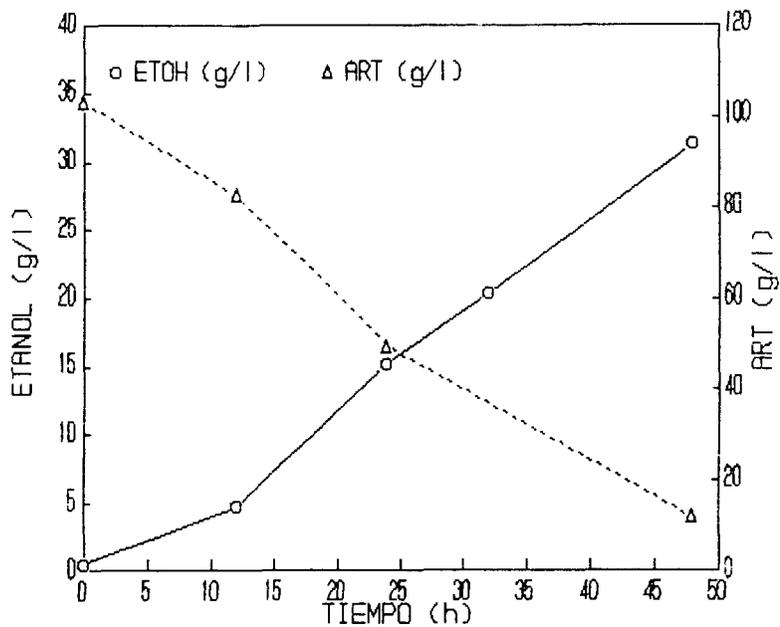


Figura 23. Cinética de fermentación en el exp. No. 2 del primer diseño factorial.

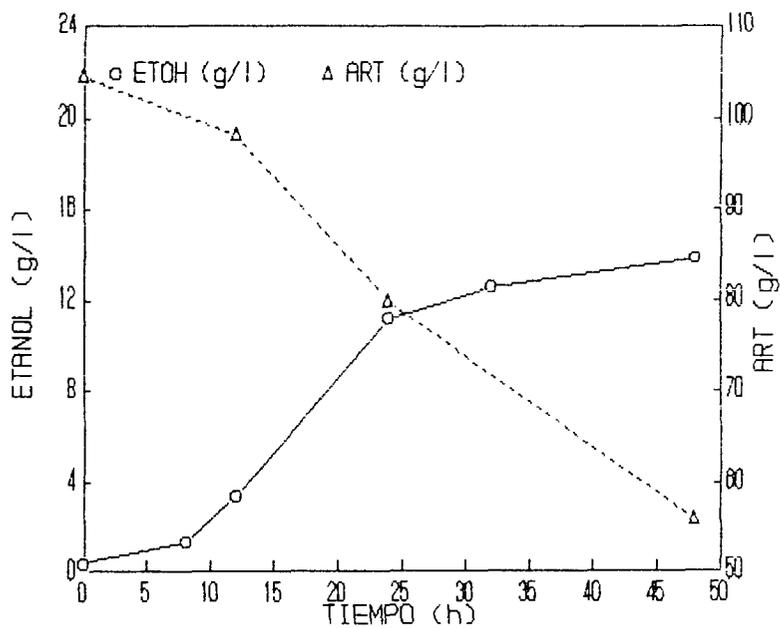


Figura 24. Cinética de fermentación en el exp. No. 3 del primer diseño factorial.

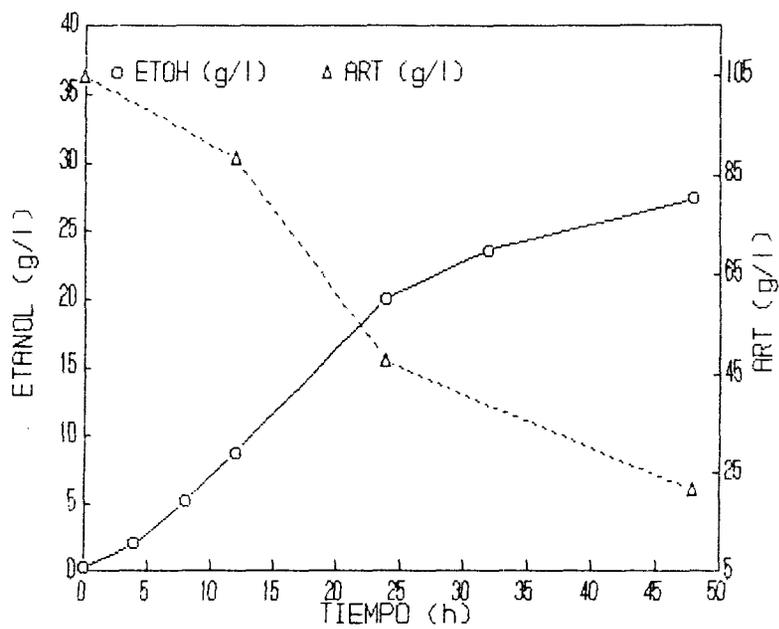


Figura 25. Cinética de fermentación en el exp. No. 4 del primer diseño factorial.

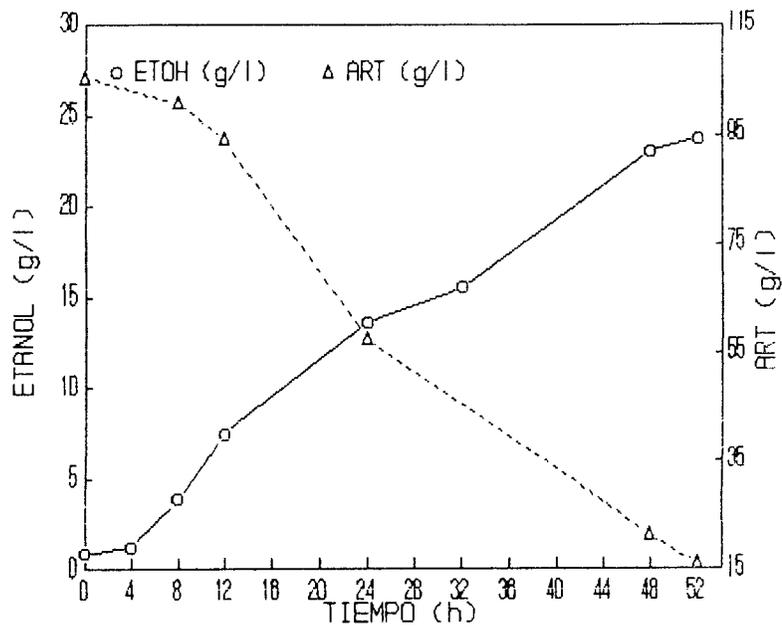


Figura 26. Cinética de fermentación en el exp. No. 5 del primer diseño factorial.

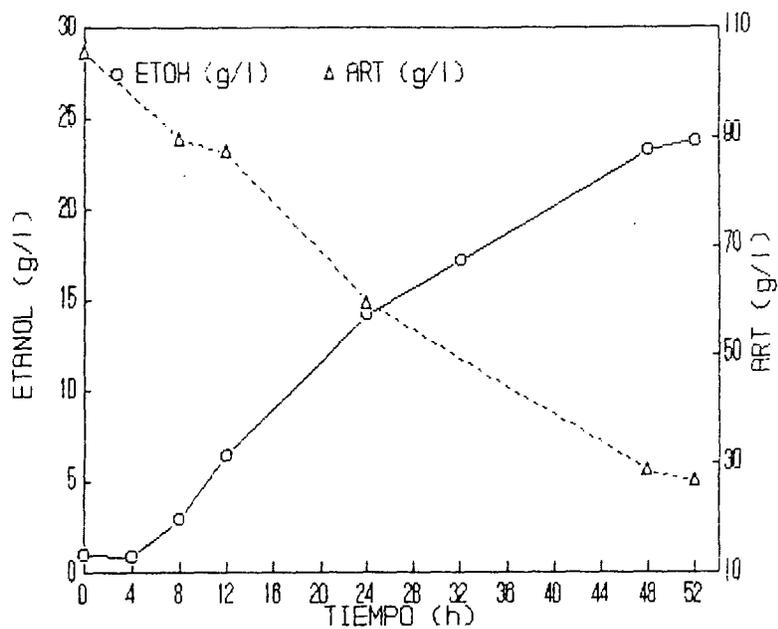


Figura 27. Cinética de fermentación en el exp. No. 6 del primer diseño factorial.

