

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**“PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis*
EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. EDNA YOLANDA ESPARZA LUCARIO

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR: DR. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESORES: DR. JESÚS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

DR. GERARDO GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

MÉXICO D. F. FEBRERO DE 2012

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001455”.

México D.F. a 24 de Febrero de 2012

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis* EN FERMENTACIÓN EN MEDIO
SÓLIDO”**

que presentó

IBI. Edna Yolanda Esparza Lucario

Comité Tutorial:

Director: Ernesto Favela Torres

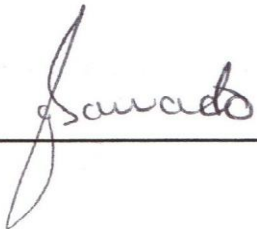
Asesor: Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Asesor: Gerardo Gutiérrez Sánchez

Jurado:


Presidente:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda



Secretario:

Dra. Adela Irmene López Ortiz



Vocal:

Dra. Luz María Zenit Tovar Castro



Vocal:

M. en B. Lorena Leticia Pedraza Segura



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.

A **Dios**, por la vida, la oportunidad de vivirla, y la madre que me dio.

A mí **mamá Toñita**, por todo el amor, confianza y apoyo incondicional que me ha brindado toda la vida.

A mis hermanas **Paty, Sandra**, y a mis cuñados **Gerardo y Javier**, por su apoyo en todo momento.

Al **Dr. Ernesto Favela Torres**, por su paciencia, comprensión, apoyo y dirección de esta investigación.

A **María Isabel Juárez Cárdenas** por su apoyo en la parte experimental del sistema de recuperación de etanol.

A todos los integrantes de la **Planta Piloto 4. De fermentaciones en medio sólido**, por el excelente ambiente en el que trabajé durante todo el trabajo experimental y de escritorio.

Y a todos aquéllos que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

GRACIAS

EDNA ESPARZA

RESUMEN

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa que lleva a cabo el metabolismo de la glucosa mediante la ruta de Entner-Doudoroff. Su metabolismo es muy especializado y aporta la ventaja de que el 98% de la glucosa metabolizada se convierte en etanol y CO₂ equimolarmente y sólo el 2% de la glucosa se va a biomasa, de ahí que se obtenga 1 mol de ATP por mol de glucosa fermentada. La desventaja más importante de *Zymomonas mobilis* es la limitada variedad de fuentes de carbono que puede metabolizar (glucosa, fructosa y sacarosa).

En la literatura existen reportes de que *Zymomonas mobilis* puede soportar altas concentraciones de glucosa (300 g/L), convirtiéndola rápida y eficientemente en etanol, además de poseer una alta velocidad de consumo de glucosa (4.0 g/Lh obtenida durante la fermentación en medio sólido (FMS) y en fermentación en medio líquido (FML) de 200 g/L de glucosa en este estudio) en comparación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (microorganismo que desde la antigüedad se ha utilizado para la producción de etanol en medio líquido).

En este trabajo se estudió la velocidad de consumo, conversión de glucosa y producción de etanol por *Zymomonas mobilis* en FMS sobre agrolita como soporte inerte a las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 g/L de glucosa, logrando establecer las condiciones, técnicas y procedimientos para llevar a cabo las fermentaciones.

En las FML de las concentraciones de glucosa antes mencionadas *Zymomonas mobilis* consumió en 24 horas el 98% para las concentraciones de 50 y 100 g/L con una velocidad de consumo de 2.0 y 4.1 g/Lh, mientras que para 150 y 200 g/L el consumo fue del 98 y 93% de la fuente de carbono a las 48 horas de fermentación a una velocidad de consumo de 3.1 y 3.9 g/Lh. El pH final fue de 5.17, 5.10, 4.80 y 4.20. En FMS *Zymomonas mobilis* tuvo un consumo del 95, 96, 96 y 97% de glucosa con una velocidad de consumo de 2.0, 4.0, 3.0 y 4.0 g/Lh. Obteniendo un pH final en las fermentaciones de 5.15, 4.70, 4.60 y 4.10. El etanol producido para las concentraciones fermentadas en FML fue de 21, 44, 75 y 88 g/L, lo que corresponde a un 85, 89, 100 y 88% respecto al valor teórico con un rendimiento ($Y_{\text{EtOH/Glucosa}}$) de 0.42, 0.44, 0.50 y 0.44 g_{EtOH}/g_{Glucosa} (desviación estándar (δ)=1.7, 2.1, 3.3 y 10.7). Mientras que en las FMS se obtuvieron 19, 43, 66 y 105 g/L de etanol, lo que corresponde al 76, 85, 88 y 105% del valor teórico, con un rendimiento ($Y_{\text{EtOH/Glucosa}}$) del 0.38, 0.43, 0.44 y 0.52 g_{EtOH}/g_{Glucosa} (δ =1.9, 3.8, 1.2 y 1.4).

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el presente trabajo se puede concluir que la FMS de 200 g/L de glucosa por *Zymomonas mobilis* utilizando agrolita como soporte inerte, tuvo un rendimiento de etanol de 0.46 y en FML de 0.47, lo que indica que ambos procesos son similares.

Zymomonas mobilis consume rápida y eficientemente hasta 200 g/L de glucosa en FMS por lo que se sugiere como perspectivas para próximas investigaciones analizar concentraciones superiores a 200 g/L (250 y 300 g/L) utilizando el sistema de recuperación de etanol.

ABSTRACT.

Zymomonas mobilis is a bacteria Gram-negative, facultative anaerobic. Performing the glucose metabolism the via Entner-Doudoroff pathway. Their metabolism is very specialized besides has advantage of that 98% of glucose becomes ethanol plus CO₂ (equimolar production), and only 2% is used for produce biomass, thence to only obtain one ATP per fermented glucose mol. The more important disadvantage of *Zymomonas mobilis*, is the limited range of carbon source which can metabolize (glucose, fructose, sucrose).

In the literature is reported that *Zymomonas mobilis* supports high concentrations of glucose (300 g/L), converting in into ethanol quickly and efficiently, has a high rate uptake of glucose (3.9 g/Lh, this was obtained after of solid state fermentation (FMS) and liquid fermentation (FmS) of 200 g/L of glucose in this study) in comparation with *Saccharomyces cerevisiae* (this microorganism is used since ancient for ethanol production in FML)

In this paper was studied the rate uptake of glucose, conversion of glucose and the ethanol production for *Zymomonas mobilis* in SSF on perlite as an inert support, at concentrations of 50, 100, 150 y 200 g/L of glucose. Able to establish the conditions, technical and procedures for carr out the fermentations.

The strain *Zymomonas mobilis* has a high glucose uptake rate (4.0 g/Lh). High concentrations of glucose (300 g/L) can be efficiently and rapidly converted to ethanol, compared with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (commonly used microorganism for the production of ethanol in liquid medium).

In this paper we studied the uptake rate of glucose, consumed glucose and the ethanol production in FMS on agrolite as inert support the concentrations of 50, 100, 150 and 200 g/L of glucose. We have established the conditions, techniques and procedures to carry out the fermentations.

In the FmS of the concentrations before mentioned, *Zymomonas mobilis* consumed in 24 h the 98% for 50 and 100 g/L with glucose uptake rate of 2.0 and 4.1 g/Lh, while for 150 and 200 g/L consumed 98 and 93% of carbon source in 48 h of fermentation with glucose uptake rate of 3.1 and 3.9 g/Lh. The final pH was of 5.17, 5.10, 4.80 and 4.20. In FMS *Zymomonas mobilis*, consumption was 95, 96, 96 and 97% of glucose with glucose uptake rate of 2.0, 4.0, 3.0 and 4.0 g/Lh. The final pH of fermentations was of 5.15, 4.70, 4.60 and 4.10. The production ethanol in FML was of 21, 44, 75 and 88 g/L, this correspond to 85, 89, 100 and 88% of theoric value, with a yield ($Y_{EtOH/Glucose}$) of 0.42, 0.44, 0.50 and 0.44g_{EtOH}/g_{Glucosa} ($\bar{\delta}$)

(standard deviation)= 1.7, 2.1, 3.3 and 10.7), while in FMS was of 19, 43, 66 and 105 g/L of ethanol, this correspond to 76, 85, 88 and 105% of theoric value, with a yield ($Y_{\text{EtOH/Glucose}}$) of 0.38, 0.43, 0.44 and 0.52 $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{Glucosa}}$ (δ = 1.9, 3.8, 1.2 and 1.4).

In accordance with results obtained in the work present, it can be concluded that SSF of 200 g/L of glucose for *Zymomonas mobilis* on perlite as inert support, had a yield ethanol of 0.46 and the SmF of 0.47, indicating that both processes are similar.

Therefore, is suggested to future investigations analyze concentrations higher at 200 g/L (250 y 350 g/L), utilizing ethanol recovery system..

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Antecedentes de la fermentación en medio sólido	5
2.2. Fermentación en medio sólido	5
2.2.1. Tipo de soporte	5
2.2.2. Ventajas	6
2.2.3. Desventajas	7
2.2.4. Aplicaciones	7
2.3. <i>Zymomonas mobilis</i>	8
2.3.1. Historia	8
2.3.2. Especie	11
2.3.3. Características	11
2.3.4. Sustratos	12
2.3.5. Mecanismo de reacción de los azúcares	13
2.3.6. Transporte de glucosa	14
2.3.7. Usos	15
2.3.8. Comparación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la producción de etanol	15
2.3.8.1. Ventajas	15
2.3.8.2. Desventajas	15
2.4. Etanol	16
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas	16
2.4.2. Materia prima	16
2.4.3. Producción	17
2.4.4. Áreas de aplicación	18
2.4.4.1. Clasificación de los biocombustibles	19
2.4.4.2. Ventajas de su uso como combustible	20
2.4.4.3. Desventajas de su uso como combustible	20
2.4.4.4. Países productores	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	25

	Índice
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos particulares	25
5. HIPÓTESIS	27
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS	31
7.1. Microorganismo	31
7.2. Medio de conservación	31
7.3. Preparación del inóculo	31
7.4. Medios de cultivo	31
7.4.1. Diluciones del medio de cultivo concentrado (223 g/L de glucosa)	32
7.4.2. Esterilización de los medios de cultivo	33
7.5. Pretratamiento de la agrolita	33
7.6. Fermentaciones	34
7.7. Sistema de recuperación de etanol	34
7.8. Procedimiento para la extracción de las muestras	36
7.8.1. Procedimiento para la extracción de las muestras en el sistema de recuperación	36
7.9. Análisis de la glucosa residual	36
7.9.1. Preparación de la solución estándar de glucosa	36
7.9.2. Preparación de la curva patrón de glucosa	36
7.9.3. Preparación de las muestras para el análisis	37
7.9.3.1 Análisis de la glucosa residual	37
7.9.4. Análisis del etanol producido	38
7.9.4.1. Preparación de la solución estándar de etanol para su análisis por cromatografía de gases	38
7.9.4.2. Preparación de la curva patrón de etanol	38
7.9.4.3. Preparación del estándar de etanol para su análisis por HPLC	39
8. TÉCNICAS ANALÍTICAS	41
8.1. Cuantificación de la glucosa residual	41
8.2. Acidez del medio de cultivo	41
8.3. Cuantificación del etanol producido	41
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
9.1. Consumo de glucosa en FML y FMS con el medio de cultivo 1	44

9.2. Consumo de glucosa en FML y FMS utilizando el medio de cultivo 2	46
9.3. Consumo de glucosa y producción de etanol con el medio de cultivo 3 utilizando el sistema de recuperación de etanol	53
10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
10.1. Conclusión general	60
10.2. Conclusiones particulares	60
10.3. Perspectivas	60
12. LITERATURA CONSULTADA	62
ANEXOS	69
ANEXO A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
ANEXO B. Alimentos fermentados en FMS	70
ANEXO C. Constitución de la materia prima	71
ANEXO D. Enzimas catabólicas durante la glucólisis	73
ANEXO E. Historia del uso del etanol como biocombustible	74
ANEXO F. Reactivación de <i>Zymomonas mobilis</i>	75
ANEXO G. Agrolita. Soporte inerte	76

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en medio sólido (FMS) es un proceso de crecimiento microbiano que se lleva a cabo sobre un sustrato sólido húmedo con bajo contenido de agua libre (Bigelis y col., 2006), asegurando las condiciones necesarias para el metabolismo microbiano. Posee las ventajas sobre la fermentación en medio líquido (FML) de acelerar la velocidad de la reacción al haber un contacto más directo del microorganismo con el sustrato, de reducir el tamaño del reactor y las instalaciones de destilación del producto final; así como baja demanda de esterilidad debido a la baja actividad de agua.

Existen muchas investigaciones sobre la FMS; en éstas, se han utilizado diferentes tipos de soporte; de tipo natural (el más utilizado) como: remolacha, caña de azúcar, almidón de arroz, etc., y de tipo inerte (menos utilizado) como agrolita y espuma de poliuretano (PUF). El soporte inerte sirve para absorber el medio de cultivo y como punto de anclaje para el crecimiento microbiano.

La FMS se ha utilizado para la obtención de productos alimenticios, farmacéuticos, para la producción de enzimas, células y etanol, entre otros.

El proceso de producción de etanol se ha llevado a cabo utilizando soportes naturales. En 1992, Amin utilizó pequeños trozos de remolacha para la producción de etanol. En la literatura no existen reportes de producción de etanol por FMS con soportes inertes.

Desde la antigüedad el proceso para la producción de bebidas alcohólicas se ha llevado a cabo mediante la FML del jugo de las plantas por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo A) microorganismo comúnmente utilizado, sin embargo, en los años 50s Gibbs y DeMoss dieron a conocer que *Zymomonas mobilis* lleva a cabo el catabolismo de la glucosa mediante la vía de Entner-Doudoroff (utilizada por bacterias aerobias) y que es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de glucosa. Swing y de Ley, en 1977 aislaron 40 cepas del género *Zymomonas* que crecen a 200 g/L de glucosa, de las cuales el 54% lograron crecer a 400 g/L mientras que Lee en 1980 reportó que *Zymomonas mobilis* ZM4 crece a 300 g/L de glucosa y altas concentraciones de etanol.

Swing y de Ley (1977) reportaron la producción de 100 g/L de etanol a partir de una concentración de glucosa de 250 g/L. En 1980, Lee reportó la producción de 127 g/L de etanol a partir de 300 g/L de glucosa. Sreekumar en 1991, reportó una productividad de etanol de 2 g/Lh a partir de 100 g/L de glucosa.

Zymomonas mobilis puede crecer en un amplio rango de pH, Panesar en 2006 reportó su crecimiento en un rango de 3.50 a 7.50, así como de convertir rápida y eficientemente la glucosa a etanol y CO₂.

La importancia de estas características de la bacteria, llamaron la atención dando paso a múltiples investigaciones utilizando la FML y muy pocas en FMS.

En este documento se presenta una amplia revisión bibliográfica relacionada con la producción de etanol por *Zymomonas mobilis*, la justificación, objetivos, hipótesis y la estrategia experimental a seguir para alcanzar los objetivos planteados.

En seguida de forma detallada se muestra la estrategia experimental, los métodos, materiales, resultados y la discusión de los mismos, las conclusiones más relevantes, y las perspectivas de este trabajo.

En la presente investigación se pudieron establecer las condiciones para llevar a cabo la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* en FMS a partir de un medio de cultivo en el que hizo variar la glucosa fermentada de 50 a 200 g/L, utilizando agrolita como soporte inerte.

Zymomonas mobilis puede metabolizar eficientemente hasta 200g/L de glucosa en FMS con una glucosa consumida del 97% a una velocidad de consumo de 4.0 g/Lh y una producción de etanol de 105 g/L a las 48 horas de incubación, lo que corresponde al 105% respecto al valor teórico, con una desviación estándar de 1.4 (δ).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes de la fermentación en medio sólido

La FMS es conocida y utilizada desde hace más de 3000 años por los Egipcios en la producción de salsa de soya y de pan (Hölker, 2004). Otros procesos conocidos desde hace más de 1000 años a.C. y los cuales se realizan a través de FMS son: la producción de Koji (Anexo B), de alimentos fermentados como miso, tempeh y pozol; La maduración de quesos con moho como el Roquefort, producción de cultivos iniciadores para la fermentación de cervezas, así como, el ensilaje y compostaje (Ooijkass y col., 2000). Desafortunadamente, la FMS fue ignorada debido al éxito que ha tenido la FML a gran escala.

Diversos estudios han demostrado algunas de las ventajas que ofrece la FMS sobre la FML (Lee y col., 2011; Singhanía y col., 2009, Pandey, 2003; Ooijkaas y col., 2000).

2.2. Fermentación en medio sólido

La FMS es un proceso de crecimiento microbiano que se lleva a cabo sobre un sustrato sólido húmedo con bajo contenido de agua libre (Bigelis y col., 2006); asegurando las condiciones necesarias para el metabolismo microbiano. Está técnica posee un potencial económico muy importante ya que permite obtener productos alimenticios, de la industria agrícola y farmacéutica (Ooijkaas y col., 2000; Singhanía y col., 2009).

Para llevar a cabo la FMS se pueden utilizar diversos materiales como soporte o sustrato. Es importante saber elegir el soporte adecuado por lo que a continuación se explican los tipos de soporte.

2.2.1. Tipos de soporte

La fermentación en medio sólido depende de la naturaleza del soporte utilizado, el cual se clasifica como natural e inerte (Ooijkaas y col., 2000).

El material natural sirve como soporte y fuente de nutrientes. Este tipo de soporte es el más utilizado (Ooijkaas y col., 2000). Entre ellos se encuentran, la caña de azúcar (Sreekumar y Basappa, 1991), remolacha azucarera, sorgo dulce (Amin, 1992), almidón, lignocelulosa, productos agrícolas o agroindustriales como granos, coproductos de cereales, yuca, papa, frijol (Ooijkaas y col., 2000), celulosa (Chen, 2007), pulpa de manzana, vainas de sorgo de algarroba, sorgo dulce, papa dulce, harina de trigo, y almidón de arroz (Pandey, 2000), entre otros.