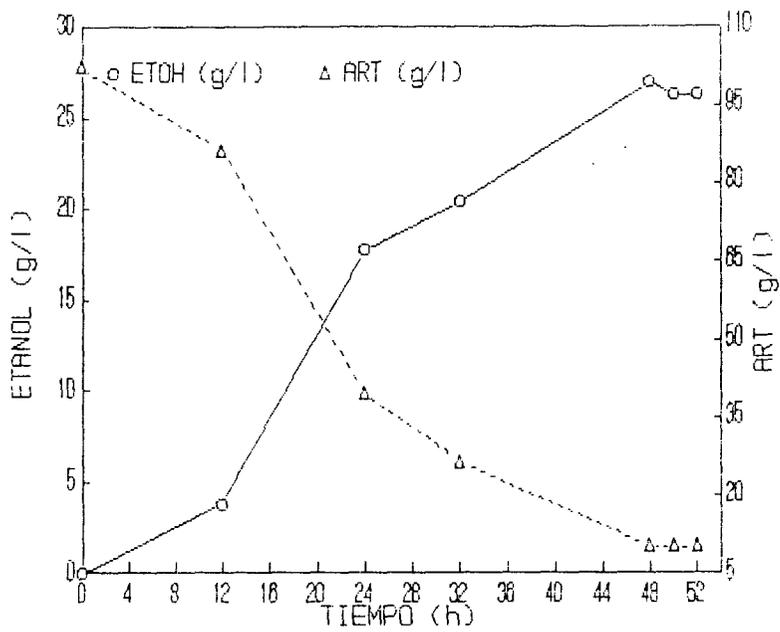


Figura 28. Cinética de fermentación en el exp. No. 7 del primer diseño factorial.

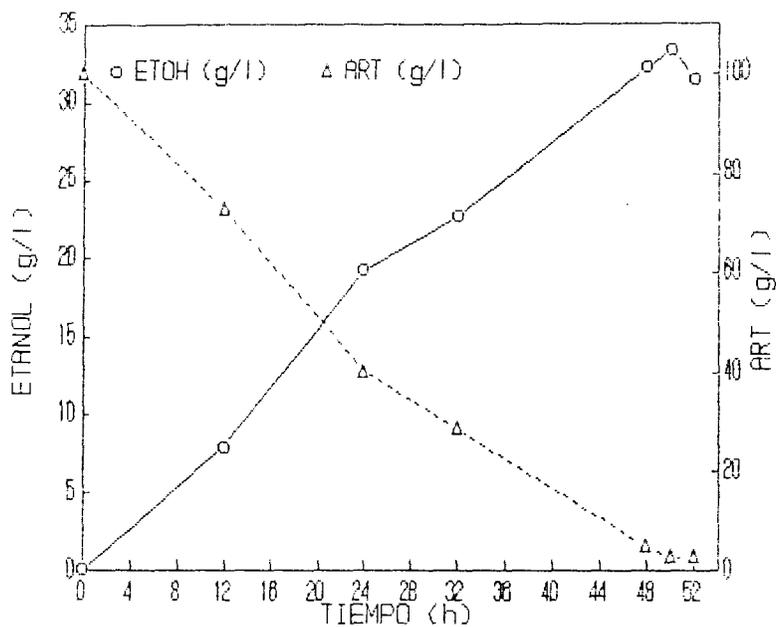


Figura 29. Cinética de fermentación en el exp. No. 8 del primer diseño factorial.

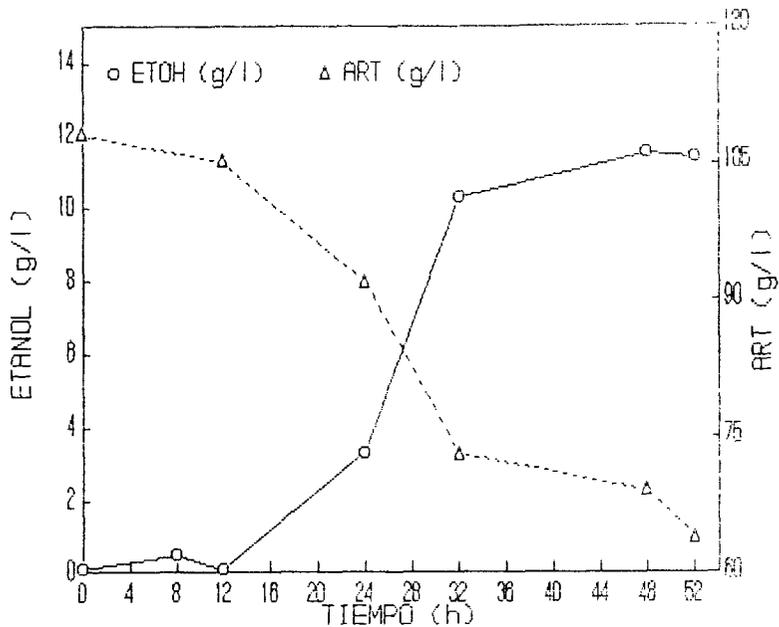


Figura 30. Cinética de fermentación en el exp. No. 9 del segundo diseño factorial.

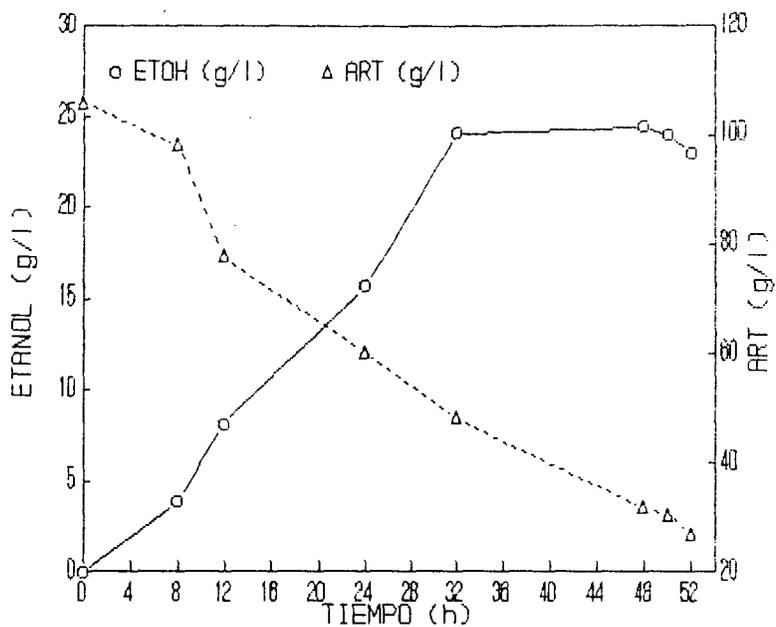


Figura 31. Cinética de fermentación en el exp. No. 10 del segundo diseño factorial.

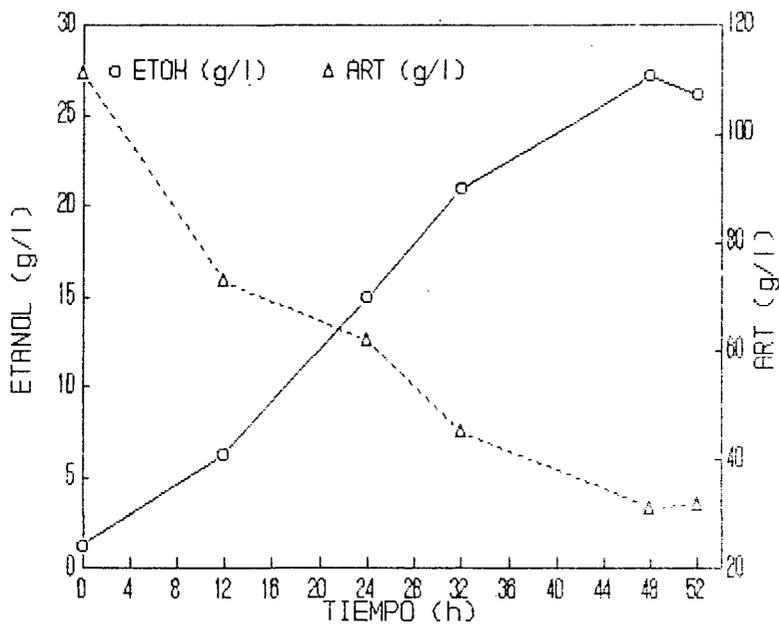


Figura 32. Cinética de fermentación en el exp. No. 11 del segundo diseño factorial.

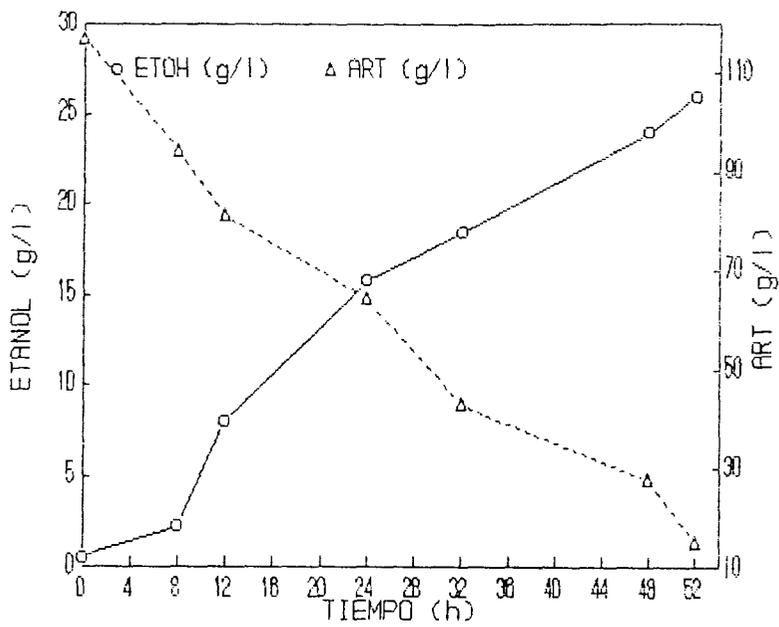


Figura 55. Cinética de fermentación en el exp. No. 12 del segundo diseño factorial.

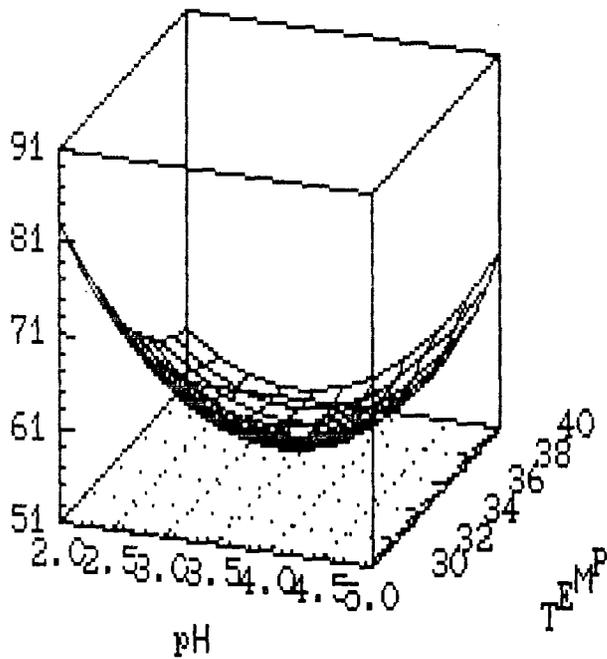


Figura 34. Superficie de respuesta para eficiencia de fermentación.

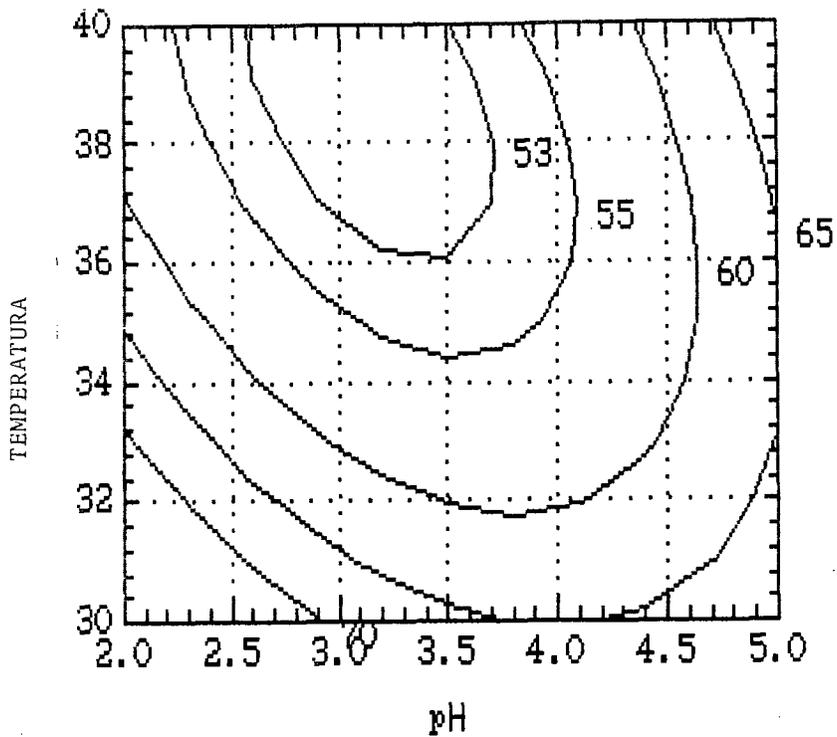


Figura 35. Contornos de la superficie de respuesta para eficiencias del 53 al 65%.