El material inerte puede ser de origen natural o artificial, este se impregna con un medio de cultivo inoculado y no proporciona nutrientes para el metabolismo microbiano. El soporte inerte sirve únicamente como punto de anclaje al microorganismo y para absorber los nutrientes necesarios. Este tipo de materiales son menos utilizados que los naturales para procesos de FMS (Ooijkaas y col., 2000). Ejemplos de materiales inertes son la agrolita (Polatli y col., 2001; Dogan y Alhan, 2003), la espuma de poliuretano “PUF” (Díaz-Godínez y col., 2001; Bigelis y col., 2006) y la vermiculita (Ooijkaas y col., 2000). El soporte inerte posee la ventaja de aportar una mayor consistencia estructural al proceso en comparación con los sustratos sólidos naturales.

2.2.2. Ventajas

La FMS (al utilizar un soporte inerte) posee las siguientes ventajas en comparación con la FML.

Requiere de baja demanda de agua durante la fermentación (Chen y col., 2007; Hölker y col., 2004). Se obtiene alta concentración del producto final (Hölker y col., 2004). Se obtiene mejores características del producto (con menos impurezas) (Ooijkaas y col., 2000). Se obtiene un alto rendimiento del producto (Ooijkaas y col., 2000).

Los productos extracelulares son extraídos fácilmente (Ooijkaas y col., 2000). Se obtiene alta productividad en reactores pequeños (Chen y Li, 2007; Amin, 1992; Hölker y col., 2004). Hay una reducción de los requerimientos energéticos, al usar un destilador más pequeño (Ooijkaas y col., 2000; Amin, 1992).

Facilita la reproducibilidad de estudios fisiológicos, y cinéticos (Ooijkaas y col., 2000). Ofrece un enorme potencial para el control y monitoreo de procesos, así como la reproducibilidad de los mismos, (característica importante en los procesos industriales fermentativos) (Ooijkaas y col., 2000). Hay una aceleración de la reacción al haber una mayor velocidad de contacto entre el sustrato y el microorganismo (Ooijkaas y col., 2000).

Aporta una estructura física constante durante todo el proceso (favoreciendo así el control de la transferencia de calor y masa) (Ooijkaas y col., 2000). Se puede llevar a cabo una fermentación directa sobre materiales ricos en azúcares, evitando el proceso de extracción (Ooijkaas y col., 2000; Amin, 1992).

Permite manejar altas concentraciones de sustrato y producto (Ooijkaas y col., 2000). Se obtiene un incremento en la estabilidad del producto (Hölker y col., 2004). Se tiene una baja represión catabólica (continúa la fermentación aun cuando haya alta concentración de

sustrato) (Hölker y col., 2004). Facilita el cultivo de microorganismos que metabolizan sustratos sólidos insolubles en agua (Hölker y col., 2004). Pueden cultivarse diversos hongos, debido a que esta técnica simula el medio ambiente natural (Hölker y col., 2004). Se puede llevar a cabo una fácil aireación (Hölker y col., 2004). Requiere de baja esterilidad por la baja actividad de agua utilizada (Hölker y col., 2004). Permite estudios de formulación de medios de cultivo al igual que en FML. Ayuda a que exista una alta transferencia de oxígeno, al utilizar un material inerte que por su naturaleza es poroso (Pandey, 2003). El soporte inerte puede reutilizarse (Ooijkaas y col., 2000).

2.2.3. Desventajas

El proceso de la FMS (cuando se utiliza un soporte natural) presenta las siguientes desventajas sobre la FML.

La baja humedad del sustrato puede limitar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo (Bhargav y col., 2008).

Pueden existir gradientes de temperatura, pH, humedad y concentración de sustrato durante la fermentación (estos son difíciles de controlar al haber poca disponibilidad de agua) (Hölker y col., 2004; Rodríguez y col., 2006).

La aireación puede ser difícil debido a la alta concentración de sólidos (Toca y col., 2007). El sustrato requiere pretratamiento (reducción del tamaño de partícula ya sea moliendo, raspando o cortando), homogeneizar física o químicamente, puede requerir hidrólisis, cocción o tratamiento con vapor (Toca, 2007).

Hay dificultad para su escalamiento (Rodríguez y col., 2006). Se produce un mezclado de baja eficacia (Rodríguez y col., 2006). Al manejar altas concentraciones de sustrato puede requerir de la adición de alto volumen de inóculo (Hesseltine, 1987). Puede haber un incremento de los costos para la recuperación del producto (Rodríguez y San Román, 2006).

2.2.4. Aplicaciones

La FMS tiene aplicaciones potenciales en: la producción industrial de productos con alto valor agregado como metabolitos, aflatoxinas, agentes de control biológico, y enzimas (Hölker y col., 2004).

En el enriquecimiento de residuos agroindustriales con proteínas (Ooijkaas y col., 2000). En la producción de ácidos orgánicos, ácido giberélico, ácido L-glutámico, ácido cítrico, polioles, etanol, penicilina, lipasas, nucleasas P1, L-glutaminasa, proteasas, amilasas, celulasas

(Ooijkaas y col., 2000). Producción de esporas (Hölker y col., 2004; Ooijkaas y col., 2000). En el desarrollo de bioprocesos como la bioremediación, la biodegradación de compuestos peligrosos, la desintoxicación biológica de los residuos agroindustriales, la transformación de los residuos de cosechas para enriquecimiento nutricional (Pandey y col., 2000). Producción de metabolitos secundarios biológicamente activos de alto valor agregado como: antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de las plantas, etc (Pandey y col., 2000). Producción de bioplaguicidas incluyendo micropesticidas, bioherbicidas, biosurfactantes, biocombustibles, compuestos aromáticos, etc. (Pandey y col., 2000).

2.3. *Zymomonas mobilis*

2.3.1. Historia.

En la antigüedad en Europa occidental se llevaba a cabo la producción de bebidas como sidra (el jugo de manzana), cerveza, perries (jugo de pera), vino, entre otras bebidas, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. En 1903 Lloyd (citado por Sahm y col., 2006) reportó por primera vez que durante su almacenamiento estos productos se contaminaban, volviéndose turbios, recuperando su transparencia días después, dando paso a la aparición de un precipitado blanco en el fondo, además de una gran producción de CO₂ (Swings y De Ley, 1977) y de ácido sulfhídrico. Esto último también fue reportado por Millis en 1950 (citado por Swings y De Ley, 1977), adicionando la presencia de trazas de acetaldehído y de ácido láctico.

En 1912, Barker y Hiller describieron por primera vez a la bacteria responsable de la enfermedad de la sidra, además se percataron que una sidra enferma tenía las características de la aparición de espuma y abundante formación de gas, presentando cambios en su aroma, sabor, reducción de su dulzura, y el desarrollo de una marcada turbidez, así como, la formación de un depósito pesado. Ellos aislaron y purificaron la bacteria pero no le dieron un registro taxonómico en latín al nuevo microorganismo (Swings y De Ley, 1977; Sahm y col., 2006). Es por eso que el descubrimiento de *Zymomonas mobilis* se le atribuye a Lindner quien en 1924 aisló dicha bacteria del pulque en México y le dio un taxón (Swings y De Ley, 1977). En 1951 Millis aisló varias bacterias de sidras y perries (jugo de pera) parecidas a las aisladas por Barker. Él demostró claramente que el microorganismo causante de la contaminación de la sidra era *Zymomonas mobilis* (Sahm y col., 2006); llegando a la conclusión que los factores que propician la enfermedad de la sidra son: La

baja acidez de la sidra de manzana, el azúcar residual en la sidra madura, y la alta temperatura de almacenamiento (Swings y De Ley, 1977).

Como ya se ha mencionado, desde siempre el microorganismo común para la producción de etanol ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pero en los años 50's empezó a adquirir gran popularidad la bacteria *Zymomonas mobilis* después de que Gibbs y DeMoss descubrieran que el catabolismo anaerobio de la glucosa se lleva a cabo mediante la ruta de Entner-Doudoroff (Swings y De Ley, 1977) (Figura 2.3.1). Esta es una ruta limitada a unas cuantas bacterias Gram negativas con metabolismo oxidativo. Su función principal es aportar piruvato a la célula. Los microorganismos más representativos que llevan a cabo el metabolismo de los carbohidratos por esta vía son: *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Las enzimas glicólíticas y las enzimas de Entner Doudoroff no son inhibidas por etanol, la vía es directamente inhibida por la pérdida de cofactores y coenzimas (García y col 2003).

La bacteria *Zymomonas mobilis* es el primer ejemplo de un organismo anaerobio que usa una ruta utilizada por bacterias aerobias estrictas (Swings y De Ley, 1977).

Zymomonas mobilis se encuentra en zonas tropicales de América, África, Asia, y países subtropicales (Sahm y col., 2006), donde es utilizada para la fabricación de bebidas alcohólicas. Ha sido aislada del jugo de caña de azúcar en Brasil e Islas Fiji, del vino de palma en África central, del grano de cocoa, de la miel en maduración (Sahm y col., 2006), de la cerveza, y del pulque entre otros (Swings y De Ley, 1977).

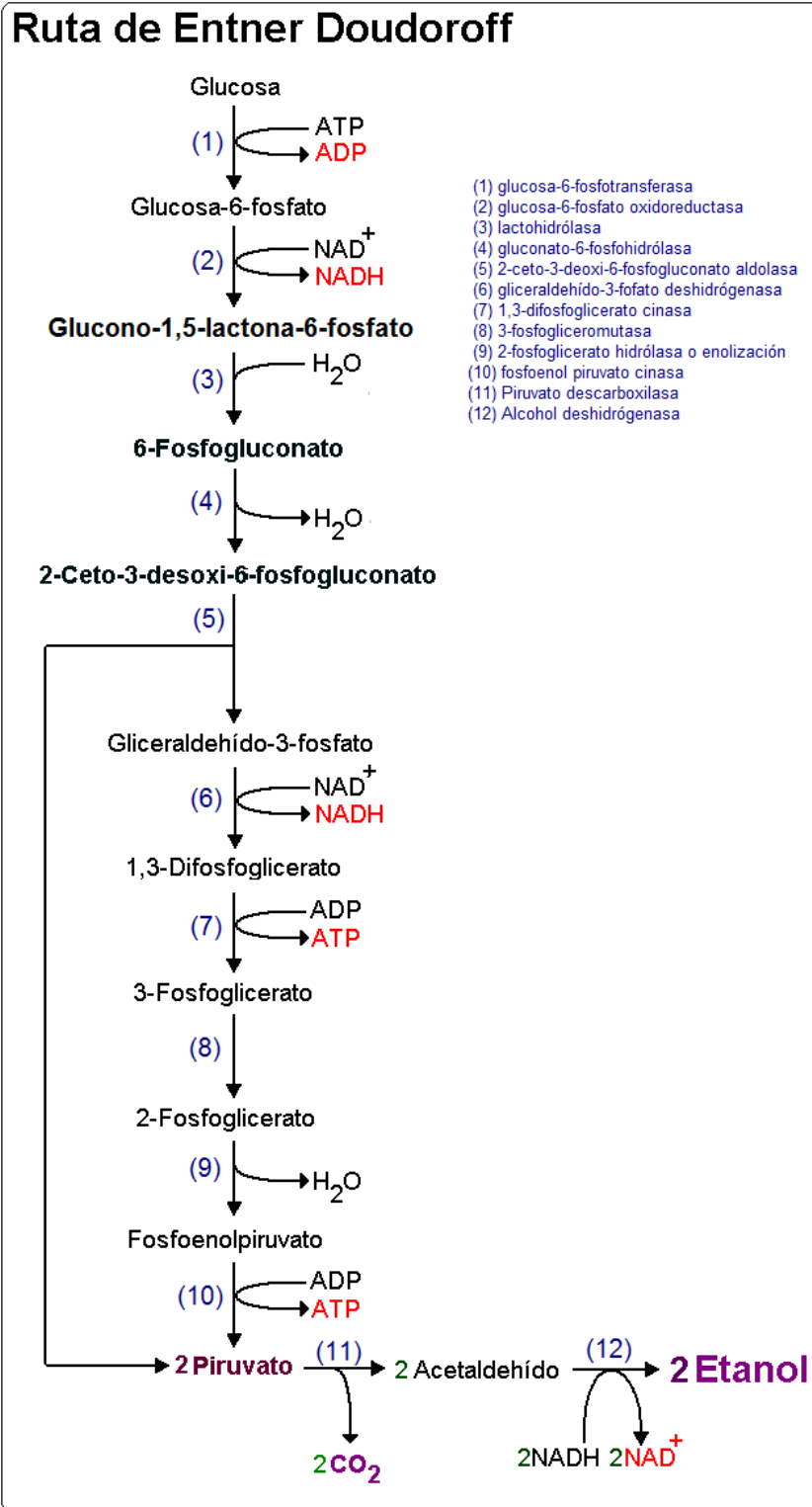


Fig. 2.3.1. Ruta de Entner-Doudoroff

2.3.2. Especie

Existen varias cepas del género *Zymomonas*, Swings y De Ley en 1977 examinaron más de 40 cepas encontradas en Zaire, México, Indonesia, y Gran Bretaña por métodos taxonómicos. Llegaron a la conclusión de que todas las cepas de *Zymomonas* están constituidas por:

Una especie: *Zymomonas mobilis* y dos subespecies:

- ✓ *Zymomonas mobilis* subespecie *mobilis* (la gran mayoría pertenecen a ésta).
- ✓ *Zymomonas mobilis* subespecie *pomaceae* (las 40 cepas analizadas pertenecen a esta subespecie).

2.3.3. Características

La bacteria *Zymomonas mobilis*, es un microorganismo en forma de vaina de 1.0-2.0 x 4.0-5.0µm, con extremos redondeados (Swings y De Ley, 1977), Gram-negativa (Choi y col., 2008; Dien y col., 2003; Erziger y col., 2003; Rhee y col., 1984), anaerobia facultativa (Erzinger y col., 2003; Jones y Doelle, 1991). Es una de las pocas bacterias que degradan glucosa por la vía de Entner-Doudoroff (vía homoetanólica para la producción de etanol) (Dien y col., 2003); No forma esporas (Swings y De Ley, 1977; Schoberth y col., 1996), no tiene cápsula, lípidos intracelulares o glucógeno, es móvil, se le encuentra en parejas (Schoberth y col., 1996), su crecimiento es viscoso, blanco cremoso, lento y limitado en medio sólido (Swings y De Ley, 1977). Es poseedora de una fisiología única que le permite tener un alto rendimiento ($Y_{EtOH/Glucosa} = 0.51$) y productividad de etanol (1.6 g/Lh de etanol, a partir de 120g/L de glucosa) (Dien y col., 2003; DiMarco y Romano, 1985, Sreekumar, 1991). El 50% de la célula comprende el total de proteínas que contiene (Dien y col., 2003). Tolerancia a temperaturas de hasta 40°C (Rogers, 1982) y 127 g/L de etanol (Lee, 1980), 300 g/L de glucosa (Lee, 1980) y hasta 400 g/L de glucosa (Swings y De Ley, 1977) (en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*) (DiMarco y Romano, 1985).

Durante la fermentación presenta crecimiento desacoplado, esto quiere decir, que puede seguir produciendo etanol en ausencia de crecimiento (Belaich citado en DiMarco y Romano, 1985).

Otra de las características importantes es el contenido de hopanoides en su membrana celular, como hopeno, hopanol (Shigeri y col., 1991) y 1,2,3,4-tetrahidroxipentano-29-hopano (THBH, del que se encontró un valor mayor durante la fase estacionaria debido al incremento en la producción de etanol) (Schmidt y col., 1986); estos participan activamente en mantener

la *estabilidad y viscosidad* de la membrana protegiendo a la célula ya que la acumulación de etanol en el medio de cultivo provocaría inestabilidad en la membrana debido a que el etanol disuelve los lípidos de ésta haciéndola más permeable por lo que habría mayor salida de los fluidos de su interior (Shigeri y col., 1991). Pero no sólo la acumulación de etanol estimula la producción de hopanoides sino, también se encontró que un incremento en la temperatura de 14 a 37°C hace que aumente considerablemente la cantidad de estos en la célula (Schmidt y col., 1986).

Otra característica importante de *Zymomonas mobilis* es que no tiene capacidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa (DiMarco y Romano, 1985).

2.3.4. Sustratos

Zymomonas mobilis no solo produce etanol, ya que el producto que se puede obtener depende de la fuente de carbono. Si el sustrato es glucosa (Rogers y col., 1997) o fructosa, produce etanol y CO₂ equimolarmente (Swings y De Ley, 1977), si el sustrato es glucosa y fructosa (Amin, 1992. Vol. 14) produce además sorbitol; y si el sustrato es sacarosa (Lee y col., 1981) produce levanas, sorbitol, etanol y CO₂ (Barrow y col., 1984; Cazetta y col. 2005; Loos y col., 1994; Bekers y col., 2005). *Zymomonas mobilis* no tiene la capacidad de utilizar polisacáridos u otros monosacáridos como manosa, galactosa, o pentosas (DiMarco y Romano, 1985).

Zymomonas mobilis es una excelente productora de etanol, además de ser capaz de producir otros metabolitos a partir de un proceso simple reduciéndose así el costo para la obtención de cada subproducto, pero esto depende del sustrato que se utilice en el medio de cultivo.

Cuando se utiliza como sustrato sacarosa o una mezcla de glucosa y fructosa, la eficiencia de esta en el medio no es la misma debido a que:

- ✓ Hay bajo crecimiento.
- ✓ Se obtienen un rendimiento teórico de etanol del 90%.
- ✓ Hay formación de subproductos como: dihidróxiacetona, glicerol, y manitol.

Al incrementar la concentración de sacarosa en el medio.

- ✓ Baja el rendimiento de etanol.
- ✓ Baja el consumo de glucosa.

Cuando se emplean melazas y jugo de caña de azúcar se obtiene un rendimiento de etanol del 75% debido a:

- ✓ La división de la sacarosa en glucosa y fructosa.
- ✓ El consumo de fructosa, así como la acumulación de glucosa y fructosa (cuando se encuentra en el medio más de 150 g/L de sacarosa) origina la producción de sorbitol y fructooligosacaridos.
- ✓ Hay formación de polímeros de fructosa “levanas”

De manera teórica se cree que las enzimas catabólicas o las velocidades metabólicas determinan la velocidad de consumo de los monómeros. Debido a esto es la actividad catabólica y no la hidrólisis de la sacarosa la responsable de limitar la velocidad de formación de etanol.

La independencia de la hidrólisis de la sacarosa y el transporte de los azúcares, de la velocidad de consumo de los mismos y de los diferentes mecanismos de control que llevan a cabo las enzimas durante la fosforilación inicial, pueden dirigir el metabolismo por el cual hay formación de fructuosa, sorbitol, oligosacaridos, ácido glucónico y enzimas (Jones y col., 1991).