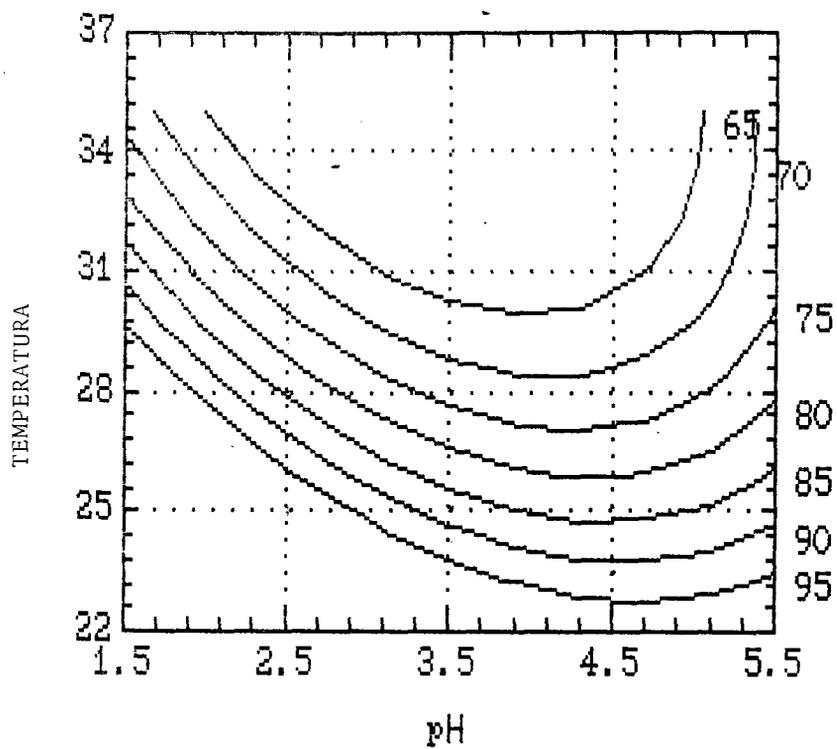


Figura 36. Contornos de la superficie de respuesta para eficiencias de fermentación del 65 al 95 %.

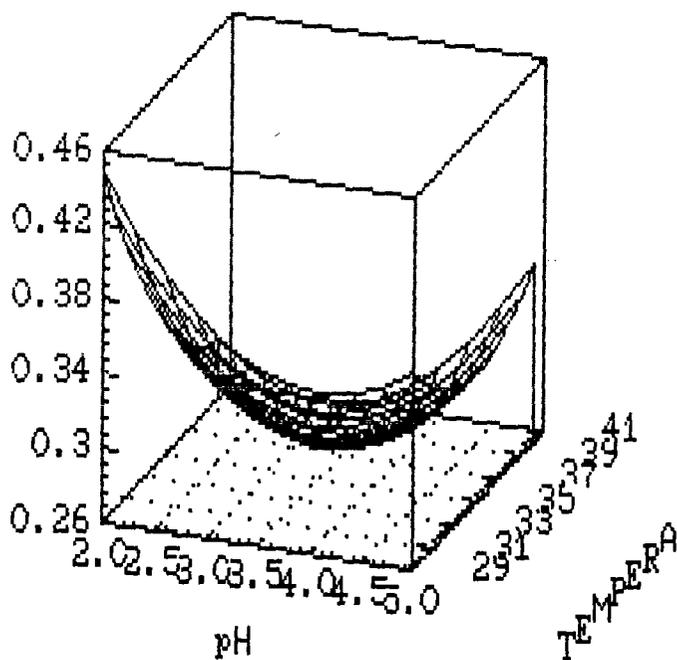


Figura 37. Superficie de respuesta para rendimiento.

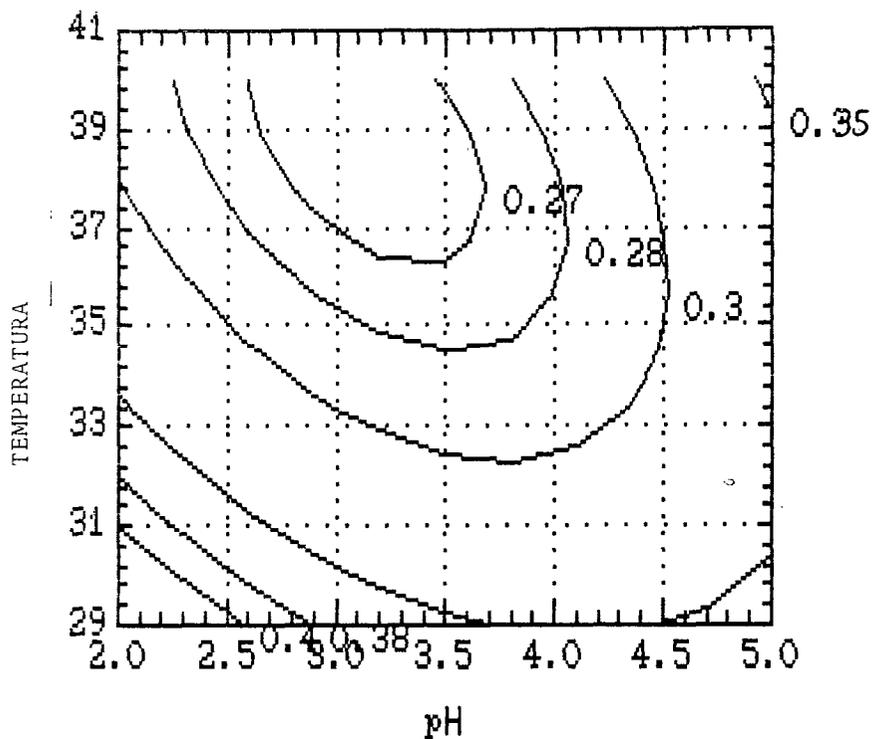


Figura 38. Contornos de la superficie de respuesta para rendimientos de 0.27 a 0.35.

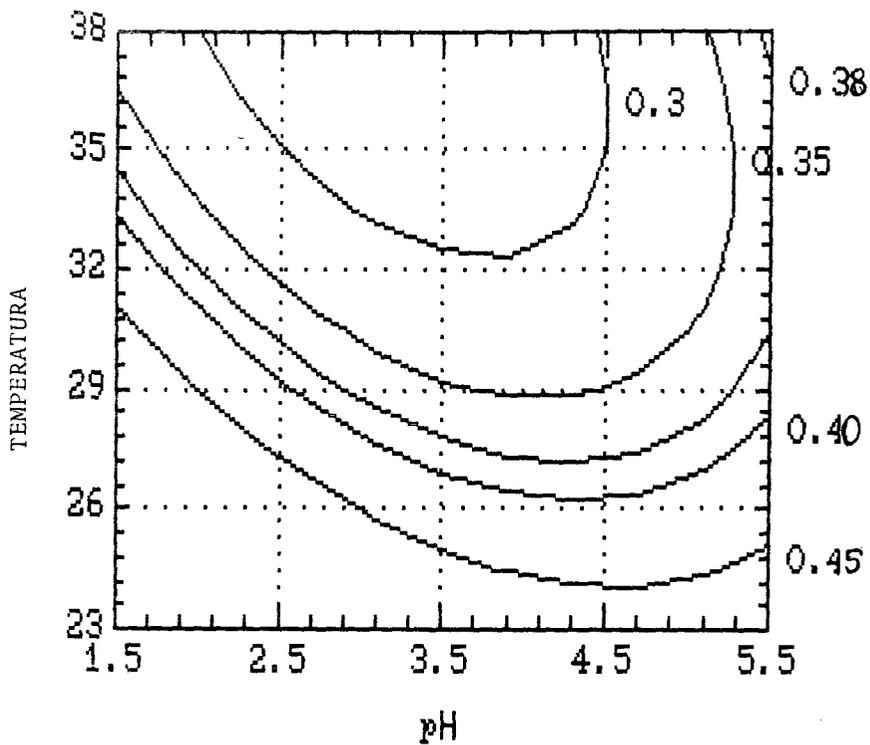


Figura 39. Contornos de la superficie de respuesta para rendimientos de 0.30 a 0.45.

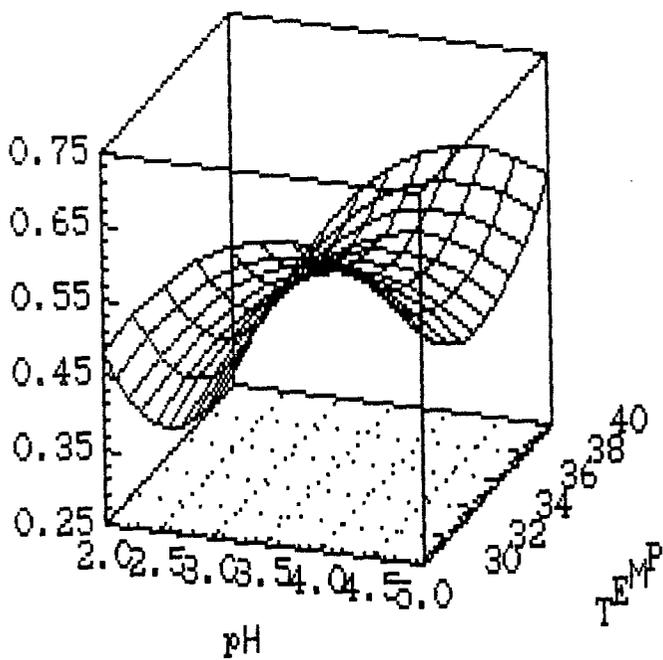


Figura 40. Superficie de respuesta para productividad.

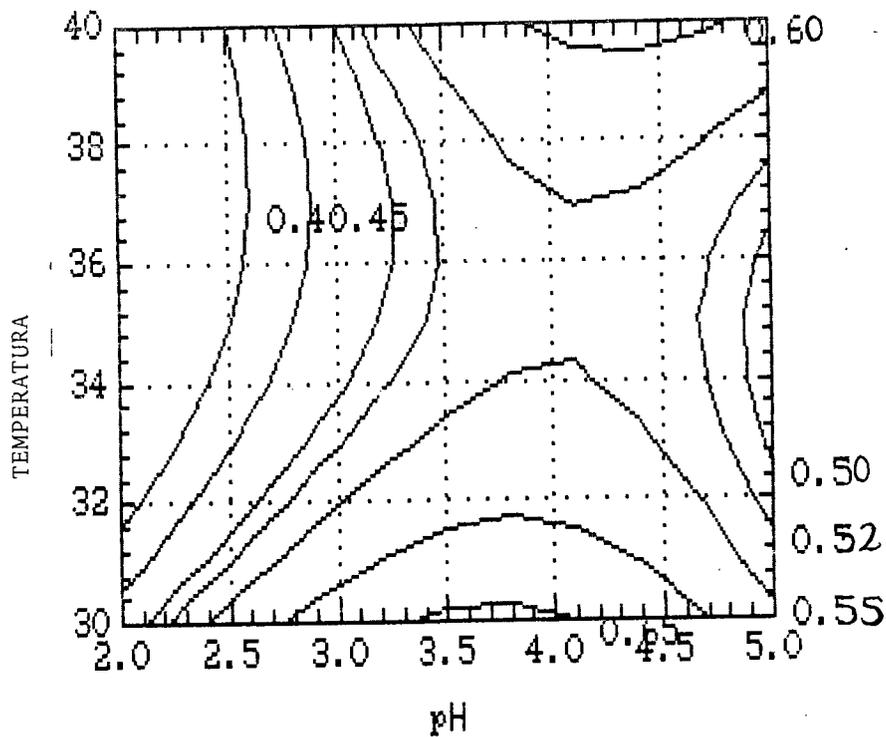


Figura 41. Contornos de la superficie de respuesta para las productividades de 0.40 a 0.60 g/l.h

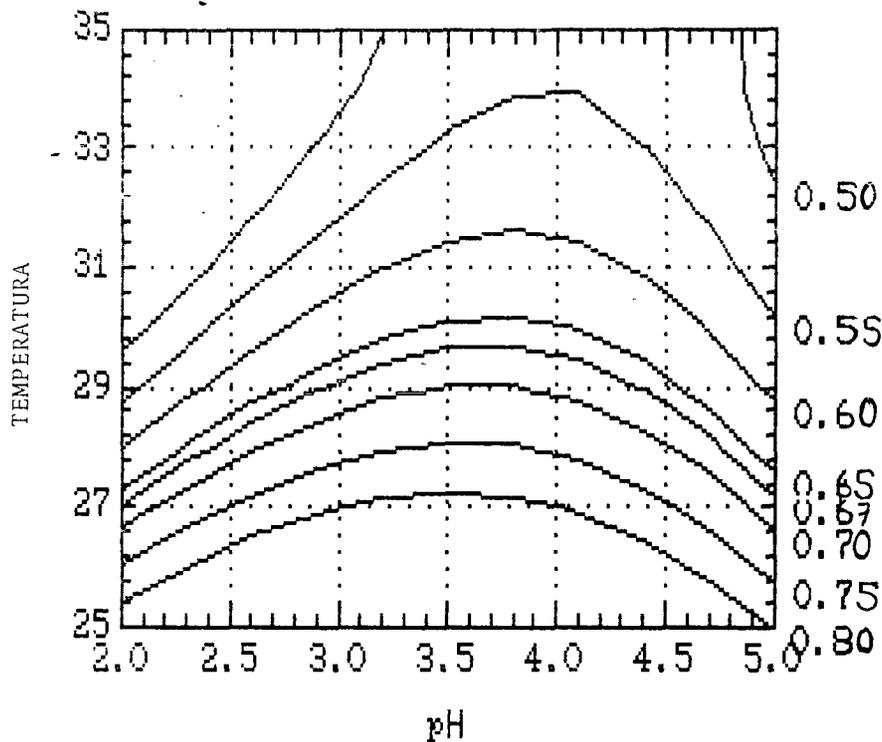


Figura 42. Contornos de la superficie de respuesta para productividades de 0.50 a 0.80 g/l.h

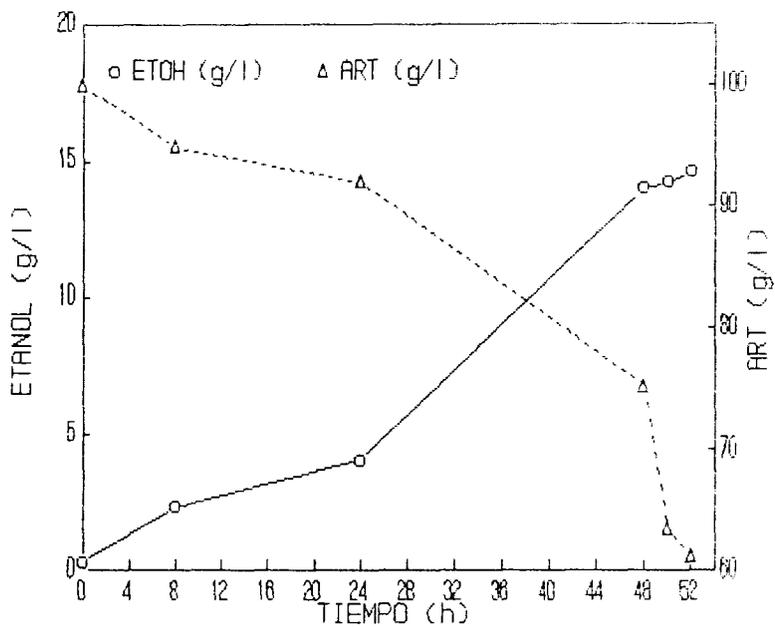


Figura 43. Cinética de fermentación en el exp. No. 13. Validación del modelo.