Cuando se encuentra en presencia de oxígeno parte del etanol se oxida produciéndose ácido acético (Swings y De Ley, 1977. Belaich, 1965).

En la actualidad se ha modificado genéticamente a la bacteria para poder utilizar otros sustratos como: lignocelulosa, almidón, celulosa, hemicelulosa, xilosa, arabinosa, lignina (Balat y Balat, 2009), melazas, vinazas, azúcar de caña, almidón de trigo, almidón de maíz, papa, sorgo, yuca (Vázquez y Dacosta, 2007), fécula (Dien y col., 2003), sagú (sago) (Rhee y col., 1984), arroz integral, cebada sin cáscara (Choi y col., 2008), flores de Mahula (Balat y Balat, 2009), cualquier producto de uso vegetal y residuos de cultivos (Anexo C).

2.3.5. Mecanismo de reacción de los azúcares

Durante el metabolismo de los carbohidratos en *Zymomonas mobilis* cuando crece en un medio complejo (con glucosa), el 98% de la fuente de carbono se va a productos, mientras que sólo el 2% se va a biomasa.

La baja eficiencia energética hace que la biomasa se produzca en un rango de 2.3 a 10.5 g peso seco por mol de glucosa adicionada (Swings y De Ley, 1977).

En seguida se presentan las reacciones características de los diferentes sustratos que metaboliza *Zymomonas mobilis*.

Para la glucosa o fructosa:

Glucosa o fructosa \longrightarrow Etanol + CO₂ + biomasa

Para la glucosa + fructosa:

Glucosa y fructosa \longrightarrow Etanol + Sorbitol + CO₂ + biomasa (Swings y DeLey, 1977)

Para la sacarosa:

Sacarosa \longrightarrow Etanol + CO₂ + Levanas + sorbitol + biomasa

(Barrow y col., 1984; Cazetta y col. 2005; Loos y col., 1994; Bekers y col., 2005)

2.3.6. Transporte de glucosa

La glucosa en *Zymomonas mobilis* es transportada mediante un proceso de difusión facilitada de alta velocidad y baja afinidad, acoplado a la alta expresión de los genes para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa I y II, permitiendo así la rápida y eficiente conversión de glucosa a etanol (García y col., 2003). Esto coincide con lo reportado en 1985 por DiMarco en el que señala que la glucosa es transportada por un sistema de difusión facilitada constitutivo y estereoespecífico, mediante un acarreador por el cual su concentración intracelular rápidamente aumenta al máximo sin exceder la concentración extracelular.

El consumo de D-glucosa o D-fructosa es constitutivo. Cuando se fermenta una mezcla de D-glucosa y D-fructosa el consumo de glucosa es tres o cuatro veces superior al consumo de fructosa. Cuando la fermentación de D-glucosa y D-fructosa ocurre de modo individual se obtiene un crecimiento similar en ambos medios. El crecimiento celular en un medio rico en sacarosa es similar al obtenido en un medio con glucosa o fructosa. Si se tiene una mezcla de D-glucosa y D-fructosa en una proporción 20:1, la glucosa inhibe fuertemente el consumo de fructosa. De otro modo cuando la mezcla se encuentra en proporción 1:20, sólo se presenta un pequeño efecto en el consumo de glucosa. Esto es indicativo que la glucosa y fructosa comparten un sistema de consumo que presenta gran afinidad por la D-glucosa, y que hay una posible competencia por el ATP disponible para la fosforilación por quinasas intracelulares. Se cree que hay una inhibición no-competitiva del consumo de fructosa por la glucosa (inhibición catabólica), o finalmente que haya una inhibición de la fructoquinasa por la glucosa o la glucosa-6-fosfato (DiMarco y col., 1985).

2.3.7. Usos

Los usos que se le dan a la bacteria *Zymomonas mobilis* son:

Producción de etanol por FML (Davis y col., 2006) y FMS (Amin, 1982). Terapéutico (enfermedades renales y metabólicas) (Swings y De Ley, 1977). Producción de levanas y sorbitol (De Oliveira y col., 2007; Bekers y col., 2005). En la producción de enzimas (Anexo D) (Swings y De Ley, 1977; Johns y col., 1991).

2.3.8. Comparación con *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol

2.3.8.1. Ventajas:

Tolera altas concentraciones de alcohol (127 g/L) y glucosa (300g/L) (Swings y De Ley, 1977). Posee una alta tasa específica de crecimiento (para *Zymomonas mobilis* de 10 a 13 h⁻¹ y para *Saccharomyces cerevisiae* de 5 a 6 h⁻¹). Alta productividad. 80 g/L de glucosa son metabolizados por *Zymomonas mobilis* produciendo una concentración final de 39 g/L de etanol en 9 horas, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* produce 36 g/L de etanol en 11 horas, lo que corresponde a una productividad de 4.3 g/Lh y 3.3 g/Lh respectivamente (Davis y col., 2006). Produce alto rendimiento de etanol 0.48 g etanol/g glucosa (Amin, 1992). Baja producción de biomasa. Por ser un procarionte puede ser fácilmente manipulada genéticamente (Schoberth y col., 1996). No requiere control ni adición de oxígeno durante la fermentación (Panesar y col., 2006). Su membrana plasmática contiene hopanoides, compuestos pentacíclicos similares a los esteroides eucarióticos (permite una adaptación de la membrana a los cambios de temperatura y a concentraciones de etanol de hasta el 10% durante la fermentación) (Schmidt y col., 1986). Lleva a cabo la síntesis metabólica de hopanoides que le proporcionan la gran capacidad de crecer y sobrevivir en presencia de etanol (Carey e Ingram, 1983). Su necesidad nutricional es simple (Dien y col., 2003).

2.3.8.2. Desventajas:

La bacteria *Zymomonas mobilis* es considerada una gran productora de etanol (Carey e Ingram, 1983), pero tiene las desventajas siguientes:

Sólo cataboliza glucosa, fructosa y sacarosa (García y col., 2003). Es inhábil para convertir el almidón de manera directa a azúcares simples. No puede catabolizar manosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, arabinosa, dextrina y manitol (Swings y De Ley, 1977). Lleva a cabo el catabolismo de los carbohidratos mediante la ruta de **Entner-Doudoroff**, esto ocasiona que haya un rendimiento de ATP de 1 mol por mol de glucosa fermentada, lo que

hace que requiera de un flujo de carbono rápido (García y col. 2003), lo que la convierte en no apropiada para la formación de biomasa. Los sustratos que puede catabolizar (glucosa, fructosa y sacarosa) son costosos (Rhee y col., 1984; Rogers y col., 1997).

2.4. Etanol

El etanol, también conocido como alcohol etílico, alcohol de grano y en la actualidad llamado bioetanol (Balat y Balat, 2009), es un compuesto orgánico, miscible en agua, cuyas propiedades le confieren una gran versatilidad por lo que puede ser utilizado como fuente de energía renovable (Hahn-Hägerdal y col., 2006), de tal manera que puede reemplazar el combustible fósil (Dien, 2003).

El etanol es una de las fuentes de energía más prometedoras por su origen biológico y renovable (Loos y col., 1994).

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas

Sus *propiedades fisicoquímicas* le confieren características importantes como la de disminuir su volumen cuando se mezcla con agua (1 mL de agua y 1 mL de alcohol da un volumen final de 1.92 mL) y aumentarlo al mezclarse con gasolina. Su grupo hidroxilo le confiere *polaridad* a la molécula incrementándose los enlaces intermoleculares del hidrógeno hidroxilo de una molécula con el hidroxil hidrógeno de la otra, formándose dímeros en estado líquido y monómeros en estado vapor, su punto de ebullición es 78°C y su densidad de 0.79 g/mL (Kirk – Othmer).

2.4.2. Materia prima

La materia prima que se emplea para la producción del etanol es la materia agrícola que contiene azúcares simples, almidón y lignocelulosa (más barato) (Behera y col., 2010; Balat y Balat, 2009; Rutz y Janssen, 2007), esta se divide en tres grupos:

Materia prima que contiene sacarosa como: Caña de azúcar, Remolacha azucarera, Sorgo dulce (en Estados Unidos se investiga su uso, y han llegado a la conclusión que es una planta que puede ser empleada en su totalidad, sin dejar residuos) (Balat y Balat, 2009) y Frutas

Materia prima que contiene almidón como: maíz, papas, sorgo, yuca, trigo, boniatos, arroz y cevada.

Biomasa lignocelulósica: paja, pastos, la combinación de varias cosechas y productos de desperdicio, residuos urbanos que se encuentran en desarrollo, productos de la agricultura (granos) y forestales (Balat y Balat, 2009), camote, fécula, melazas, remolacha, celulosa, residuos agrícolas virutas de madera, entre otros (Hahn-Hägerdal y col., 2006). Las flores de Mahula que son producidas por un árbol que habita en las selvas tropicales de los continentes de Asia y Australia, mismos que en estos lugares se utilizan como: Hojas y flores como alimento. Madera como leña o materia prima para la construcción de muebles. Flor de Mahula para la producción de la bebida típica de estos lugares llamada "Mahulli" (Behera y col., 2009).

Estos son sólo unos ejemplos de la amplia variedad de materia prima que puede ser usada para la producción de etanol, mediante fermentación.

Lo ideal es usar materia prima típica que pueda ser usada por cepas productoras de etanol como: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa (Dien y col., 2003).

2.4.3. Producción de etanol

La producción de etanol se puede llevar a cabo por síntesis biológica. Esta se obtiene a partir de procesos fermentativos utilizando microorganismos como levaduras, bacterias y hongos filamentosos. En la Tabla 2.1 se muestran ejemplos de los microorganismos utilizados en la producción de etanol, cuyos sustratos son: azúcares y materiales lignocelulocíticos (ver 2.4.3) (Hahn-Hägerdal y col., 2006).

Por síntesis química el etanol se obtiene mediante la hidratación catalítica del etileno con H_2SO_4 obteniéndose una mezcla de etanol y agua que simplemente debe destilarse (Favela, 1993; Kirk – Othmer, Enciclopedia). En 1828 se llevó a cabo la primera síntesis de etanol en el laboratorio de Michael Faraday en Cambridge.

Tabla 2.1. Microorganismos utilizados en la producción de etanol.

MICROORGANISMO		LITERATURA
Bacterias	<i>Zymomonas mobilis</i>	Singh y col., 1992
	<i>Escherichia coli</i>	Da Silva y col., 2005
	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Erwinia</i> spp, <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Tolan y Finn, 1987
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Dos Santos y col., 1998
Hongos filamentosos	<i>Fusarium lini</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>F. oxysporum</i> F3, <i>F. oxysporum</i> , DSM 841, <i>F. oxysporum (lini)</i> , <i>Monilia</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Neurospora crassa</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Polyporus anceps</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	Singh y col., 1992
	<i>Mucor indicus</i>	Sues y col., 2005
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yanase y col., 2005; Singh y col., 1992
	<i>Kluveromyces marxianus</i>	Huges y col., 1984
	AF37X	Yu y col., 2008
	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Amin y Verachtert, 1982
	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Lee y col., 1980
	<i>Saccharomyces diastaticus</i>	Amutha y Gunasekaran, 2001
	<i>Candida shehatae</i>	Klinke y col., 2004

2.4.4. Áreas de aplicación

Debido a la gran versatilidad que posee, el etanol puede usarse como componente principal de las bebidas alcohólicas, solvente, desinfectante, anticongelante, combustible (Kirk-Othmer, enciclopedia), entre otros ya que su aplicación es tan amplia que puede dársele uso: Doméstico:

En la iluminación.

En la cocina al sustituir el gas común y al reemplazar la madera y el carbón.

En la Industria química:

Materia prima, para la producción de etileno y acetaldehído. Estos y otros derivados del etanol pueden usarse en la manufactura de plásticos, solventes, lubricantes, fibras sintéticas, y pesticidas entre otros productos (Geller, 1985).

Industria automotriz.

Sustituyendo la gasolina con etanol se favorece el impacto de los contaminantes en el aire, aunque se emiten pequeñas cantidades de aldehídos como contaminantes, y los vehículos no generan emisiones de azufre (Geller, 1985). Hay una reducción en las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos, aumenta el octanaje y el calor de vaporización y puede usarse como combustible para vehículos híbridos (Hahn-Hägerdal y col., 2006).

2.4.4.1. Clasificación de los biocombustibles

Los biocombustibles se clasifican como sólidos, líquidos y gaseosos.

Los biocombustibles sólidos se producen a partir de materia prima como la paja (en forma de pacas, pellets, aserrín y briquetes), arboles (como mimbre, sida hermaohrodita (Virginia fanpetals)).

Los biocombustibles líquidos se obtienen principalmente a partir de la fermentación de carbohidratos a etanol, la fermentación butílica de la biomasa para obtener alcohol butílico o a partir de la esterificación de aceites vegetales a biodiesel.

Los biocombustibles gaseosos llamados biogás se producen a partir de una fermentación anaerobia de desechos sólidos y líquidos de la producción agrícola animal, como estiércol líquido o de granja. Esos también pueden producirse en el proceso de gasificación de la biomasa, de que se genera gas que es recuperado por destilación.

Los biocombustibles también pueden ser clasificados como: de 1ª, 2ª y 3ª generación.

Los biocombustibles de primera generación, se producen de materia orgánica que puede ser usada como alimentos o forraje. La materia orgánica incluye principalmente almidón, azúcares, grasas animales y aceites vegetales. (Frac, 2010). Estos son obtenidos de cultivos alimenticios como maíz, sorgo, trigo, cebada, etc. (Castillo, 2011)

Los biocombustibles de segunda generación, se producen a partir de productos de celulosa como: madera, paja, hierbas altas perenes o desechos de la industria de la madera. (Frac, 2010), es decir de residuos de procesos agroindustriales y forestales. La ventaja de estos es que puede utilizarse toda la planta (incluyendo el tallo, hojas y cáscaras) y no sólo parte de

ella (donde se utilizan solo granos) como ocurre en la producción de biocombustibles de primera generación.

Los combustibles de tercera generación, son los combustibles celulares, donde se usa hidrógeno como fuente de energía. Las algas son la principal materia prima con la que puede producirse el biocombustible (Frac, 2010). Además de las microalgas se pueden usar otras fuentes microbianas (Castillo, 2011) y poseen la ventaja de que no son una carga para el medio ambiente y son biodegradables (Frac, 2010)

2.4.4.2. Ventajas de su uso como combustible

El daño que los combustibles fósiles ocasionan al medio ambiente no había sido motivo de preocupación, pero en la actualidad se le ha prestado más atención debido a que la combustión de estos ha incrementado los gases de efecto invernadero contribuyendo al calentamiento global; además de la generación de una crisis energética ante el agotamiento de sus reservas (Balat y Balat, 2009). A continuación se citan algunas de las ventajas de utilizar etanol como combustible.

Es un recurso renovable y puede ser desarrollado sustentablemente en el futuro, por ser amigable con el medio ambiente al haber poca emisión de CO₂ y azufre.

Debido al inminente agotamiento del combustible fósil en el futuro y al incremento en su precio, el etanol adquirió importancia económica (Balat y Balat, 2009). Es una fuente de energía sostenible y limpia, proporciona beneficios económicos y ecológicos, al ser uno de los biocombustibles más usados en el mundo (mejora el aire en las áreas metropolitanas). Es un combustible oxigenado que ayuda a reducir las emisiones de efecto invernadero como CO, e hidrocarburos no quemados, así como de óxido de nitrógeno (NO_x).

Ayuda a incrementar la seguridad energética, además de reducir la dependencia del petróleo como combustible. Su uso logrará un incremento en los ingresos rurales al aumentar el empleo.

Su adición a la gasolina realza su octanaje reemplazando así la adición de plomo. Tiene un valor oxigenante en la gasolina llevando a cabo una combustión limpia al reducirse la emisión de gases en los vehículos, proporcionando un razonable valor antidetonante y un mayor octanaje, un amplio límite de flamabilidad, mayor velocidad de flama y, mayor calor de vaporización. Estas propiedades le permiten una alta proporción de compresión así como más corta duración de combustión (Balat y Balat, 2009).

2.4.4.3. Desventajas de su uso como combustible

El etanol posee una densidad energética menor al de la gasolina (66% en comparación de la gasolina). Es corrosivo. Tiene baja luminosidad de la flama. Tiene baja presión de vapor (hace difícil el arranque en frío).

Es tóxico para el ecosistema al haber emisiones de acetaldehído al haber una combustión incompleta. Incrementa la presión de vapor (emisiones de evaporación) al mezclarse con gasolina. (Balat y Balat, 2009).

2.4.4.4. Países productores

En la actualidad es producido por países como Brasil, a partir del azúcar (caña de azúcar), en Estados Unidos a partir de almidón (maíz), en Europa a partir de la remolacha (Rutz y Janssen, 2007).

Estos países (Anexo E) para poder utilizar materiales ricos en almidón, llevan a cabo dos procesos químicos antes de la fermentación, la sacarificación o licuefacción cuyo proceso hace al almidón contenido en este material soluble, después mediante una hidrólisis enzimática obtiene la glucosa que finalmente puede ser fermentada por los microorganismos (Balat y Balat, 2009; Hanh-Hägerdal y col., 2006).

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto negativo de los combustibles fósiles sobre el medio ambiente y al agotamiento de estos recursos no renovables, es de suma importancia la búsqueda de nuevas fuentes energéticas. En este sentido, hemos propuesto emplear un proceso de fermentación en medio sólido para analizar el consumo de glucosa y la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* sobre un soporte inerte como la agrolita, para ver si esta puede ser una alternativa eficiente para su producción, debido a que el etanol es una fuente energética renovable.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- ✓ Demostrar que la FMS de 50 a 200g/L de glucosa por *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol puede llevarse a cabo utilizando agrolita como soporte inerte con mayor eficiencia que en FML.

4.2. Objetivos particulares

- ✓ Definir las condiciones de cultivo en FMS y FML para el estudio del consumo de glucosa.
- ✓ Evaluar el consumo de glucosa en cultivo líquido en medios con concentraciones crecientes de glucosa (50, 100, 150 y 200 g/L).
- ✓ Comparar el consumo de glucosa en FMS y FML a diferentes relaciones medio de cultivo-agrolita a concentración de 100 y 200 g/L de glucosa inicial.
- ✓ Diseñar y comprobar un sistema que permita la recuperación total del etanol producido durante la fermentación.

HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

✓ La velocidad de consumo y conversión de glucosa en etanol por *Zymomonas mobilis* en fermentación en medio sólido serán mayores a las obtenidas en fermentación en medio líquido, a partir de concentraciones de 50 a 200 g/L de glucosa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados se propuso la estrategia experimental esquematizada en la figura 6.1. En la primera etapa se evaluó la composición del medio de cultivo. En la segunda etapa se evaluaron la relación medio de cultivo-agrolita y el efecto de la concentración de glucosa en la fermentación. En la última etapa se evaluó el rendimiento de etanol.

Los experimentos fueron diseñados en todos los casos para que el carbono fuera el nutriente limitante.

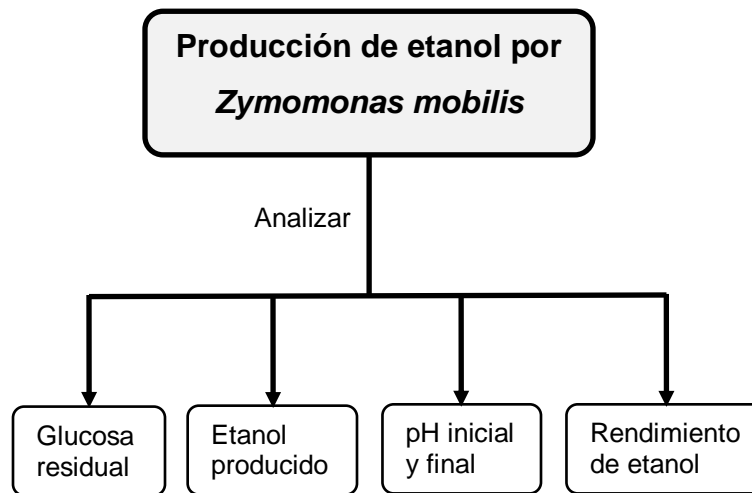


Fig. 6.1. Estrategia experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Microorganismo

La bacteria *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC 38121) fue aislada del LCB4 del CNRS de Francia. Proporcionada por el Dr. Jacques C. Baratti, forma parte de la colección de microorganismos de la planta piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

7.2. Medio de conservación

En la primera parte de este estudio la bacteria se reactivó, conservó y propagó semanalmente con el medio de cultivo 1 (ver sección 7.4), el pH inicial se ajustó a 5, con HCl 2N; se utilizó un inóculo del 10% y la incubación se llevó a cabo a 30°C.

En la segunda y tercera parte, la bacteria se reactivó (Anexo F), conservó y propagó semanalmente con el medio de cultivo 2 (ver sección 7.4)).

7.3. Preparación del inóculo

Para propagar el inóculo se usaron tubos de ensaye con 9 mL de medio de cultivo. El medio fue inoculado (10% v/v) e incubado 72 h a 30°C. Pasado este tiempo se enfriaron a 4°C durante 30 min. A partir de este inóculo se reinocularon dos tubos más (10%v/v inóculo) que fueron incubados a 30°C durante 24 h, poniéndose nuevamente a 4°C durante 1 h ó hasta su uso (el inóculo debe utilizarse el mismo día de su preparación).

7.4. Medios de cultivo

Todos los experimentos fueron diseñados de manera que el carbono fuera el nutriente limitante.

El medio de cultivo 1 fue cambiado por el medio de cultivo utilizado por Vignoli en 2006 al no haber consumo en el primero (medio de cultivo 2) y el medio de cultivo 3 es el mismo que el 2 pero en este se ajustaron las concentraciones de glucosa de tal modo de que al adicionar el inóculo al medio la concentración de glucosa inicial fuera de 50, 100, 150 y 200 g/L, los nutrientes fueron incrementados en la misma proporción que la glucosa.

El medio de cultivo 1 contiene (en g/L): glucosa, 50; extracto de levadura, 2.5; (NH₄)₂SO₄, 0.5; KH₂PO₄, 1.0; MgSO₄ • 7 H₂O, 0.25. El medio de cultivo 2 contiene (en g/L): glucosa, 50, 100, 150 y 200; extracto de levadura, 10; (NH₄)₂SO₄, 1; KH₂PO₄, 3.3; K₂HPO₄, 3.3; MgSO₄ • 7H₂O, 0.5; peptona de caseína 5. El medio de cultivo 3 que contiene (en g/L): glucosa, 55.55,

111.11, 166.66 ó 222.22; extracto de levadura, 11.11; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.11; KH_2PO_4 , 3.66; K_2HPO_4 , 3.66; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.55; peptona de caseína 5.55.

En el medio 1 el pH inicial se ajustó a 5 en todos los casos con HCl 2N, mientras que en el medio de cultivo 2 y 3 el pH inicial fue de 6.43 ± 0.18 (no fue ajustado sólo se midió al momento de prepararlo, esto como estrategia para que durante la fermentación el pH no llegue hasta 3.2 como ocurrió al usar el medio de cultivo 1)

En todos los experimentos se utilizó un inóculo del 10% y la incubación se llevó a cabo a 30°C .

Para los experimentos realizados con el medio de cultivo 1 se prepararon todas las soluciones con concentración diferente por separado. Para el caso del medio de cultivo 2 se preparó un medio concentrado en el que sólo se incrementó el sustrato manteniendo constante la concentración de los nutrientes. A partir de éste se llevaron a cabo las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 50, 100, y 200 g/L de glucosa. Para el medio de cultivo 3, los medios se prepararon por separado ya que se llevaron a cabo las fermentaciones individualmente.

Para cada experimento el medio de cultivo se preparó al momento, es decir, siempre se utilizó medio fresco.

Los cálculos se llevaron a cabo en base a 1 litro de medio de cultivo y al $Y_{\text{EtOH/Glucosa}}$, no se tomó en cuenta el tamaño del reactor ya que el sistema utilizado era infinito por tratarse de un sistema abierto.

7.4.1. Diluciones del medio de cultivo concentrado

Se llevó a cabo la formulación del medio de cultivo 2 en el que se incrementó la concentración de glucosa a 223 g/L, mientras que todos los demás nutrientes se mantuvieron constantes. A partir de éste se llevaron a cabo las diluciones de la siguiente manera:

Para 50 g/L

- ✓ A 6.75 mL de agua destilada se adicionó una alícuota de 2.25 mL de medio de cultivo concentrado, se agitó y adicionó 1 mL de inóculo, de esta manera se obtuvo una concentración de 51 g/L de glucosa.

Para 100 g/L

- ✓ A 4.5 mL de agua destilada se le adicionaron 4.5 mL de medio de cultivo concentrado, se agitó y adicionó una alícuota de 1 mL de inóculo, de esta manera se obtuvo una concentración de 100 g/L de glucosa.

Para 150 g/L

- ✓ A 2.25 mL de agua destilada se le adicionaron 6.75 mL de medio de cultivo concentrado, se agitó y adicionó una alícuota de 1 mL de inóculo, de esta manera se obtuvo una concentración de 150 g/L de glucosa.

Para 200 g/L

- ✓ A 9 mL del medio de cultivo concentrado se le adicionó 1 mL de inóculo de esta manera se obtuvo una concentración de 201 g/L de glucosa.

7.4.2. Esterilización de los medios de cultivo

Los medios de cultivo de 50 y 100 g/L de glucosa se esterilizaron a 15 lb/in² durante 15 min, mientras que los medios de cultivo de 150 y 200 g/L se esterilizaron a 2.5 lb/in² durante 10 min a 94°C, con la válvula de la autoclave abierta para evitar su caramelización.

7.5. Pretratamiento de la agrolita

La agrolita es un vidrio volcánico amorfo viene en un tamaño de partícula irregular por lo que antes de utilizarla se siguieron los siguientes pasos (Anexo G):

- ✓ Se enjuagó perfectamente con agua de la llave, escurriendo lo más que se pudo, repitiendo este paso una vez más.
- ✓ Se enjuagó nuevamente pero con agua destilada a punto de ebullición, dejando reposar hasta que se pudo manipular sin que se corriera el riesgo de sufrir alguna quemadura.
- ✓ Se escurrió perfectamente la agrolita con una coladera y se fue colocando en charolas de aluminio.
- ✓ Se puso a secar en una estufa a 60°C durante 72 horas, removiendo el lecho de la agrolita regularmente hasta lograr un secado uniforme.

Se tamizó la agrolita de la siguiente manera:

- ✓ Se colocaron tres tamices en el siguiente orden (de arriba hacia abajo), primero malla 12, luego malla 16, y después malla 20, y finalmente la charola donde se recolectan las partículas más pequeñas (polvo muy fino).
- ✓ Se recolectaron todas las partículas retenidas en la malla 20 (rango de tamaño de 1 ± 0.2 mm).

La agrolita tiene una capacidad de retención de 3.3 g de agua por gramo de agrolita seca. Al secarse a 130°C en una termobalanza Ohaus (Modelo MB45) se obtuvo una humedad crítica de 1.16 g de agua por gramo de agrolita.

7.6. Fermentaciones

Durante este estudio se realizaron 2 tipos de fermentación; en medio líquido o fermentación sumergida y en medio sólido. En ambos casos se evaluaron concentraciones de glucosa residual y etanol producido.

Fermentaciones en medio líquido. Se realizaron en tubos Eppendorff de 1.5 mL, viales de 4 mL y en botellas serológicas de 120 ml (con 0.5, 2 y 9 ó 70 mL de medio de cultivo inoculado respectivamente. El volumen de operación fue de 0.5, 2 y 9 ml.

Fermentaciones en medio sólido. Se realizaron en tubos Eppendorff de 1.5 mL, en viales de 4 ml y en botellas serológicas de 120 ml conteniendo 0.1, 0.3 ó 3 g de agrolita respectivamente. De igual manera se varió el medio de cultivo inoculado en 0.1, 0.25, 0.5, 0.7, 0.9 mL, ó 10.7 mL, según el procedimiento experimental a llevarse a cabo. El volumen de operación fue de 0.6, 2.1 y 15 mL.

En todos los casos la incubación se realizó a 30°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación, y se sacrificó el contenido de las muestras para su análisis.

Una vez finalizada la fermentación las muestras fueron congeladas hasta su extracción para el análisis de pH, glucosa residual y etanol (cuantificado sólo en los dos primeros experimentos mediante la técnica de cromatografía de gases, para los cuatro últimos (sistema de recuperación de etanol) el análisis se llevó a cabo por HPLC.

7.7. Sistema de recuperación de etanol

Se diseñó un sistema con el cual se pudiera recuperar simultáneamente todo el etanol que se estaba produciendo.

El sistema consta (figura 7.7.1) de una botella serológica (de vidrio) de 120 mL conectada a una trampa de etanol que consta de dos tubos de ensaye de 30 mL los que a su vez

contenían: el primer tubo 20 mL de agua destilada, este a su vez se encuentra conectado a otro tubo de ensaye con 10 mL de agua destilada. Las conexiones entre el reactor y los tubos eran tubos de cobre ajustados en tapones de hule.

Para la FMS se prepararon las botellas serológicas con 3 g de agrolita y se les adicionó 9 mL de medio de cultivo inoculado para las concentraciones de 50 a 150g/L de glucosa, para la concentración de 200 g/L se necesitó adicionar 10.7 mL del medio.

La FML se llevó a cabo en botellas serológicas con 9 mL de medio de cultivo para todas las concentraciones fermentadas.

Pasado el tiempo de fermentación, todo el sistema se colocó a 4°C durante 30 min antes de llevar a cabo la extracción de las muestras.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

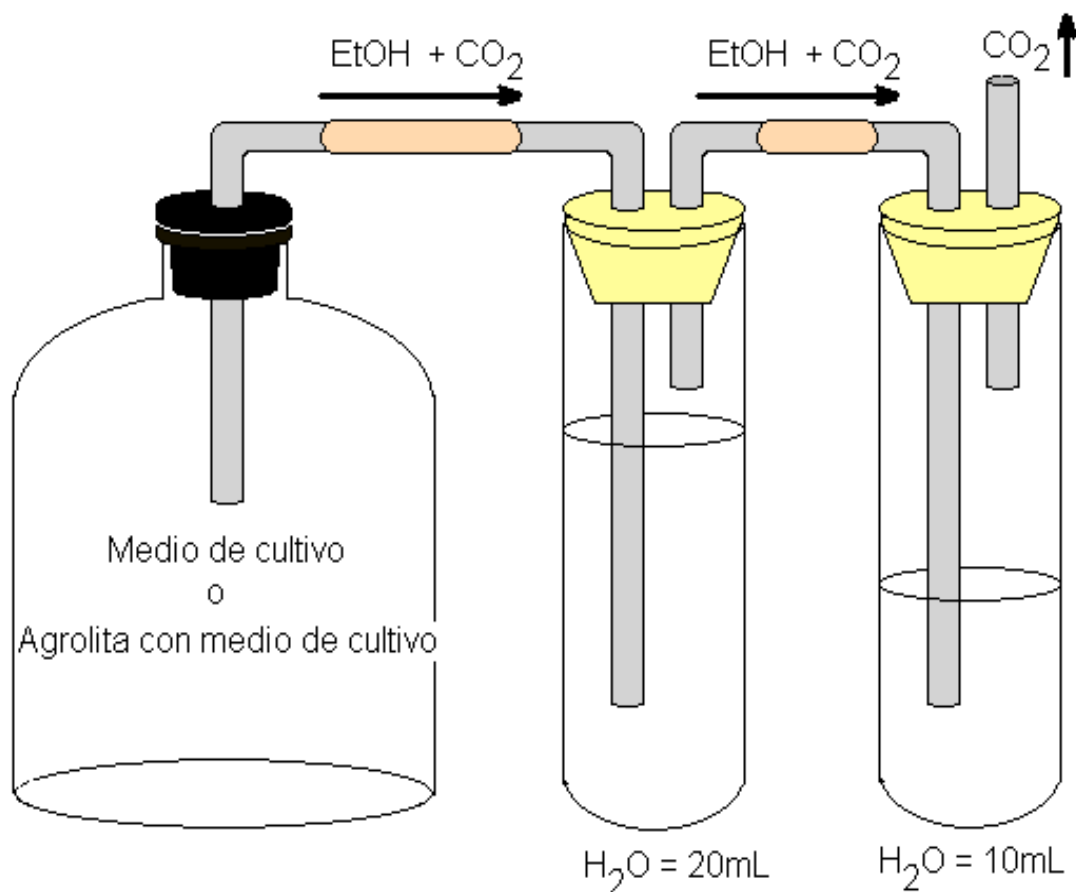


Fig. 7.7.1. Sistema de recuperación de etanol.

En esta parte experimental el volumen de operación en FML fue de 9 ml y de 15 mL en FMS, es decir, el volumen de operación en FMS fue 60% mayor que el volumen ocupado en FML, esto debido al volumen que ocupa la agrolita.

7.8. Procedimiento para la extracción de las muestras

Para el caso de las muestras en FML, las muestras se descongelaron y centrifugaron a 14000 rpm por 2 min y el sobrenadante se decantó y almacenó a 4°C para el análisis de glucosa, etanol y pH. Para las muestras en FMS, se adicionaron 2 mL de agua destilada por cada 300 mg de agrolita inicial. Se agitó en vortex 30 s y se separó cuidadosamente el líquido con una pipeta; posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min y el sobrenadante se decantó y almacenó a 4°C para analizar glucosa, pH y etanol.

7.8.1. Procedimiento para la extracción de las muestras en el sistema de recuperación

Después de estar 30 min a 4°C las muestras de FML y la FMS se retiraron del refrigerador se adicionaron en cada botella serológica los 30 mL de agua destilada contenida en los tubos de ensayo respectivos, siguiendo la misma técnica descrita en la sección 7.8.

7.9. Análisis de la glucosa residual

7.9.1. Preparación de la solución estándar de glucosa

- ✓ Se pesaron aproximadamente 800 mg de dextrosa anhidra (glucosa).
- ✓ Se pusieron en la estufa a 60°C durante 2 h.
- ✓ Pasado este tiempo se puso en un desecador durante 30 min.
- ✓ Pasado este tiempo se pesaron de inmediato 500 mg (se anotó el peso exacto).
- ✓ Se diluyó y aforó con agua destilada a 500 mL.
- ✓ Se distribuyó la solución estándar en tubos Eppendorff de 1.5 mL, y fueron congelados hasta su uso.

7.9.2. Preparación de la curva patrón de glucosa

Para llevar a cabo la curva patrón de glucosa se preparó una serie de seis tubos de ensaye y se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- ✓ Los tubos se etiquetaron como 1, 2, 3, 4, 5, y 6 (se prepararon por triplicado).
 - ✓ Al tubo 1 se le adicionó 1 mL de la solución estándar de glucosa (1 g/L), a los cinco restantes se les adicionó 1 mL de agua destilada.
-

- ✓ Al tubo 2 se le adicionó 1 mL de la solución estándar de glucosa (1 g/L) y se agitó vigorosamente (volumen final 2 mL).
- ✓ Del tubo 2, se tomó 1 mL de la dilución y se adicionó al tubo 3, éste procedimiento se repitió consecutivamente hasta llegar al tubo 6.
- ✓ Al tubo 6, se le retiró 1 mL de solución y se desecho (todos los tubos deben quedar con un volumen final de 1 mL).
- ✓ Una vez terminada la curva patrón, a todas las muestras se les adicionó 1.5 mL del reactivo DNS (Miller y col., 1960).
- ✓ De manera simultánea, se pusieron todos los tubos a ebullición durante 10 min.
- ✓ Pasado este tiempo, se sumergieron simultáneamente en agua fría por 5 min.
- ✓ Finalmente se midió la absorbancia a 640 nm.

7.9.3. Preparación de las muestras para el análisis

7.9.3.1 Análisis de la glucosa residual

Una vez descongeladas las muestras, se hicieron diluciones consecutivas de la siguiente manera:

- ✓ Se prepararon tres tubos para el análisis de cada muestra (con la finalidad de hacer tres diluciones consecutivas 1:11) y se etiquetaron (para la muestra 1, como 1, 1' y 1'', y así consecutivamente para las demás muestras).
 - ✓ A todos los tubos se les adicionó 1 mL de agua destilada.
 - ✓ Se tomó 0.1mL de muestra y se adicionó al tubo 1 (1.1 mL de volumen final), y se agitó vigorosamente.
 - ✓ Del tubo 1 se tomó 0.1 mL y se adicionó al tubo 1', agitando vigorosamente.
 - ✓ Del tubo 1' se tomó 0.1 mL y se adicionó al tubo 1'', agitando vigorosamente.
 - ✓ Finalmente al tubo 1'' se le retiró 0.1 mL de la disolución y se desechó (esto con la finalidad de que todos los tubos tengan un volumen final de 1 mL).
 - ✓ Este procedimiento se llevó a cabo con todas las muestras.
 - ✓ A todos los tubos se les adicionó 1.5 mL del reactivo DNS, y se agitaron vigorosamente.
 - ✓ De manera simultánea se pusieron a ebullición durante 10 min.
 - ✓ Pasado éste tiempo se sumergieron en agua fría durante 5 min y,
 - ✓ Se leyó su absorbancia a 640 nm.
-

En todos los casos el análisis del porcentaje de glucosa consumida se cálculo a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100 =$$

Donde:

S_0 = Glucosa inicial

S_f = Glucosa final

7.9.4. Análisis del etanol producido

7.9.4.1. Preparación de la solución estándar de etanol para su cuantificación por cromatografía de gases

- ✓ Se midieron 0.6 mL de etanol anhidro absoluto directamente en un matraz aforado de 10 mL y se aforo con agua destilada.
- ✓ La solución recién preparada (47 g/L) se distribuyó en tubos Eppendorff de 1 mL y se congeló hasta su uso.

NOTA: La preparación del estándar se debe trabajar en frío y de preferencia el mismo día de la preparación de la curva patrón.

7.9.4.2. Preparación de la curva patrón de etanol

Para llevar a cabo la curva patrón de etanol que fue analizada por cromatografía de gases, se prepararon una serie de seis viales de 4 mL (de vidrio con tapa de baquelita) y se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- ✓ Todos los viales que se utilizaron permanecieron sumergidos en agua con en hielo.
- ✓ Los viales se etiquetaron como 1, 2, 3, 4, 5, y 6 (se prepararon por triplicado).
- ✓ Al vial 1 se le adicionó 1 mL del estándar de etanol (47 g/L), a los cinco restantes se les adicionó 1mL de agua destilada.
- ✓ Al vial 2 se le adicionó 1 mL del estándar de etanol (47 g/L), y se agitó vigorosamente (volumen final 2 mL).
- ✓ Del vial 2, se tomó 1 mL de la dilución y se adicionó al vial 3, éste procedimiento se repitió consecutivamente hasta llegar al vial 6.
- ✓ El vial 6 (volumen final 2 mL), se agitó vigorosamente, se le retiró 1 mL de solución y se desechó (todos los viales deben quedar con un volumen final de 1 mL).

- ✓ Una vez terminada la curva patrón de etanol, se tomaron viales de vidrio de 1.5 mL para el cromatógrafo de gases que previamente se habían etiquetado y puesto sobre hielo, y se les adicionó 0.5 mL de cada vial de la curva recién preparada respectivamente, engargolándose inmediatamente.
- ✓ Posteriormente se analizaron las muestras en el cromatógrafo de gases PERKIN ELMER.

7.9.4.3. Preparación del estándar de etanol para su cuantificación por HPLC

- ✓ Se midieron 0.79 mL de etanol anhidro absoluto directamente en un matraz aforado de 100 mL y se aforó con agua destilada.
- ✓ La solución recién preparada (5 g/L) se distribuyó en tubos Eppendorff de 1mL y se congeló hasta su uso.

TÉCNICAS ANALÍTICAS

8. TÉCNICAS ANALÍTICAS

8.1. Cuantificación de la glucosa residual

Para todos los experimentos la glucosa fue medida mediante la técnica del DNS (Miller y col., 1960), en un espectrofotómetro Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800, a 640 nm, y utilizando cubetas UV semimicro de 1.5 mL.

8.2. pH del medio de cultivo

La acidez del medio fue medida a través del pH con un Potenciómetro Conductronic pH 120, que fue calibrado con las siguientes soluciones buffer:

- ✓ Buffer pH 7 (Fosfato).
- ✓ Buffer pH 4 (Biftalato).

8.3. Cuantificación del etanol producido

El etanol producido (medido sólo en algunos experimentos) para los primeros experimentos se cuantificó mediante cromatografía de gases, con los siguientes parámetros:

Cromatógrafo de gases: Perkin Elmer (Auto System XL)

- ✓ Columna capilar PERKIN ELMER. N931-6352. PE-FFAP (ácido nitrotereftálico modificado, enlazado con polietilenglicol).
 - Largo: 30m
 - Diámetro interno: 0.25mm.
 - Fase estacionaria: 0.25 μ m.
 - Temperatura: 40-250°C.
 - ✓ Condiciones de la técnica.
 - T_{horno}: 125°C
 - T_{DIF}: 250°C (proporción de H₂, Aire. (1:10)).
 - T_{inyector}: 250°C
 - t_{corrida}: 2.5 min.
 - Gas acarreador: He.
 - Gas comburente: H₂.
 - Gas comburente: Aire.
 - ✓ Flujos de los gases:
 - Split: 24 mL/min
 - H₂: 45 mL/min
-

Aire: 490 mL/min

El etanol producido en los últimos cuatro experimentos (sistema de recuperación de etanol) fue analizado mediante la técnica de HPLC con los siguientes parámetros:

Columna: 8 μ m ROA Organic Acid (300 X 7.8mm)

Largo: 30cm

Diámetro interno: 0.25mm

Fase estacionaria: 0.25 μ m

Temperatura: 40-250°C

Fase móvil: H₂SO₄ 0.025N

Flujo: 0.6 mL/min

Temperatura: 50°C

Inyección: 20 μ L

Detector: LC-30 RI Detector

Bomba: Perkin Elmer Binary LC Puma 250

Integrador: Perkin Elmer NCI 900 Network Chro

Horno: Eppendorff TC-50

Software: Total Chrom Navigator Series 250

RESULTADOS Y DISCUSIONES

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1. Consumo de glucosa en FML y FMS con el medio de cultivo 1

Se estudió el consumo de glucosa con el medio de cultivo 1 (ver sección 7.4) en FML (Figura 9.1.1) a concentraciones iniciales de 50, 100, 150, y 200g/L de glucosa obteniendo concentraciones finales de etanol de 20.75, 23.23, 16.75, y 3.51g/L, que corresponden al 83, 46, 22, y 4% del valor teórico respectivamente.

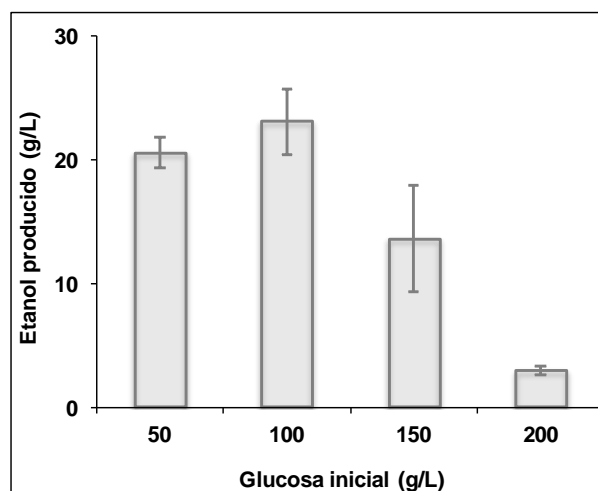


Fig. 9.1.1. Etanol producido a partir del medio de cultivo 1, haciendo variar la concentración de glucosa de 50 a 200g/L en FML a las 48 horas de fermentación.

El pH inicial de las fermentaciones fue de 5, en la figura 9.1.2 se presentan los valores finales de pH que fueron de 3.15, 3.26, 3.65 y 3.54 de acuerdo a las concentraciones fermentadas. En todos los casos, el pH final fue menor a 4.0.

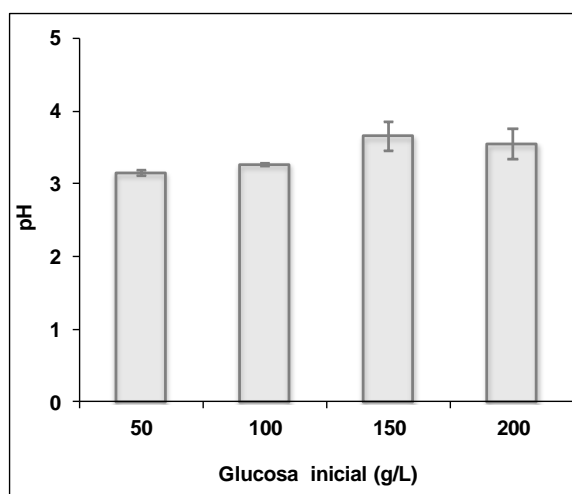


Fig. 9.1.2. Valores de pH a las 48 horas de la FML.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre su consumo en FMS a las mismas concentraciones del experimento anterior. Se evaluaron dos diferentes relaciones medio de cultivo-agrolita, 1:1 y 2.5:1, (a 0.1 g de agrolita se les adicionó 0.1 ó 0.25 mL de medio de cultivo fermentado). Como control, se realizaron cultivos líquidos de 0.5 mL de medio fermentado con las mismas concentraciones de glucosa. Los resultados obtenidos muestran que en medio líquido se obtuvieron concentraciones residuales de glucosa de 10, 23, 52 y 156 g/L para las concentraciones indicadas. En el caso de los cultivos en FMS el consumo de glucosa fue de 19, 38, 85 y 133 para la relación 1:1 y de 16, 39, 102 y 133 para la relación 2.5:1, por lo que el consumo de glucosa fue prácticamente independiente de la relación medio de cultivo-agrolita (Figura 9.1.3).

Al no haber un consumo total de glucosa en ninguna de las condiciones evaluadas, se decidió no medir el etanol producido.

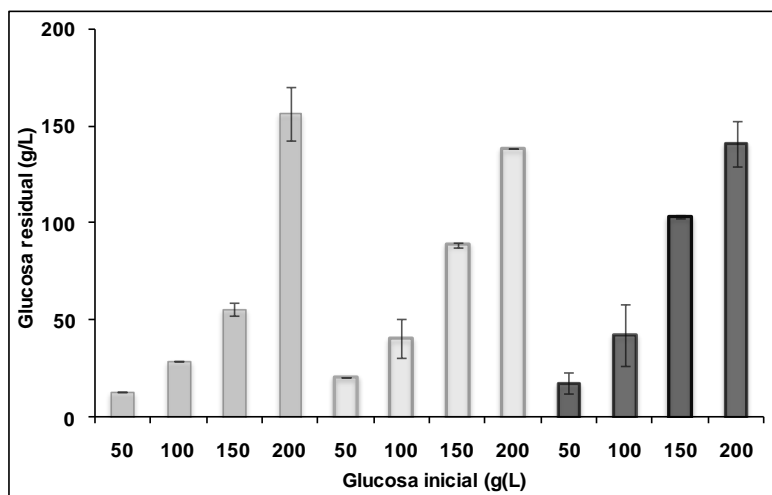


Fig. 9.1.3. Glucosa residual en FML (■ 0.5 mL de medio) y en FMS (con proporciones de medio de cultivo-agrolita de □ 1:1 y ■ 2.5:1). Después de 24 h (50 y 100 g/L) y 48 h (150 y 200 g/L).

El pH inicial de las fermentaciones fue de 5. En la figura 9.1.4 puede apreciarse que al final de la fermentación el pH en todos los casos es menor a 4.

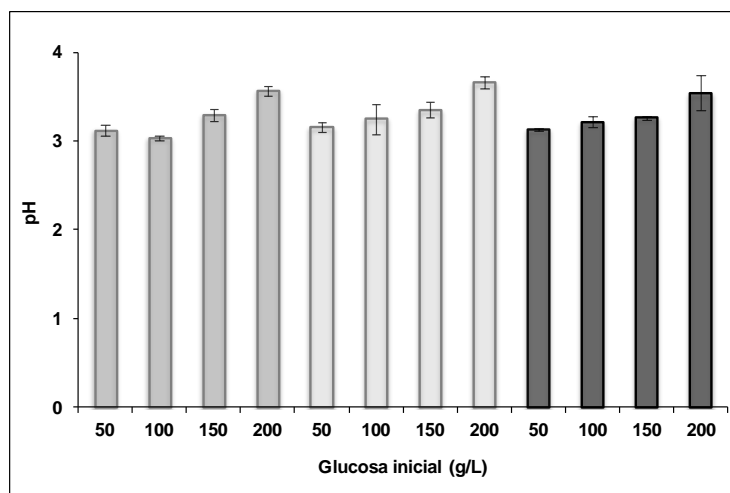


Fig. 9.1.4. pH al final de la FML de 0.5 mL de medio y en FMS en la proporción de 1:1 y 2.5:1 (medio de cultivo-agrolita).

Podríamos pensar que la alta concentración de glucosa pudo haber inhibido la producción de etanol según lo mencionan Gunasekaran, 1986 y Kalnenieks en 2006, pero esto es descartado ya que Rogers en 1997 reportó una glucosa residual de 10 g/L a una concentración inicial de 200 g/L en FML para *Zymomonas mobilis*.

En medio sólido, no tenemos con que comparar el consumo de glucosa sobre agrolita pero con estos antecedentes en medio líquido podemos descartar que la alta concentración de glucosa sea el motivo del casi nulo consumo.

En ambos experimentos se tuvo un intervalo de pH final de 3.46 ± 0.34 , y aunque hay reportes de que *Zymomonas mobilis* tolera un rango de pH de 3.5 a 7.5 (Panesar y col., 2006), Lawford reportó en 1983 que en un rango de pH de 4.0 a 5.5 el rendimiento de etanol no se ve comprometido, por lo que de acuerdo a esto el bajo consumo de glucosa se debió a la acidez del medio de cultivo, que hizo poco favorable la producción de etanol al estar muy cercano a 3.

9.2. Consumo de glucosa en FML y FMS utilizando el medio de cultivo 2

Por lo anterior, se decidió modificar la composición del medio de cultivo de tal manera que se pudiera amortiguar el pH obteniendo valores finales de esta variable, superiores a 4.0 además de no ajustar el pH del medio inicial. Para ello, se seleccionó el medio Vignoli (2006) con algunas modificaciones (ver sección 7.4). Con este medio se llevó a cabo un primer cultivo en FML a concentraciones de glucosa de 50, 100, y 200g/L, se descarta la

concentración de 150 g/L de glucosa por que sólo se estaba probando la estrategia planteada.

La glucosa residual obtenida (Figura 9.2.1) a las 24 horas de cultivo fue de 0.9 y 1.1 g/L para las concentraciones de 50 y 100 g/L de glucosa inicial respectivamente, y de 97 g/L para 200 g/L de glucosa. Para esta última fue necesario incubarla hasta las 48 h en las que se alcanzó una glucosa residual de 21 g/L. La velocidad de consumo de glucosa a las 24 horas, para 50 g/L fue de 2.0 g/Lh; para 100 g/L fue de 4.1 g/Lh; para 200 g/L fue de 3.4 g/Lh, y a las 48 horas para 200 g/L no varió significativamente ya que fue de 3.3 g/Lh.

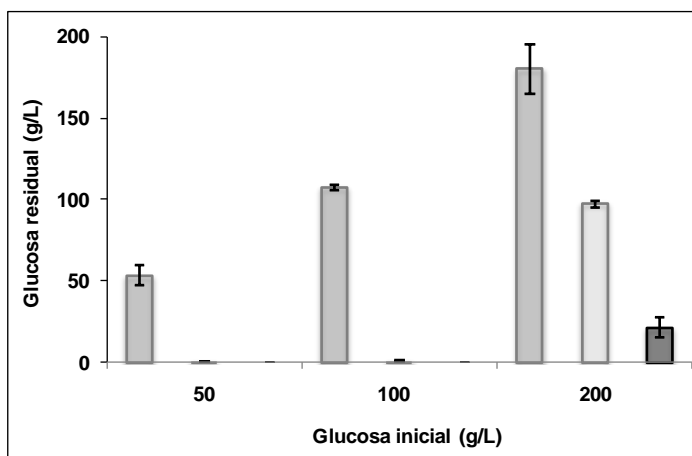


Fig. 9.2.1. Glucosa residual a las 0, 24 y 48 horas de FML utilizando el medio de cultivo 2.

En la Figura 9.2.2 Se puede observar que el consumo de glucosa a las 24 h fue de 98, 99 y 46% de acuerdo a las concentraciones fermentadas, y que 200 g/L de glucosa necesita de un periodo de incubación de 48 h para alcanzar un 88% de consumo.

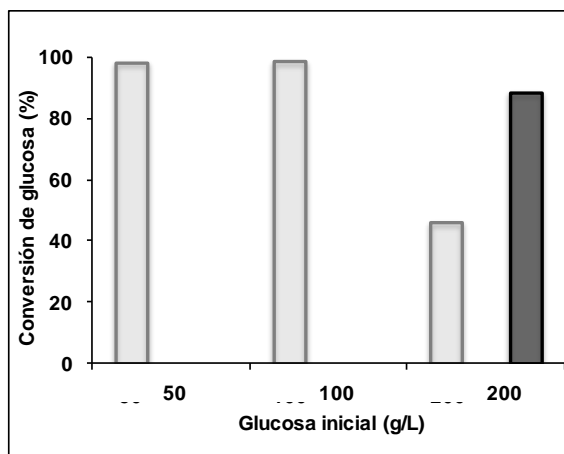


Fig. 9.2.2. Porcentaje de glucosa consumida a las 24 y 48 horas de fermentación.

En la figura 9.2.3 se presentan los resultados de etanol producido. Al final de la fermentación, se obtuvieron 15, 35, y 83 g/L con respecto a las concentraciones fermentadas, lo que corresponde al 60, 70, y 83% del valor teórico, así como un $Y_{\text{EtOH/Glucosa}}$ (rendimiento) de 0.31, 0.35 y 0.42 $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{Glucosa}}$ respectivamente.