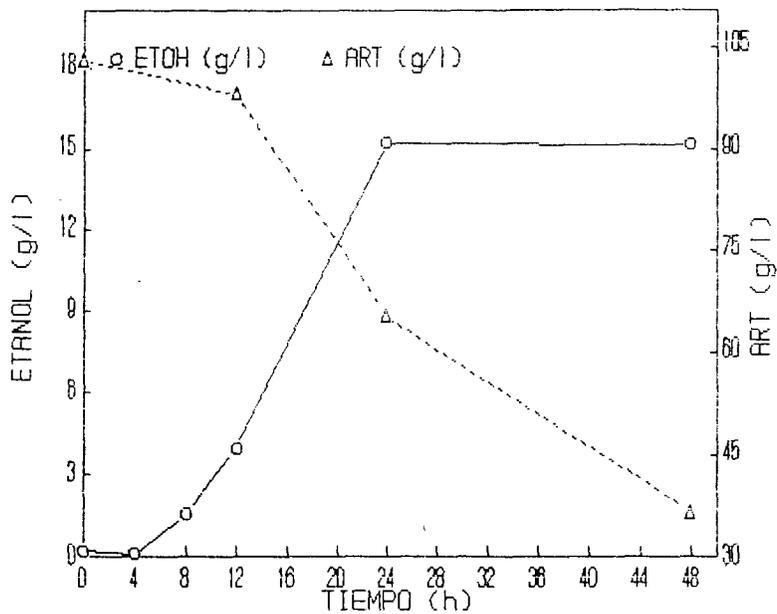


Figura 44. Cinética de fermentación en el exp. No. 14. Validación del modelo.

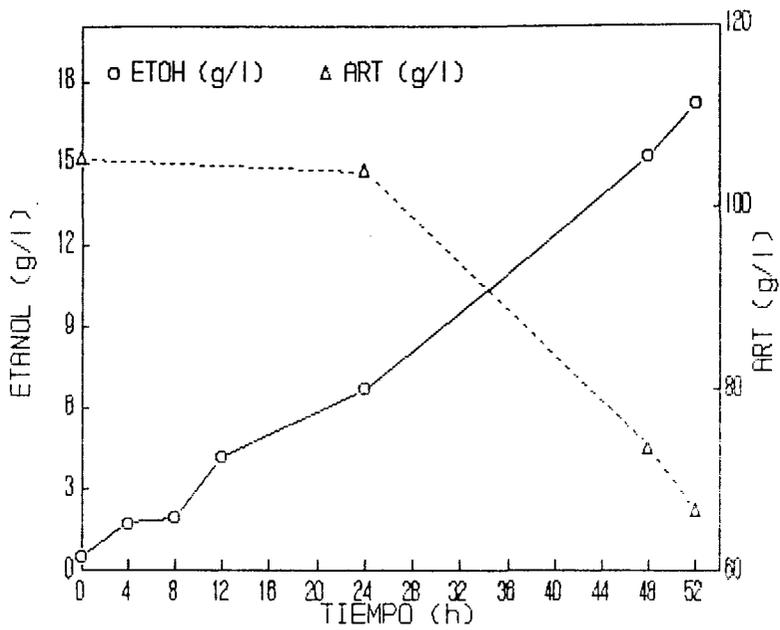


Figura 45. Cinética de fermentación con nutrientes.

IX. T A B L A S

DISMINUCION DEL EFECTO INHIBITORIO DEL PRODUCTO	INCREMENTO DE LA CONCENTRACION DE CELULAS
<p>1.1 Aproximacion al modelo de flujo tapon. Reactores de lecho empacado Reactores con agitacion continua en (CSTR) cascada Reactores en cascada</p>	<p>2.1 Reciclamiento Decantacion Centrifugacion Ultrafiltracion ó micro-filtracion con membranas.</p>
<p>1.2 Extraccion continua de etanol Fermentacion al vacio Fermentacion extractiva Fermentacion acelerada Acople de membranas Destilacion por membranas Pervaporacion Dialisis.</p>	<p>2.2 Floculacion de celulas en torres.</p> <p>2.3 Inmovilizacion celular Adsorcion Enlace covalente Atrapamiento en geles ó membranas.</p>

TABLA 2 SOLUCIONES PROPUESTAS PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DE ALCOHOL POR FERMENTACION.

No. DE EXP.	VARIABLES CODIFICADAS		VARIABLES SIN CODIFICAR	
	X1	X2	pH	TEMPERATURA
1	+	+	4.5	38°C
2	-	-	2.5	30°C
3	+	-	4.5	30°C
4	-	+	2.5	38°C
5	0	0	3.5	34°C
6	0	0	3.5	34°C
7	0	0	3.5	34°C
8	0	0	3.5	34°C

TABLA 3. Primer Diseño Factorial

No. DE EXP	VARIABLES CODIFICADAS		VARIABLES SIN CODIFICAR	
	X2	X2	pH	TEMPERATURA
9	+√2	0	4.9	34°C
10	-√2	0	2.09	34°C
11	0	+√2	3.5	39°C
12	0	-√2	3.5	30°C

TABLA 4. Segundo Diseño Factorial

GELES EMPLEADOS	CONCENTRACION (g/l)	ESTABILIDAD (%)	TIEMPO DE DISOLUCION (min)
Geles de Alginato	2.0	98	53:49
24 g/l Gel. Alginato	2.0	96	33:10
24 g/l Gel. de calcio nativo preparado	3.0	97	45:10
24 g/l Sol. en agua de la solución preparada	3.0	99	50:00

TABLA 5. Efecto de diferentes soluciones para el almacenamiento de geles.

VISCOSIDAD	Flujo (L/h)	ALTIMETRIA DEL TUBO (cm)
1	4.90	inicial= 20
2	16.47	20
3	31.30	25
4	53.33	—
5	102.85	—

TABLA 6. Flujos de alimentación obtenidos con melaza a 21°Bx, con cabezal No. 18.

VELOCIDAD	FLUJO (l/h)	ALTURA DEL LECHO (cm)
1	9.49	inicial= 20.0
2	24.40	30.0
3	50.34	50.0
4	58.53	80.0
5	68.57	100.0

TABLA 7. Flujos de alimentación obtenidos con agua destilada.

VELOCIDAD	FLUJO (l/h)	ALTURA DEL LECHO (cm)
1	7.8	Inicial= 17
2	19.6	23
3	35.6	55
4	37.1	80
5	84.7	100

TABLA 8. Flujos de alimentación obtenidos con melaza a 21°Bx y geles de 1.6 mm de diámetro.

DIAMETRO DEL GEL (mm)	AZUCARES (°Bx)	VELOCIDAD	FLUJO (l/h)	ALTURA DEL LECHO (cm)
2.5	5.0	1	7.8	28.0
		2	18.4	41.0
		3	43.6	80.0
2.5	10.0	1	8.3	25.0
		2	19.0	42.5
		3	37.8	60.0
2.5	15.0	1	8.2	34.0
		2	18.6	100.0
		3	40.5	100 (ruptura)
1.6	5.0	1	11.8	24.0
		2	18.9	41.0
		3	55.3	94.0
1.6	10.0	1	11.4	28.0
		2	20.6	67
		3	38.8	100

TABLA 9. Flujos de alimentación obtenidos a diferentes diámetros de gel y a diferentes °Bx, empleando cabezal No. 18.

pH	Y (p/s)	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	PRODUCTIVIDAD (g/l.h)
4.5	0.2413	47.30	0.966
3.0	0.2913	57.13	1.05

TABLA 10. Resultados obtenidos a los diferentes pH.

pH	Y (p/s)	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	PRODUCTIVIDAD (g/l.h)
3.0	0.4073	79.0	0.683
4.5	0.3116	69.8	0.648

TABLA 11. Promedios de rendimientos, eficiencias y productividades obtenidos a diferentes pH, empleando levadura liofilizada en la inmovilización.