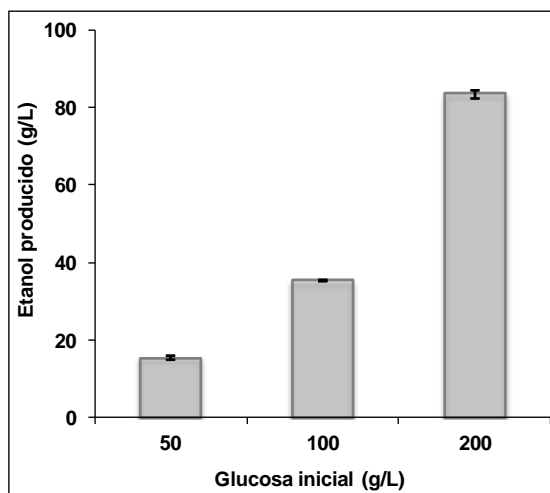


Fig. 9.2.3. Etanol producido con el medio de cultivo 2 en FML a las 24 (50 y 100 g/L) y 48 (200 g/L) horas de fermentación.

La acidez es un factor muy importante en el consumo de glucosa por *Zymomonas mobilis*, Lawford en 1983 reportó que a un pH de 4.0 a 5.5, no se ve afectado el rendimiento de etanol, este debe ser el motivo por el que la mayoría de las fermentaciones se han llevado a cabo a pH 5 mismo que han controlado adicionando NaOH 2N (Sreekumar y col., 1991; Rogers y col., 1997; Lee y col., 1980; Rhee y col., 1984).

Recordando que en los experimentos realizados con el medio de cultivo 1, se ajustó el pH a 5 al inicio de la fermentación, obteniendo un pH final en un rango de 3.46 ± 0.34 , al cambiar al medio de cultivo 2 además de adicionar K_2HPO_4 en la misma proporción que el KH_2PO_4 buscando un efecto amortiguador, se decidió no ajustar el pH inicial del medio de cultivo 2, de acuerdo a la ecuación de Henderson Hasselbach el pH de las concentraciones de fosfato adicionadas esta en un rango de 7.1 ± 1 , por lo que su efecto amortiguador es de 6 a 8 y el pH final de los medios de cultivo en esta etapa del trabajo fue de 4.98 ± 0.88 , por lo que esta estrategia no funcionó, pero si, el no haber ajustado el pH al inicio de la fermentación ya que en todos los casos fue mayor a 4.

En la figura 9.2.4 se presentan los valores iniciales y finales de pH durante las FML con diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Al inicio se tuvieron valores de pH de 5.50, 5.92, y 6.12, a las 24 horas se tenían valores de 4.16, 4.34, y 4.37 para los valores antes mencionados de glucosa, finalizándose con valores de 4.22, 4.44, y 4.37 a las 48 horas. Como se puede observar, ya no hubo una acidificación tan drástica del medio de cultivo, por lo que la estrategia presentada dio buenos resultados.

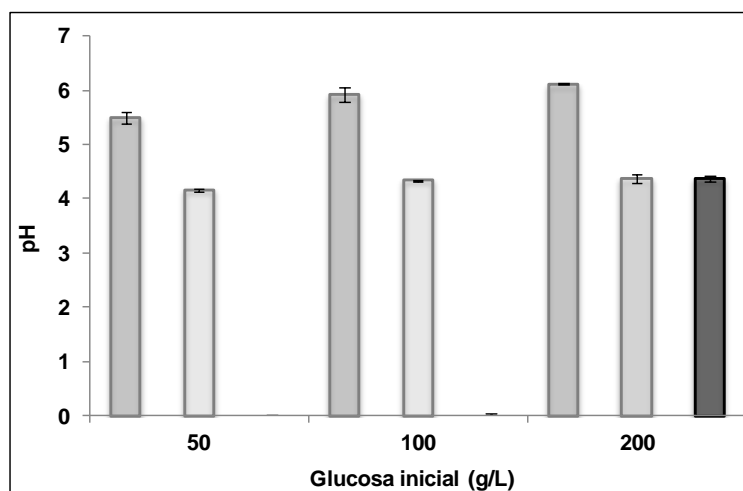


Fig. 9.2.4. Evolución del pH a las 0, 24 y 48 horas de fermentación.

Con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos se llevó a cabo una cinética de consumo de glucosa en FML con una concentración inicial de 200 g/L. La figura 9.2.5 muestra que a las 48 h de cultivo se obtuvo una concentración final de glucosa de 17 g/L, lo que representa el 90% de consumo, una producción de etanol de 80 g/L lo que equivale al 80% del valor teórico así como un $Y_{\text{EtOH}/\text{Glucosa}}$ (rendimiento) de $0.40 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{Glucosa}}$.

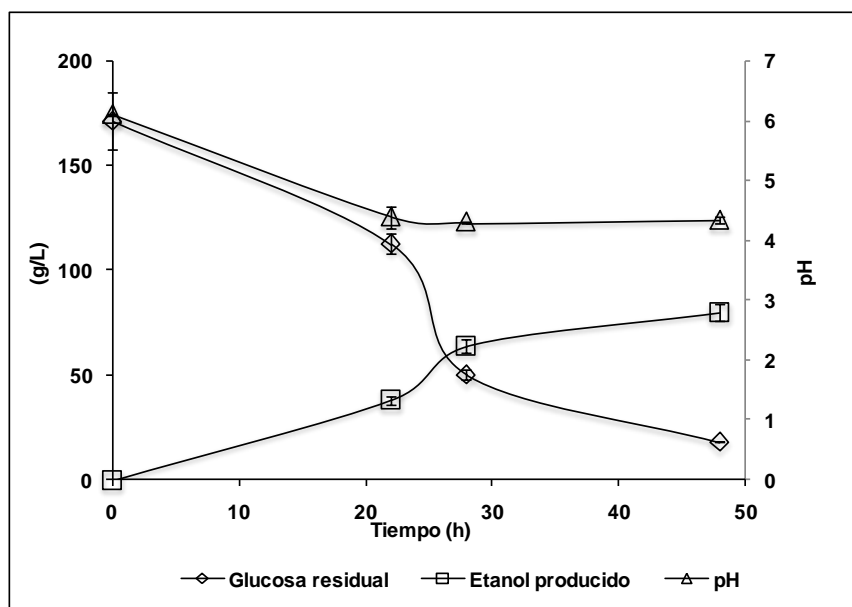


Fig. 9.2.5. Cinética del consumo de 200 g/L de glucosa, de la producción de etanol y el pH inicial y final en FML.

El pH a partir de las 24 h fue de 4.36, lo que favoreció el metabolismo de *Zymomonas mobilis* obteniéndose un alto rendimiento de etanol.

Con la cinética de 200 g/L de glucosa se pudo comprobar que el haber cambiado al medio de cultivo 2 se favoreció el consumo de glucosa por *Zymomonas mobilis* en FML hasta concentraciones de 200 g/L, obteniendo un consumo de glucosa de 90%.

Con base en el mecanismo de reacción de la fermentación de glucosa por *Zymomonas mobilis* (Swings y De Ley, 1977), en el que por cada mol de glucosa se obtienen equimolarmente 2 moles de etanol y 2 moles de bióxido de carbono, además de los resultados obtenidos en las dos anteriores fermentaciones, en los siguientes experimentos sólo se midió la glucosa residual, y la acidez inicial y final del medio de cultivo.

En una primera etapa se llevó a cabo una FMS con una concentración inicial de glucosa de 100 g/L modificando la relación medio de cultivo-agrolita (1.7:1; 2:1; 2.3:1). Para ello se evaluaron los volúmenes de 0.5, 0.6 y 0.9 mL de medio de cultivo inoculado (con 0.3 g de agrolita). Como control se realizó un cultivo en medio líquido. La fermentación tuvo una duración de 24 h. Los resultados se presentan en la figura 9.2.6. En todos los casos se obtuvo una velocidad de consumo de glucosa superior a 4.0 g/Lh. De 4.13, 4.14, y 4.14 g/Lh en los medios en FMS con 0.5, 0.6 y 0.9 mL de medio de cultivo respectivamente y de 4.10 g/Lh para el control en FML.

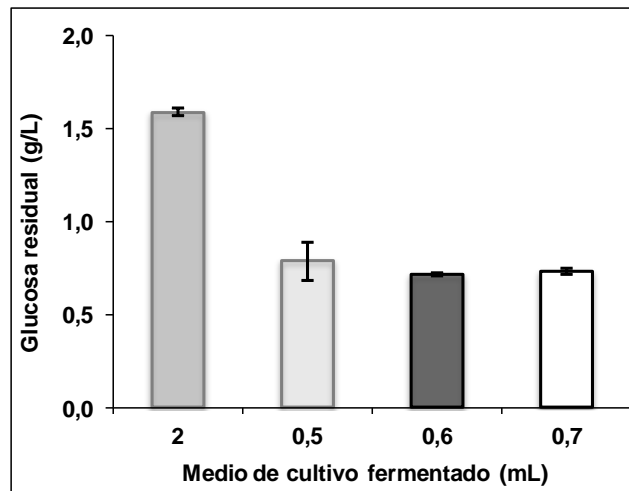


Fig. 9.2.6. Glucosa residual a partir de 100 g/L a las 24 horas de incubación en FMS (variando la relación medio de cultivo-agrolita en: \square 1.7:1, \blacksquare 2:1 y \square 2.3:1 mL de medio inoculado) y un control en FML \blacksquare .

Zymomonas mobilis puede consumir rápidamente 100 g/L de glucosa en 24 horas, en la figura 9.2.7, se puede observar que para 0.5, 0.6, y 0.7 mL de medio de cultivo fermentado, se tuvo un porcentaje de consumo de 98, 99, y 99% respecto a las humedades planteadas, para el control líquido fue de 98%, lo que nos indica que en medio sólido también se puede tener un consumo de glucosa eficiente.

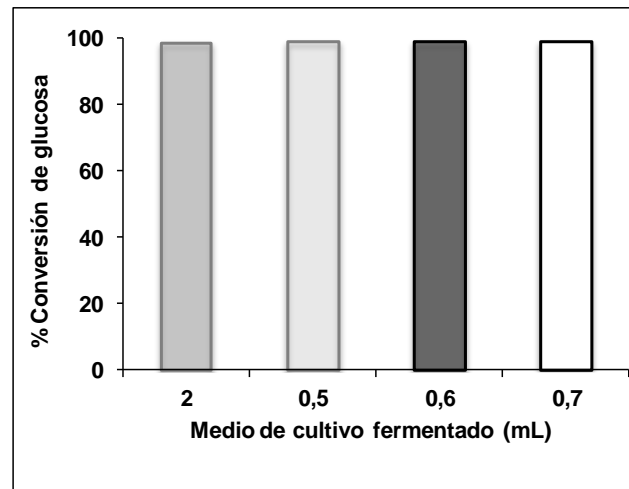


Fig. 9.2.7. Porcentaje del consumo de 100 g/L de glucosa a las 24 horas de incubación en FMS (\square 0.5, \square 0.6 y \blacksquare 0.7 mL de medio de cultivo inoculado) y su control en FML \blacksquare .

La figura 9.2.8 presenta los valores de pH final en medio sólido y en medio líquido. El pH inicial fue de 6.68, mientras que el final fue de 5.11, 5.16, y 4.95 para las relaciones fermentadas de medio de cultivo-agrolita (1:1.7; 1:2; 1:2.3) en FMS, y de 6.17 para el control en FML.

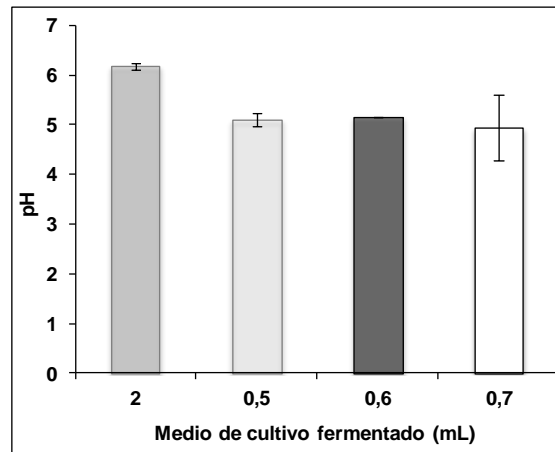


Fig. 9.2.8. Cambio del pH a las 24 horas de fermentación de 100g/L de glucosa en FMS (□ 0.5, ■ 0.6 y □ 0.7 mL de medio de cultivo inoculado) y su control en FML □.

Posteriormente, se evaluó el consumo de glucosa en FMS a 200 g/L a una relación de medio de cultivo-agrolita de 1:1.7; 1: 2.3 y 1:3 (0.3 g de agrolita y 0.5, 0.7 y 0.9 mL de medio de cultivo inoculado). En la figura 9.2.9 se observa que se obtuvo en FMS una glucosa residual de 171, 161 y 6.4 g/L de glucosa por cada proporción de medio de cultivo-agrolita utilizada. En FML fue de 2.5 g/L de glucosa, lo que nos indica que la FMS de 200g/L de glucosa requiere de una proporción de 1:3 de medio de cultivo-agrolita para que pueda llevarse a cabo eficientemente el metabolismo *Zymomonas mobilis*.

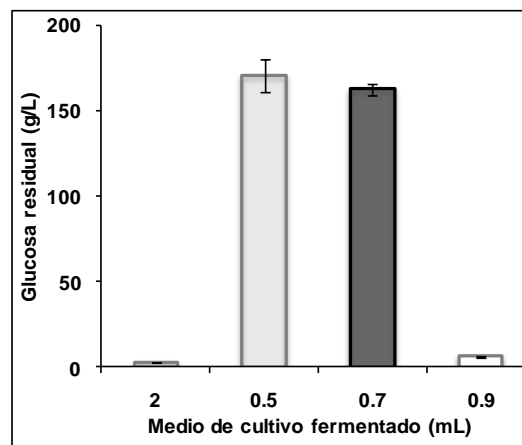


Fig. 9.2.9. Glucosa residual de 200 g/L en FMS a diferentes relaciones medio de cultivo-agrolita (□ 1.7:1, ■ 2.3:1 y □ 3:1) y en FML a las 48 h FML □.

En la figura 9.2.10 se observa que para la fermentación de 200 g/L de glucosa en FMS se obtuvieron 15, 19 y 97% de consumo de glucosa de acuerdo a las proporciones analizadas y en FML se obtuvo un 99%.

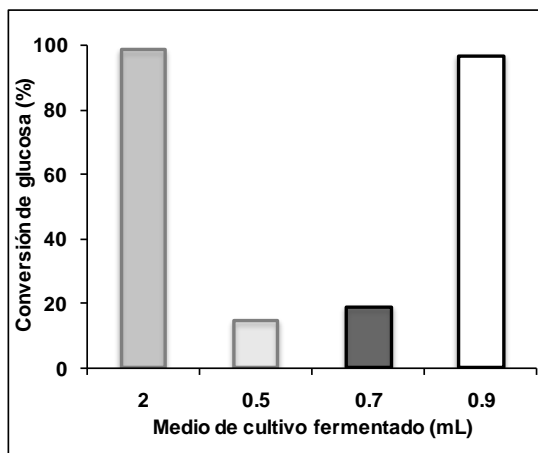


Fig. 9.2.10. Porcentaje del consumo de 200 g/L de glucosa variando la relación medio de cultivo-agrolita (□ 1:1.7, ■ 1: 2.3 y □ 1:3.5) en FMS. Y su control en FML ■ a las 48 horas de incubación.

El pH inicial del medio a 200g/L de glucosa fue de 6.11 ± 0.01 para las relaciones antes mencionadas y de 6.18 para el control líquido. En la figura 9.2.11 se observa que el pH final en FMS fue de 5.72, 5.85 y 4.38 respectivamente y de 4.30 para la FML. Como se puede ver si hubo una reducción del pH al final de la fermentación pero en todos los casos fue superior a 4, lo que favorece el metabolismo de *Zymomonas mobilis*.

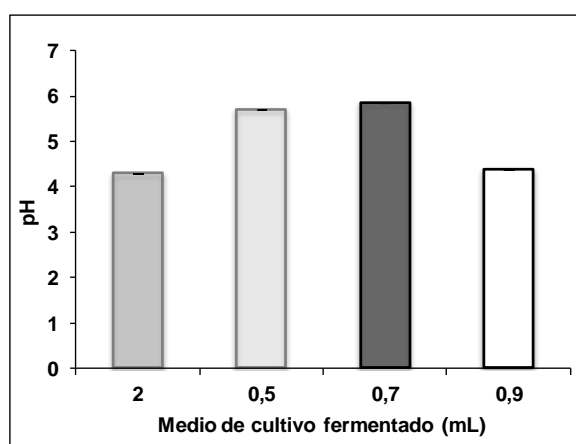


Fig. 9.2.11. pH final de la FMS de 200 g/L de la glucosa inicial variando la proporción medio de cultivo-agrolita (□ 0.5, ■ 0.7 y □ 0.9 mL de medio) y su control en FML ■.

Al comparar la FMS y la FML a 200 g/L de glucosa se obtuvo en FMS un porcentaje de consumo de 97% con una velocidad de consumo de 4.03 g/Lh, y en FML se obtuvo un porcentaje en el consumo de glucosa del 99%, con una velocidad de consumo de 4.12 g/Lh, por lo que podemos ver que ambos procedimientos son igualmente eficientes.

9.3. Consumo de glucosa y producción de etanol con el medio de cultivo 3 utilizando el sistema de recuperación de etanol

En los primeros experimentos con el medio de cultivo 2 se obtuvieron productividades de etanol de 1.47 y 1.74 g/Lh para las concentraciones de 100 y 200 g/L de glucosa en FML, estas parecidas a las reportadas por Sreekumar en 1991 que fueron de 1.98 y 1.63 g/Lh respectivamente. Por lo que se decidió con la finalidad de hacer más eficiente el proceso, y para poder cuantificar todo el etanol producido, diseñar un sistema con el que se pudiera recuperar todo el etanol evitando así las pérdidas que pudieran haber ocurrido al utilizar el procedimiento anterior.

Se llevaron a cabo fermentaciones individuales por triplicado de 50, 100, 150 y 200 g/L de glucosa utilizando el medio de cultivo 3 (ver sección 7.4). En este caso para la FMS los experimentos se llevaron a cabo utilizando 3 g de agrolita y 9 mL de medio para las concentraciones de 50 a 150 g/L y 10.7 mL del medio para 200 g/L de glucosa.

En FML para las concentraciones de 50 y 100 g/L se obtuvo una glucosa residual de 1 y 2 g/L y de 2 y 4 g/L en FMS. Para las concentraciones de 150 y 200 g/L de glucosa se obtuvo una glucosa residual de 3 y 15 g/L en FML y de 6 y 7 g/L en FMS como se aprecia en la figura 9.3.1. Con velocidades de consumo en FML de 2.0, 4.1, 3.1 y 4.0 g/Lh y en FMS de 2.0, 4.0, 3.0 y 4.0 g/Lh respecto a las concentraciones fermentadas.

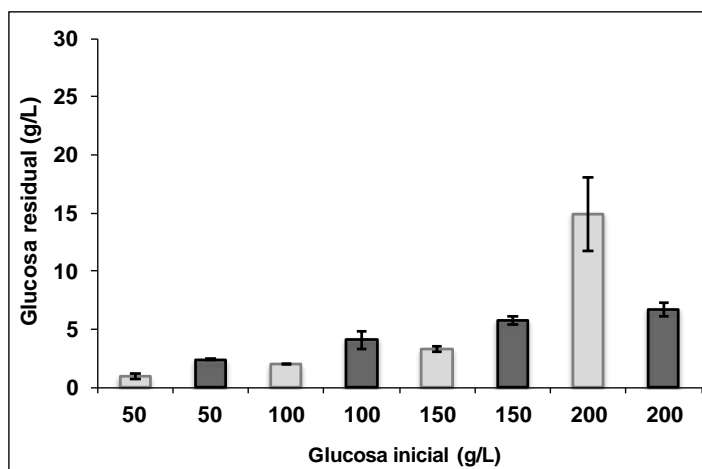


Fig. 9.3.1. Glucosa residual a partir de 50, 100 (24h de incubación), 150 y 200g/L de glucosa inicial a las 48h de incubación en FML y FMS, utilizando el sistema de recuperación de etanol.

En la figura 9.3.2 se puede observar que en FML se tuvo un consumo de glucosa de 98% para las tres primeras concentraciones y del 93% para la última, mientras que en FMS para 50 g/L fue de 95%, para 100 y 150 g/L fue de 96% y del 97% a partir de 200g/L de glucosa inicial.

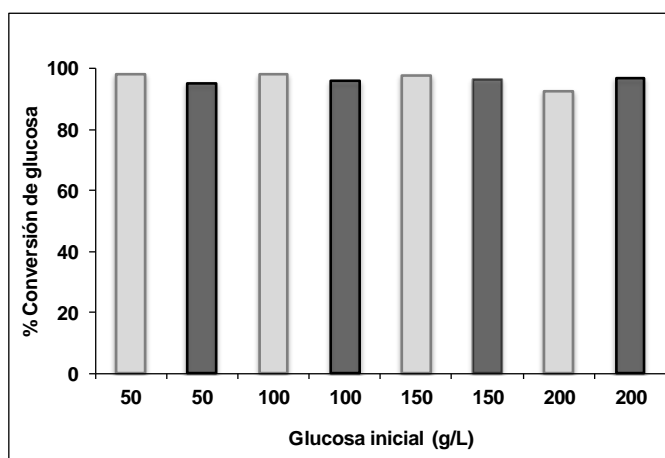


Fig. 9.3.2. Porcentaje de glucosa consumida después de 24h (50 y 100g/L) y 48h (150 y 200g/L) en FML y FMS utilizando el sistema de recuperación de etanol.

Después de cuantificar el etanol producido se obtuvo (figura 9.3.3) en FML 21.19, 44.47, 75.01 y 87.82 g/L de etanol, lo que corresponde a un 85, 89, 100 y 88% respecto al valor teórico para las concentraciones fermentadas. Estos valores son similares a los reportados por Sreekumar en 1991 que fueron de 47.6, 71.5 y 78.0 g/L de etanol para las

concentraciones de 100, 150 y 200 g/L de glucosa, mientras que para la FMS se obtuvo para las mismas concentraciones una producción de etanol de 19.10, 42.66, 66.07 y 104.64g/L lo que corresponde a un 76, 85, 88 y 105% del valor teórico. Haber obtenido una producción de etanol superior al 100% en medio sólido no es de extrañarse porque aunque no hay reportes de producción de etanol en FMS; esto puede deberse al error experimental que se comete al utilizar altas concentraciones de glucosa, además debe considerarse que al adicionar el inóculo al medio de cultivo este contiene etanol. Lee en 1981 reportó una producción de etanol de 105 g/L de etanol en FML, lo que indica que este error puede cometerse.

La productividad de etanol fue de 0.88, 1.85, 1.56 y 1.83 g/Lh en FML y de 0.80, 1.38, 1.38 y 2.18 g/Lh en FMS respecto a las concentraciones fermentadas.

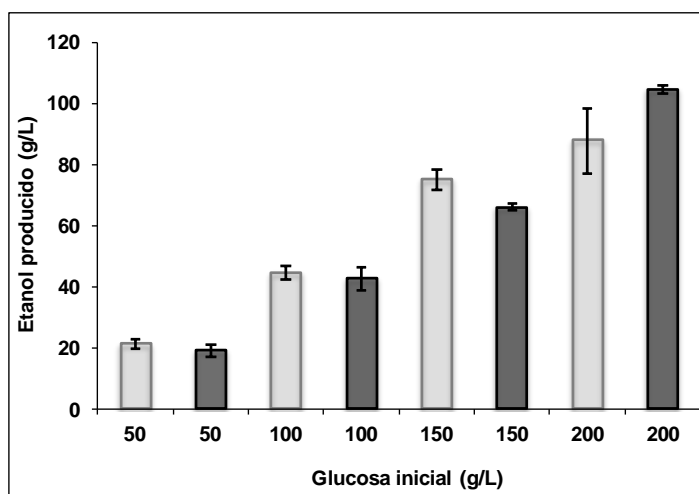


Fig. 9.3.3. Etanol producido a las 24h (50 y 100g/L) y 48h (150 y 200g/L) en FML y FMS utilizando el sistema de recuperación de etanol.

El sistema de recuperación de etanol es un proceso que incrementó la extracción del etanol producido en agua, en comparación con el obtenido al utilizar el medio de cultivo 2 (ver sección 9.2), logrando para 50, 100 y 200 g/L de glucosa inicial en FMS, una recuperación de etanol de 21, 19 y 21% más por concentración en comparación con la FML. En FML se recuperó para las mismas concentraciones un 29, 22 y 6% más que en los primeros experimentos respectivamente, en la tabla 9.3.1 se pueden apreciar mejor estos valores.

El sistema de recuperación de etanol favoreció el incremento en la productividad obtenida al poder cuantificar todo el etanol que se produjo.

En cuanto al pH del medio al inicio de la fermentación (figura 9.3.4) fue de 6.19, 6.21, 6.21 y 6.26 para las concentraciones fermentadas de glucosa, obteniendo al final de la FML un pH

de 5.17, 5.10, 4.80, 4.20 y para la FMS de 5.15, 4.70, 4.60, 4.10 respecto a las concentraciones fermentadas. Teniendo un pH superior a 4 en todos los casos, se favoreció el metabolismo de *Zymomonas mobilis*.

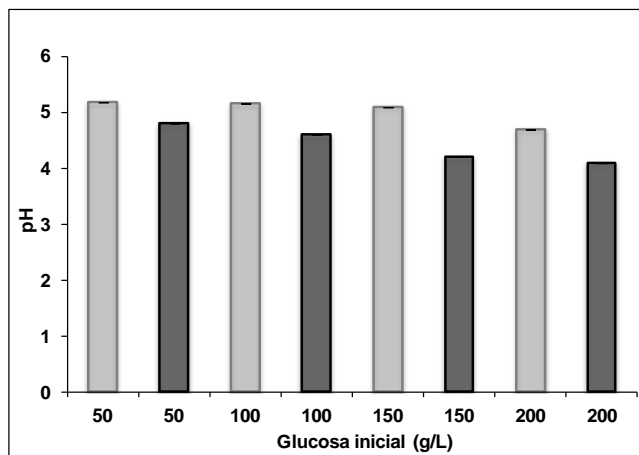


Fig. 9.3.4. pH final del medio de cultivo durante la FML y FMS utilizando el sistema de recuperación de etanol.

En la figura 9.3.5, se observa que en FML se tuvo un (rendimiento) $Y_{\text{ETOH}/\text{Glucosa}} = 0.47$ y en FMS de 0.46 lo que indica que ambos sistemas fueron igualmente eficientes. En la tabla 9.3.1 se muestra un resumen de todos los resultados comparados con la literatura.

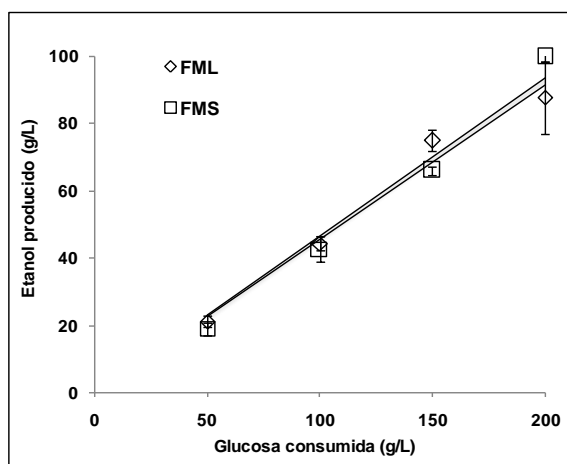


Fig. 9.3.5. El rendimiento de etanol de 50 a 200 g/L de glucosa. En FMS es igual a 0.46 y en FML de 0.47, con el sistema de recuperación de etanol.

Tabla. 9.3.1. Resumen de los resultados obtenidos del consumo de glucosa y la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* ZM4 en FML y en FMS.

TIPO DE FERMENTACIÓN	MEDIO DE CULTIVO FERMENTADO (mL)	GLUCOSA INICIAL (g/L)	% CONSUMO DE GLUCOSA	V _{CONSUMO DE GLUCOSA} (g/L/h)	ETANOL (g/L)	% ETANOL, RESPECTO AL VALOR TEÓRICO	Y _{ETOH/GLUCOSA}	ETANOL (g/Lh)	pH _i - pH _f	AUTOR, AÑO				
FML	2	50	98	2.6	15	60	0.31	0.64	5.50 - 4.22	Experimento 1				
		100	99	4.4	35	70	0.35	1.47	5.92 - 4.44					
		200	88	3.3	83	83	0.42	1.74	6.12 - 4.37					
		200	90	3.2	80	80	0.40	1.68	6.11 - 4.36	Experimento 2				
FML	2	100	98	4.1	No cuantificado				6.68 - 6.17	Experimento 3				
FMS	0.5		99	4.1					6.68 - 5.11					
	0.6		99	4.1					6.68 - 5.16					
	0.7		99	4.1					6.68 - 4.95					
FML	2	200	99	4.1					No cuantificado				6.49 - 4.30	Experimento 4
FMS	0.5		15	0.6									6.49 - 5.72	
	0.7		19	0.8									6.49 - 5.85	
	0.9		97	4.0									6.49 - 4.38	
SISTEMA DE RECUPERCIÓN DE ETANOL														
FML	9	50	98	2.0	21	85	0.42	0.88					6.19 - 5.17	Experimento 5
FMS			95	2.0	19	76	0.38	0.80					6.19-5.15	
FML		100	98	4.1	45	89	0.44	1.85					6.21-5.10	Experimento 6
FMS			96	4.0	42	85	0.43	1.38	6.21-4.70					
FML		150	98	3.1	75	100	0.50	1.56	6.21-4.80	Experimento 7				
FMS			96	3.0	66	88	0.44	1.38	6.21-4.60					
FML		200	93	3.9	88	88	0.44	1.83	6.26-4.20	Experimento 8				
FMS			10.7	97	4.0	105	105	0.52	2.18		6.26-4.10			
DATOS REPORTADOS EN LA LITERATURA														
FML	100	100	No reportado			47	95	0.49	1.98	5-No	Sreekumar, 1991			
		150				71	95	0.47	1.48	5-No				
		200				78	81	0.52	1.62	5-No				
	1000	200				105	105	0.52	2.16	5-No	Lee, 1980			

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

10.1 Conclusión general

La FMS de glucosa por *Zymomonas mobilis* utilizando agrolita como soporte inerte tuvo un rendimiento similar (0.46) al obtenido con FML (0.47). La conversión de glucosa en FMS fue ligeramente mayor (4%) con la mayor concentración de glucosa evaluada (200 g/L).

10.2 Conclusiones particulares

La relación medio de cultivo-agrolita con concentraciones iniciales de glucosa de 50 a 100 g/L es menor (1.67) a la que debe de usarse (3) con concentraciones iniciales de glucosa de 200 g/L para obtener el 100% de conversión de glucosa.

El sistema de recuperación de etanol diseñado en este trabajo permitió recuperar todo el etanol producido; lo que permitió estimar con mayor precisión los rendimientos de producción de etanol.

10.3. Perspectivas

En estudios futuros se recomienda analizar la FMS de 250 y 300 g/L de glucosa utilizando el sistema de recuperación de etanol, así como el cálculo de parámetros como biomasa y CO₂ producido.

LITERATURA CONSULTADA

12. LITERATURA CONSULTADA

- Amin, G. 1992. Conversion of sugar-beet particles to ethanol by the bacterium *Zymomonas mobilis* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 14 (6), 499-504.
- Amin, G; Verachtert, H. 1982. Comparative study of ethanol production by immobilized-cell systems using *Zymomonas mobilis* or *Saccharomyces bayanus*. *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. 14, 59-63.
- Amutha, R; Gunasekaran, P. 2001. Production of ethanol from liquefield cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92 (6), 560-564.
- Balat, M; Balat, H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied energy*. 86, 2273-2282.
- Barrow, K. D; Collins, J. G; Leigh, D. A; Rogers, P. L; Warr, R. G. 1984. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Applied microbiology and Biotechnology*. 20, 225-232.
- Beaven, M. J; Charpentier, C; Rose, A. H. 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acid composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431.
- Behera, S; Mohanty, R. C; Ray, R. C. 2010. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia L*) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. *Applied energy*. 87, 2352-2355.
- Bekers, M; Upite, D; Kaminska, E; Laukevics, J; Grube, M; Vigants, A; Linde, R. 2005. Stability of Levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*. 40, 1535-1539.
- Belaich, J. P; Senez, J. C. 1965. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*. 85 (5), 1195-1200.
- Bhargav S; Panda B. P; Ali M; Javed S. 2008. Solid State Fermentation: An Overview, *Chem Biochem Eng Q*. 22 (1), 49-70.
- Bigelis, R; Haiyin, H; Hui, Y. Y. 2006. Production of fungal. Antibiotics using polymeric solid supports. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33, 815-826.
- Brown, C. M; Johnson, B. Influence of the concentration of glucose and galactose on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. 1970. *Journal of General Microbiology*. 64, 279-287.
- Carey, V. C; Ingram, L. O. 1983. Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of ethanol and Glucose. *Journal of Bacteriology*. 154 (3), 1291-1300.
-

-
- Casey, G. P. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*. 13 (3), 219-280.
- Castillo, V. N. P; Siqueiros, C. T; Rascón C. Q. 2011. Biofuels: clean strategies to fight the energy crisis. *Tecnociencia Chihuahua*. 5 (2), 61-66.
- Cazetta, M. L; Celligoi, M. A. P. C; Buzato, J. B; Scarmino, I. S; da Silva, R. S. F. 2005. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*. 40, Pp. 747-751.
- Chen, H. Z; Xu, J; Li, Z. H. 2007. Temperature cycling to improve the ethanol production with solid state simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43 (1), 57-60.
- Choi, G. W; Kang, H. W; Kim, Y. R; Chung, B. W. 2008. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CHZ2501 from industrial starch feedstocks. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13, 765-771.
- Da Silva, G. P; Araújo, E. F; Silva, D. O; Guimarães, W. V. 2005. Ethanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36, 395-404.
- Davis, L; Rogers, P; Pearce, J; Peiris, P. 2006. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolyzed waste starch stream. *Biomass and Bioenergy*. 30, 809-814.
- De Oliveira, M. R; Santos, F; Da Silva, R. S; Batista, B. J; Pedrine, C. C. M. A. 2007. Study of Levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*. 37, 177-183.
- Díaz, G. G; Soriano, S. J; Augur, C; Viniegra, G. G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26, 271-275.
- Dien, B. S; Cotta, M. A; Jeffries, T. W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current stratus. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, 258-266.
- DiMarco, A. A; Romano, A. H. 1985. D-Glucosa transport system of *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 49 (1), 151-157.
- Dogan, M; Alkan M. 2003. Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite. *Chemosphere*. 50, 517-528.
- Dos Santos, V. L; Guimarães, W. V; De Barros, E. G. 1998. Fermentation of maltose and starch by *Klebsiella oxytoca* P2. *Biotechnology Letters*. 20 (12), 1179-1182.
-

-
- Erzinger, G. S; Da Silveira, M. M; Lopes, Da C. J. P. C; Vitolo, M; Jonas R. 2003. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. Brazilian Journal of Microbiology. 34, 329-333.
- Favela, T. E. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. México. 617-632.
- Frac, M; Jerzierska, T. S; Tys, J. 2010. Microalgae for biofuels production and environmental applications: A review. African Journal of Biotechnology. 9 (54), 9227-9236.
- García, O. A. M; Ponce, R. E. 2003. Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. Biotecnología Aplicada. 20, 85-94.
- Geller, H. S. 1985. Ethanol Fuel from Sugar Cane in Brazil. Ann. Rev. energy. 10, 135-164.
- Gil, G. H; Jones, W. J; Tornabene, T. G. 1991. Continuous ethanol production in a two-stage, immobilized/suspended-cell bioreactor. Enzyme and Microbial Technology. 13, 390-399.
- Gunasekaran, P; Karunakaran, T; Kasthuribai, M. 1986. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strain on different substrates-a comparative study. Journal Bioscience. 10 (2), 181-186.
- Gupta, N; Dubey, A; Tewari, L. 2009. High efficiency alcohol tolerant *Saccharomyces* isolates of *Phoenix dactylifera* for bioconversion of sugarcane juice into bioethanol. Journal of Scientific and Industrial Research. 68, 401-405.
- Hahn, H; Galbe, M; Gorwa, G. M. F; Liden, G; Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends in Biotechnology. 24, 12.
- Hesseltine, C. W. 1987. Solid state fermentation—An overview. International Biodeterioration. 23, 79-89.
- Hölker, U; Höfer, M; Lenz, J. 2004. Biotechnological advances of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 64, 175-186.
- Huges, D.B; Tudroszen, N. J; Moye, C. J. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *kluveromyces marxianus*. Biotechnology Letters. 6 (1), Pp. 1-6.
- Johns, M. R; Greenfield, P. F; Doelle, H. W. 1991. Byproducts from *Zymomonas mobilis*. Advances in Biochemical Engineering. 44, 97-121.
- Jones, C. W; Doelle, H. W. 1991. Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 35, Pp. 4-9.
-