TEMPER.	γ (p/o)	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	PRODUCTIVIDAD (g/l.h)
50°C	0.3700	72.4	0.620
35°C	0.2825	54.0	0.501

TABLA 12. Promedios de los resultados obtenidos a las diferentes temperaturas probadas.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: EFICIENCIA DE FERMENTACION

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
TOTAL	58.590000	3			
pH	52.290000	1	52.290000	20.109	10.5
ERROR	6.300000	2	3.150000		

H_0 = No existe diferencia significativa en la eficiencia de fermentación debido a los diferentes pH del medio probados.

$F_{cal} > F_{tab}$ Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

TABLA 13. Eficiencias obtenidas para los pH probados.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: EFICIENCIA DE FERMENTACION

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}	F_{tab}
TOTAL	270.89000	3			
TEMPERATURA	262.44000	1	262.4400	62.115	16.5
ERROR	8.45000	2	4.22500		

$H_0 =$ No existe diferencia significativa en la eficiencia de fermentación debida a las dif. temp. de reacción probadas.

$F_{cal} > F_{tab}$ Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

TABLA 14. Análisis de varianza de las eficiencias obtenidas para las temperaturas probadas.

No. DE EXP.	pH	T°C	EFICIENCIA (%)	Y(p/c)	PRODUCTIV. (g/l h)
1	4.5	38	61.0	0.3116	0.5708
2	7.5	30	77.4	0.3953	0.630
3	4.5	30	56.5	0.3590	0.650
4	2.5	38	57.8	0.2952	0.425
5	3.5	34	51.7	0.2637	0.4812
6	3.5	34	50.0	0.2559	0.4854
7	3.5	34	57.7	0.2941	0.562
8	3.5	34	65.2	0.3325	0.6708

TABLA 15. Resultados del primer diseño factorial.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: EFICIENCIA DE FERMENTACION

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
TOTAL	348.40271	7			
MODELO	172.32500	2	86.16250	1.15475	0.79
ERROK	176.07771	5	35.21557		

Ho = No hay ajuste a un modelo lineal

Fcal < Ftab Por lo tanto se acepta la hipótesis nula

Tabla 16. Anova para el ajuste al modelo lineal para la respuesta de eficiencia de fermentación del primer diseño factorial.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: RENDIMIENTO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUENTA DE CUADRADOS	F _{cal}	F _{tab}
TOTAL	0.0141616	7			
MODELO	0.0044621	2	0.0022310	1.1500732	5.79
ERRORES	0.0096995	5	0.0019399		

H₀= No hay ajuste a un modelo lineal

F_{cal} < F_{tab} Por lo tanto se acepta la hipótesis nula

TABLA 17. Anova para el ajuste al modelo lineal para la respuesta de rendimiento del primer diseño factorial.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: PRODUCTIVIDAD

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
TOTAL	0.0559382	7			
MODELO	0.0275168	2	0.0137584	2.4204358	5.79
ERROR	0.0284213	5	0.0056843		

$H_0 =$ No hay ajuste a un modelo lineal

$F_{cal} < F_{tab}$ Por lo tanto se acepta la hipótesis nula

TABLA 18. Anova para el ajuste al modelo lineal para la respuesta de productividad del primer diseño factorial.

No. DE EXP.	pH	T°C	EFICIENCIA (%)	Y(g/s)	PRODUCT. (g/l.h)
9	2.09	34	62.7	0.3207	0.268
10	4.9	34	62.5	0.3191	0.48
11	3.5	30	63.3	0.3230	0.566
12	3.5	39	48.7	0.2485	0.50

TABLA 19. Resultados del segundo diseño factorial.

TABLA 20. Validación del modelo de fermentación. Valores predichos por el modelo contra valores determinados experimentalmente.

No. Exp.	X1	X2	Eficiencia (%) (Predicha)	Eficiencia (%) (Experimental)	% Error
13	2.0	30°C	83.328	69.00	17.19
14	2.5	30°C	75.53	77.37	2.43

No. Exp.	X1	X2	(Yp/s) (Predicha)	(Yp/s) (Experimental)	% Error
13	2.0	30°C	0.4237	0.3510	17.15
14	2.5	30°C	0.3826	0.3953	3.31

No. Exp.	X1	X2	Productividad (g/l.h) (Predicha)	Productividad (g/l.h) (Experimental)	% Error
13	2.0	30°C	0.4752	0.2807	40.9
14	2.5	30°C	0.5661	0.63	11.2

X. A N E X O S

XI. ANEXOS

ANEXO 1

REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN
PARA EFICIENCIA DE FERMENTACION.

Regresión 1

$$Y = 60.9125$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.826978

Regresión 2

$$Y = 67.65 + 1.925 (X_1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 2.717693E-02

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 9.403778

SOLUCION FINAL:

Regresión 3

$$Y = 120.9875 - 1.925 (X_1) - 1.56875 (X_2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.3159557

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.638099

REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN
PARA RENDIMIENTO.

Regresión 1

$$Y = 0.3109125$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 4.497871E-02

Regresión 2

$$Y = .345825 + .009975 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 2.810417E-02

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = .047895

SOLUCION FINAL

Regresión 3

$$Y = .6167625 - .009975(X1) - 7.96875E-03(X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = .3150821

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 4.404435E-02

REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN
PARA PRODUCTIVIDAD.

Regresión 1

$$Y = .5592125$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.939332E-02

Regresión 2

$$Y = .4123875 + .04195 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = .1258391

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 9.027639E-02

SOLUCION FINAL

Regresión 3

$$Y = 1.020563 - .04195 (X1) - .0178875 (X)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = .491915

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = .0753941

ANEXO 2

REGRESION MULTIPLE PARA UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA EFICIENCIA DE FERMENTACION.

Regresión 1

$Y = 60.39417$
COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 7.994632

Regresión 2

$Y = 63.93026 + 1.010552 (X1)$
COEFICIENTE DE DETERMINACION = 1.154493E-02
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.336298

Regresión 3

$Y = 119.3488 + 1.010381 (X1) + 1.625989 (X2)$
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .406084
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 6.811395

Regresión 4

$Y = 169.8249 + 32.1134 (X1) + 1.5979912 (X2) + 4.447492 (X2^2)$
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .5896695
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 6.00052

Regresión 5

$Y = 417.3074 + 33.29469(X1) + 16.04462 (X2) + 4.616077 (X1^2) + .2109226 (X2^2)$
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .6501675
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 5.927559

SOLUCION FINAL

Regresión 6

$Y = 522.1761 - 63.25719(X1) - 19.129(X2) + 4.616077(X1^2) + .2109226 (X2^2) + .88125 (X1X2)$
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .7208625
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 5.719109

REGRESION MULTIPLE PARA UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA RENDIMIENTO.

Regresión 1

Y = .308175
COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 4.075023E-02

Regresión 2

Y = .366472
COEFICIENTE DE DETERMINACION 1.189699E-02
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = .0424842

Regresión 3

Y = .6083413 +-5.228093E-03 (X1) +- 8.270093E-03 (X2)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .4047344
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 3.475845E-02

Regresión 4

Y = .8656999 +- .1638107 (X1) +-8.12694E-03(X2) + .0226761 (X1²)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .5884226
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = .0306554

Regresión 5

Y = 2.130167+-1698477 (X1) +- 8.195727E-02 (X2) + 2.353765E-02 (X1²) +
1.077926E-02 (X2²)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .6492376
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 3.025407E-02

SOLUCION FINAL

Regresión 6

Y = 2.6711173 -.3243352(X1) - 9.786039E-02(X2) + 2.353765E-02(X1²)
+1.077926E-03 (X2²) 4.54375E-03 (X1X2)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .7215739
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 2.911425E-02

**REGRESION MULTIPLE PARA UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA
PROTIVIDAD DE ALCOHOL.**

Regresión 1

Y = .5240251
COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = .1110775

Regresión 2

Y = .3183566 + 5.877641E-02 (X1)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .2023131
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = .1040492

Regresión 3

Y = .7846161 + 5.877784E-02 (X1) +- 1.368013E-02 (X2)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .3469838
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 9.923461E-02

Regresión 4

Y = 4.791776E-02 + .5127263 (X1) +- 1.408992E-02 (X2) +- 6.491114E-02 (X1²)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .5495612
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.741689E-02

Regresión 5

Y = 4.091591+.493425(X1)+-.2501381(X2)+-.0621566(X1²)+3.446312E-03(X2²)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .6332273
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.432801E-02

SOLUCION FINAL

Regresión 6

Y = 5.042104 + .22185 (X1)-.2780943 (X2)-.0621566 (X1²) + 3.446312E-03 (X2²)
+ .0079875 (X1X2)
COEFICIENTE DE DETERMINACION = .6633128
DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 8.726901E-02

XII. BIBLIOGRAFIA

Abate y col., 1987. Production of ethanol by a flocculent *Saccharomyces* sp. in a continuous up flow reactor using sucrose, sugar-cane juice and molasses as the carbon source. MIRCEN journal. vol 3. p. 401 - 409.

Abbott Bernard J., 1978. Immobilized Cells. capítulo 9. vol. 1. Annual reports on fermentation processes. p. 205 - 229.

Bandyopadhyay and Ghose., 1982. Studies and immobilized *S. cerevisiae* III. Physiology for growth and Metabolism on various supports Bioengineering. vol. XXIV. p. 387 - 397.

Bravo, P. and González G., 1991. Continuous ethanol fermentation by immobilized yeast cells in a fluidized-bed reactor. J.Chem. Tech. Biotechnol. vol. 52 p. 127 - 134.

Bowman, L. and Geiger, E., 1984. Optimization conditions for alcohol production. Biotechnology and Bioengineerin. vol. XXVI, p. 1492 - 1497.

Box G. and Youle P., 1955. The exploration and the exploitation of response surface. Biometrics. vol. 11, 1-4, p. 287 - 323.

Buzas, y Col., 1988. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells.

Combernach, y Col., 1986. Enzyme Microb. Technol. vol. 9 p. 676 - 684.

Correa L., 1987. Estudio de la acción de las enzimas sobre la fermentación. Tesis profesional de Ingeniero Químico. Facultad de Ciencias Químicas. UDG.

Crueger, W y Crueger A., 1984. Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. Brock T.D. (editor) La ed. Sanaver Associate Inc. p. 121 - 126.

Chibata y Col., 1979 Immobilized cells. Microbiol. Biotechnol., vol. 8, p. 241.

Chien, Nan k. and Sofer., 1985. Flow rate and bead size as critical parameters for immobilized yeast reactors. Enzyme Microb. Technol. vol. 7.

Fuentes, A., 1990. Optimización de las variables: Aireación y agitación por la metodología de superficie de respuesta para la reducción de la DBO5 en vinazas tequileras. Tesis profesional Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. UDG.

Dubois, and Guiles et al., 1956. Colorimetric Method for determination of sugar and related substances. Analytical chemistry. 28, 3: p. 350 - 356.

Eroshin, y Col., 1976. Influence of pH and temperature on the substrate yield coefficient of yeast growth in a chemostat.

Gilson, y col., 1990. Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilized yeast. *Process Biochemistry International*.

Gil, y Col., 1991. Continuous ethanol production in a two-stage immobilized/suspended-cell bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* vol. 13 p. 390 - 399.

Giovanni, M., 1983. response surface Methodology and product optimization. *Food Technology*. 37 (11). p. 41 - 46.

Guidoboni, G. E., 1994. Continuous fermentation systems for alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* vol. 6 p. 194 - 200.

Johansen, y Col., 1985. Immobilization of yeast cells by internal gelation of alginate. *Enzyme Microb. Technol.* vol. 8.

Jóhnes, y Col., 1991. Alcohol fermentation by yeast: the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*. p. 42 - 49.

Kierstan, M. Bucke C., 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. XIX. p. 387 - 397.

Kirk-Othmer., 1981. Producción industrial de alcohol. *Enciclopedia de la Tecnología Química*. UTEHA. VII. p. 745 - 781.

Klein, and Ziehr., 1990. Immobilization of microbial cells by adsorption. *Biotechnol.* vol. 16, p. 1 - 16.

Lehninger A. L. 1985. *Bioquímica*. Ed. Omega S. A. Barcelona, España. p. 427 - 449.

Loung, y Tsens., 1984. *Appl Microb. Biotechnol.* vol. 19. p 207 - 216.

Mansur, y Col., 1990. selección de cepas de levadura para la fermentación alcohólica con jugo de caña. *ICIDCA, Cuba*. Pp. 101 - 105.

Martins, y Col., 1992. Alginate as immobilized material III. Diffusional properties. *Biotech. and Bioeng.* vol. 39. Pp. 186 - 194.

Norton S., D'Amore T., 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme Microb. Technol.* vol. 16. p. 365 - 375.

Núñez and Lema., 1987. Cell immobilization: Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* vol. 9 p. 642 - 651.

Pellón J.R., 1986. La ingeniería genética y sus aplicaciones. Ed, Acríba S.A. Zaragoza, España p. 175 - 180.

Presscot and Dunn., 1976. Producción industrial por fermentación. Microbiología industrial. p. 110 - 133.

Ramírez R.E., 1992. Comparación de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en forma libre e inmovilizada para la producción de alcohol a partir de melazas de caña. Tesis Profesional. Q.F.B. Facultad de Ciencias Químicas. UDG.

Rodríguez, y Col., 1990. Optimización por superficie de respuesta de la etapa de fermentación en el proceso de producción de alcohol en un ingenio del estado de Jalisco. Memorias del VII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Oaxtepec, Morelos. p. 16.

Romo H., 1993. Optimización de nutrientes en los medios de propagación y fermentación para la producción de alcohol a partir de melazas de caña. Tesis Profesional. Lic. en Biología. UDG.

Rose, and Harrison., 1971. The Fisiology and Biochemystry of yeast. Vol. 2. p.122-124.

Scott, and Charles D.,1987. Immobilized cells. A review of recent literature. Enzyme Microb. Technol. Vol.9. p. 66-73.

Semushina T.N. et al., Microbiology, Vol. XLIII, 4 th ed., Pp. 672-678.

Sturion, C. A., 1988. Tecnología de la producción de alcohol por fermentación. GEPLACEA. Pp. 1-18.

Takamatsu, y Col., 1987. Continuous L-alanine production using twodifferent immobilized mocrbrial cell preparations on industrial scale. (Mosbach, k., ed.) Academic Press, Orlando 136 Pp. 472-479.

Tzeng, W., Fan, L.S., Gan, Y. R. 1991. Ethanol Fermentation using immobilized cells a multistage fluidized bed bioreactor. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 38. p 1253-1258.

Vieth and Venkatasubramaniann., 1974. Enzyme Engineering. Part. III. Propierties of inmobilized enzyme systems. CHEM.TECH. Pp. 309-320.

Wasungo and Simard., 1982. Growth characteristics of Bakers yeast in ethanol. Vol. XXIV. Pp. 1125-1134.

Yang, y Col., 1992. Immobilization of candida rugosa cells having high fumarase activity with polyvinyl alcohol. Ann. NY acad. Sci. 672, 563-565.