-
- Kalnenieks, U. 2006. Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some unanswered questions. *Advances in Microbial Physiology*. 51, Pp. 53-117.
- Kirk – Othmer. *Encyclopedia of chemical technology*. 1-35.
- Klinke, A. B; Thomsen, B. K; Ahring. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology Biotechnology*. 66, Pp. 10-26.
- Lawford, H; Holloway, P; Ruggiero, A. 1988. Effect of pH on growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*. 10 (11), 809-814.
- Lee, J. H; Williamson, D; Rogers, P. L. 1980. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnology Letters*. 2: 4, Pp. 80-88.
- Lee, K. J; Skotnicki, M. L; Tribe, D. E; Rogers, P. L. 1981. The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose and sucrose media. *Biotechnology Letters*. 3: 5, Pp. 207-212.
- Lee, C. K; Darah, I; Ibrahim, C. O. 2011. Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. *Biotechnology Research International*. 1-6.
- Loos, H; Krämer, R; Sahm, H; Sprenger, G. A. 1994. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *Journal of Bacteriology*. 176: 24, Pp. 7688-7693.
- Miller, G. L; Blum, R; Glennon, W. E; Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*. 2, Pp. 127-132.
- Maiorella, B; Blanch, H. W; Wilke, C. R. 1983. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*. 25, 103-121.
- Ooijkaas, L. P; Weber, F. J; Buitelaar, R. M; Tramper, J; Rinzema, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Review: Trends in Biotechnology*. 18 (8), Pp. 356-360.
- Pandey, A; Soccol, C. R; Mitchell D. 2000. New development in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 35, 1153-1169.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13, 81-84.
- Panesar, P. S; Marwaha, S. S; Kennedy, J. F. 2006. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81, Pp. 623-635.
-

-
- Polatli, M; Erdinc, E; Okyay, E. 2001. Perlite Exposure and 4-Year Change in lung function. Environmental Research Section A86. Pp. 238-243.
- Rhee, S. K. Lee, G. M. Han, Y. T; Mohd, Z. A; Yusof, H. M. H; Lee, K. J. 1984. Etanol production from cassava and sago starch using *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters. 6 (9), 615-620.
- Rodríguez, C. S; Sanromán, M. Á. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. Journal of Food Engineering. 76, 291-302.
- Rogers, P. L; Lee, K. J; Tribe, D. E. 1997. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. Biotechnology Letters. 1 (4), 165-170.
- Rogers, P. L; Lee, K. J; Skotnicki, M. L; Tribe, D. E. 1982. Etanol production by *Zymomonas mobilis*. Microbial Reactions. 37-84.
- Rutz, D; Janssen, R. 2007. Biofuel technology handbook. WIP Renewable Energies. 40-55.
- Sahm, H; Bringer, M. S; Sprenger, G. A. 2006. The genus *Zymomonas*. Prokaryotes. 5, 201-221.
- Schmidt, A; Bringer, M. S; Poralla, K; Sahm, H. 1986. Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 25, 32-36.
- Schoberth, S. M; Chapman, B. E; Kuchel, P. W; Wittig, R. M; Grotendorst, J; Jansen, P; Graaf, A. A: 1996. Ethanol transport in *Zymomonas mobilis* measured by using in vivo nuclear magnetic resonance spin transfer. Journal of Bacteriology. 178: 6, 1756-1761.
- Shigeri, Y; Nishino, T; Yumoto, N; Tokushige, M. 1991. Hopanoid biosynthesis of *Zymomonas mobilis*. Agricultural and Biological Chemistry. 55 (2), 589-591.
- Singh, A; Kumar, K. R; Schügerl, K. 1992. Bioconversion of cellulosic materials to ethanol. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. 45, 29-55.
- Singhania, R. R; Patel, A. K; Socool, C. R; Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 44, 13-18.
- Sreekumar, O; Basappa, S. C. 1991. Characterization of a superior thermotolerant mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 for ethanol production in glucose medium. Biotechnology Letters. 13 (5), 365-370.
- Stanley, D; Bandara, A; Fraser, S; Chambers, P. J; Stanley, G. A. 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology. Review. 109 (1), 13-24.
-

- Sues, A; Millati, R; Edebo, L; Taherzadeh, M. J. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. FEMS yeast research. 5, 669-676.
- Swings, J; De Ley, J. 1977. The Biology of *Zymomonas*. Bacteriological Reviews. 41 (1), 1-46.
- Toca H. J. L; Osma J. F; Rodríguez C. S. 2007. Potential of solid-state fermentation for laccase production. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. 391-400.
- Tolan, J. S. and Finn, R.K. 1987. Fermentation of D-Xilose and L-Arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. Applied and Environmental microbiology. 9, 2033-2038.
- Vázquez, H. J; Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería Investigación y Tecnología VIII. 4, 249-259.
- Vignoli, J. A; Celligoi, M. A. P. C ; Silva, R. S. F. 2006. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrical*. Process Biochemistry. 41, 240-243.
- Yamada, R; Yamakawa, S. I; Tanaka, T; Ogino, C; Fukuda, H; Kondo, A. 2011. Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. Enzyme and Microbial Technology. 48, 393-396.
- Yanase, H; Nozaki, K; Okamoto, K. 2005. Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters. 27, 259-263.
- Yu, J; Zhang, X; Tan, T. 2008. Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. Fuel processing technology. 89, 1056-1059.

ANEXOS

ANEXO A

Saccharomyces cerevisiae

Desde la antigüedad la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el microorganismo utilizado para la fermentación de bebidas alcohólicas y actualmente para la producción de bioetanol.

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo alcohol tolerante (Stanley, 2010). Esta tolerancia depende de la composición de lípidos en su membrana plasmática como fosfolípidos que contienen altas proporciones de residuos insaturados de ácidos grasos, y de ergosterol que es sintetizado en lugar de colesterol (Gupta, 2009). La tolerancia al etanol también depende de la cepa que se esté utilizando así como de varios factores como el nivel de carbohidratos, la nutrición de la biomasa lignocelulocica, la temperatura, presión osmótica/actividad de agua y la concentración del sustrato (Beaven, 1982). Cada levadura reacciona diferente a cada factor, es por esto que presentan diferencias en la tolerancia al etanol (Casey, 1986).

En la literatura hay reportes de puede soportar 3% de etanol (Gupta, 2009) ya que al incrementarla a 12% hay una disminución en su viabilidad. Maiorella en 1983 reportó que el 7% de etanol en el medio de cultivo inhibe directamente la ruta de producción de etanol.

Gil en 1991 escribió que la levadura creciendo en la fermentación de la uva puede soportar hasta 10% de etanol así como concentraciones de 20% de glucosa.

El etanol inhibe el crecimiento celular a relativamente bajas concentraciones. La alta concentración de etanol inhibe el crecimiento celular reduciendo la viabilidad e incrementando la muerte, limitando la productividad el rendimiento, inhibe la división celular y la velocidad específica de crecimiento (Stanley, 2010)

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Brown en 1970 publicó que las enzimas respiratorias se reprimen por la alta velocidad fermentativa lo que se conoce como efecto Crebtree. En el crecimiento anaerobio de *Saccharomyces cerevisiae* a altas concentraciones de glucosa la velocidad de adaptación decrece, mientras que la fermentación se incrementa. A concentraciones de 0.09% de glucosa o 0.9% de galactosa. Maiorella en 1983 reportó que 380 g/L de glucosa causan efectos en la $P_{osmótica}$ inhibiéndose la biomasa hasta en un 80%, y que con 30% de glucosa hay una inhibición menor al 50%.

ANEXO B

Alimentos fermentados en FMS

Queso roquefort

Es un queso verde elaborado con leche entera de oveja, se cuaja, moldea y se madura con *Penicillium*.

Producción de Koji

Es una preparación de enzimas producidas por el hongo *Aspergillus oryzae* sobre arroz cocido al vapor u otros cereales, ésta es utilizada como iniciador en la industria de la salsa de soya, así como en la fermentación de varios alimentos orientales (esta técnica es considerada el prototipo de la fermentación en medio sólido) (Ooijkaas y col., 2000).

Miso

Pasta fermentada elaborada a partir de soya mezclada con cereales que se van añadiendo en un periodo de dos años (cebada, arroz) y sal.

Tempeh

Producto alimenticio procedente de la fermentación con mohos de la soya en forma de pastel. Originario de Indonesia. Alimento sencillo que proporciona proteínas, fibra y vitaminas. Elaborado de granos de soya.

Pozol

Bebida fermentada no alcohólica de maíz. El maíz nixtamalizado se muele y amasa con agua formando bolas y la bebida se prepara suspendiendo la masa en agua. Se fermenta a temperatura ambiente envuelto en hojas de plátano. No se añade un inóculo a la masa pero se introducen grandes cantidades de microorganismos sobre todo durante la molienda, entre los que destacan: bacterias lácticas que acidifican la masa, y los mohos y levaduras que contribuyen a la producción de aromas y sabores.

ANEXO C

Constitución de la materia prima

La materia prima utilizada para producir etanol está constituida principalmente de los siguientes compuestos:

Lignocelulosa, está compuesta por celulosa (las fibras de celulosa comprenden aproximadamente del 40 al 50% del peso seco de la madera), hemicelulosa, lignina, extractivos, cenizas y otros componentes.

Almidón, es una materia prima de alto rendimiento, para usarlo hay que llevar a cabo una hidrólisis ácida, para romper las cadenas y obtener un jarabe de glucosa.

Celulosa, es una molécula lineal de β -D- glucopiranososa en forma de silla y sustituyentes 2,3-OH y CH₂OH orientadas ecuatorialmente. Es un polímero consistente de dos unidades de glucosa anhídrida, llamada allobiosa. Es insoluble en la mayoría de los solventes.

Hemicelulosa, es el segundo componente químico que constituye la madera dura. Es conocida como poliosa. Es una mezcla de monosacáridos de glucosa, manosa, galactosa, xilosa, ácido 4-o-metil arabinosa, galactosa, y residuos de ácido galacturónico. En gran parte son solubles en álcali, por lo que son más fácilmente hidrolizables.

Xilosa, es la una pentosa predominante derivada de la hemicelulosa contenida en la madera dura.

Arabinosa, es derivada de varios residuos agrícolas u otro cultivo herbáceo como el pasto varilla. Se encuentra en una proporción de 2 al 4% en la madera dura, y del 10 al 20% en cultivos herbáceos, y del 30 al 40% en las fibras del maíz un coproducto del proceso del maíz.

Lignina, es un polímero aromático sintetizado de precursores fenilpropanoides. Se encuentra unida covalentemente con Xilano en maderas duras y con galactoglucomannans en maderas blandas. Es insoluble en agua (Balat y Balat, 2009).

Tratamiento al material lignocelulósico (biomasa celulósica)

El material lignocelulósico es pretratado mediante digestión enzimática en presencia de un ácido mineral o un catalizador básico y calentamiento.

Al tratar la biomasa lignocelulósica completa o incompletamente se hidroliza la hemicelulosa, se remueve la lignina y decristaliza la celulosa, de este modo se permite el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa (Dien y col., 2003), obteniéndose así un jarabe de glucosa (Balat y Balat, 2009).

Puede adicionarse celulasa al inóculo en una sacarificación y fermentación simultánea proceso en el que se han obtenido rendimientos mayores de etanol, así como requerimientos menores de enzima. La inhibición del producto final por celobiosa y glucosa formada durante la hidrólisis enzimática es aliviado por la fermentación con *Saccharomyces cereviciae* (Dien y col., 2003).

ANEXO D

Enzimas catabólicas durante la glucólisis

La bacteria *Zymomonas mobilis* produce las enzimas catabólicas de la ruta glucolítica de la siguiente manera: La enzima piruvato cinasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada tiene su máxima producción a las 18 horas de fermentación, mientras que el resto de las enzimas tienen un máximo a las 30 horas, de un medio de cultivo anaerobio que contiene 200 g/L de glucosa (Johns y col., 1991).

Las enzimas que pueden considerarse para su producción son:

- ✓ Fructocinasa.
- ✓ Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- ✓ Piruvato cinasa.
- ✓ Piruvato descarboxilasa.
- ✓ Glucosa fructosa oxidoreductasa.

Otras enzimas que pueden tener una aplicación comercial son:

- ✓ Gluconolactonasa
- ✓ Levansucrasa Hay bajo crecimiento.
- ✓ Fosfatasa alcalina (esta no se ve reprimida por la alta concentración de fosfato, como sucede en *Escherichia coli*) (Johns y col., 1991).

Las bacterias como *Zymomonas mobilis*, convierten piruvato a etanol mediante el uso de la enzima piruvato descarboxilasa, la cual sólo requiere de un NADH por cada molécula de etanol producida (Dien y col., 2003).

Desventaja

Una desventaja de usar a la bacteria *Zymomonas mobilis* como productora de enzimas es la obtención de un bajo rendimiento celular (0.01-0.15 g/g), comparado con el de otros microorganismos aerobios (0.5 g/g) (Johns y col., 1991).

ANEXO E

Historia del uso del etanol como biocombustible

Desde 1925 en Brasil se tiene conocimiento del uso de etanol como aditivo en la gasolina y sustituto de este, en 1931 implementaron una legislación en la que se permitía su uso automotriz en una proporción 60:40 (gasolina: etanol). A pesar de tener conocimiento de esto desde entonces, no se le dio suficiente importancia al contar con la gasolina, pero en 1973 después de que el precio del petróleo se cuadruplicara en el mundo y al ver que a nivel mundial el costo del azúcar era bajo en 1975 deciden iniciar con el programa de producción de etanol a partir de caña de azúcar incrementándose así el uso de etanol como sustituto de la gasolina (Geller, 1985).

En Estados Unidos a partir de 1980, se promueve el uso y la producción de etanol producido a partir de maíz. Se emplea una mezcla de 85:15 (gasolina: etanol), en este país se promueven diversas disposiciones legales, incentivos, reducción de impuestos entre otros a la industria privada para alentar el consumo de etanol en la industria automotriz.

En la actualidad países como Estados Unidos, la Unión Europea y Brasil, promueven programas para el uso de etanol como combustible en América, Asia, Europa y todo el mundo.

Estados Unidos se ha convertido en el mayor productor de etanol para ser utilizado como combustible reportando aproximadamente el 47% de la producción de etanol, mientras que Brasil es el mayor exportador y el segundo productor de etanol del mundo, lleva a cabo su producción a partir de caña de azúcar, el 40% es utilizado en uso doméstico, mientras que el 20% se exporta a Estados Unidos, la Unión Europea y otros mercados.

China es también un país en el que se promueve el uso de etanol llevando a cabo investigación, subsidios, impuestos, precio mínimo, presupuestos, límites y cambios establecidos por la ley (Balat y Balat, 2009).

Desde 1984 el etanol se ha utilizado en la industria de combustión interna en países como Alemania y Francia.

ANEXO F

Reactivación de *Zymomonas mobilis*

En la primera parte de este estudio la bacteria *Zymomonas mobilis* se encontraba en una solución de glicerol al 20%, distribuida en tubos Eppendorff de 1.5mL congelados para su conservación, la reactivación se llevó a cabo con el medio de cultivo 1 (con 50g/L de glucosa) de la siguiente manera:

- ✓ Se prepararon tres tubos de vidrio con rosca de 10mL, conteniendo 9mL del medio de cultivo (Previamente esterilizados).
- ✓ En condiciones de esterilidad, se inoculó cada tubo con 1 mL de la cepa contenida en los tubos Eppendorff.
- ✓ Se colocaron en incubación a 30°C, durante 24 horas.
- ✓ Se refrigeró durante 1 hora y se llevó a cabo una segunda resiembra.

NOTA: Al utilizar la cepa recién activada, se observó un crecimiento lento y bajo consumo de glucosa, aún a concentraciones de 50 y 100 g/L, por lo que se atribuyó el problema al glicerol en que se conservó, por lo que se decidió reactivar una cepa que se encontraba liofilizada.

En la segunda parte de este estudio la cepa liofilizada de *Zymomonas mobilis* se encontraba en una ampolleta de vidrio almacenada en un lugar fresco y seco. Para su reactivación se utilizó el medio de cultivo 2 (con 100g/L de glucosa) llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- ✓ Se prepararon tres tubos de vidrio de 10mL previamente etiquetados, con 9mL de medio de cultivo cada uno.
 - ✓ En condiciones estériles se rompió la ampolleta y se le adicionaron 4mL de medio de cultivo (esterilizado) agitando con precaución (la ampolleta esta abierta).
 - ✓ De ésta suspensión se tomó una alícuota de 1mL que fue adicionada a cada uno de los dos tubos restantes que contenían 9mL de medio, agitando vigorosamente.
 - ✓ Se mantuvieron en incubación a 30°C durante 48 horas.
 - ✓ Pasado este tiempo se mantuvo en refrigeración durante 1 hora, resembrando nuevamente, dejando en incubación durante 24 horas, quedando listo para su conservación semanal o la preparación del inóculo.
-

ANEXO G

Agrolita. Soporte inerte

Es de nuestro interés la agrolita, perlita o piedra de la perla, debido a que es el soporte inerte que se utilizó durante los experimentos, la agrolita es calentada a temperaturas de 800 a 1100°C, expandiéndose hasta 20 veces su volumen. Es un material de baja densidad, gran área superficial, y baja conductividad térmica.

La agrolita es un vidrio volcánico amorfo constituido por aproximadamente 75% de SiO_2 ; 18% de Al_2O_3 ; 4.0 % de Na_2O ; 5.0% de K_2O ; 2.0% de CaO ; 1.5% de FeO_2 ; 0.5 % de MgO ; 0.2% de TiO_2 ; 0.1% de MnO_2 , SO_3 , FeO , Ba , Cr , y 0.5% de PbO . (Dogan, 2003).

Se utiliza principalmente como acondicionador del suelo, facilitando la filtración, como soporte inerte, filtro, y como componente de los materiales de aislamiento térmico (Polatli y col., 2001).