



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL



**Estudio de la coproducción de endopoligalacturonasa y
etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir del jugo de
la caña de azúcar.**

**Tesis presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología
Mención Ambiental**

Autora:

Lic. Odalys Rodríguez Gámez

Tutor:

Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz

2008

“Año 50 de la Revolución”

estriba en los

“El fundamento de la ciencia

*hecho y solamente en los hechos.... La
dedicación a la investigación experimental tiene
como fin acrecentar la suma de hechos conocidos
o descubrir sus relaciones mutuas.”*

Francois Magendie

1805

A mis padres

A mis hijos

A mi esposo

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz, por su confianza y apoyo.

A mis compañeros del CEBI, que me han ayudado de manera que ellos nunca sabrán.

A mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de la realización de esta tesis.

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para la coproducción de etanol y endopoligalacturonasa en jugo de caña por la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. Se utilizó el método Simplex para la optimización de 7 variables: pH, temperatura, concentración de azúcares reductores, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, CaCl_2 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se realizó la clarificación con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ y la caracterización físico-química del jugo de caña. Se investigaron las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato de un proceso batch, bajo condiciones aerobias y microaerófilas respectivamente. El tiempo de fermentación se determinó utilizando el modelo de Monod, que describe el crecimiento microbiano, asumiendo la inhibición por sustrato y por producto. Se calcularon los parámetros cinéticos del crecimiento de esta levadura. Las condiciones óptimas encontradas fueron: pH 4,6, temperatura 31°C, azúcares reductores totales 125 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,48 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2,73 g/L, CaCl_2 0,33 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,54 g/L y un período de incubación de 122 h. Los valores obtenidos de productividad y acumulado de etanol fueron de 0,39 g/Lh y 47,6 g/L, respectivamente, mientras que se logró un acumulado de enzima endoPG de 9,8 U/mL. El efecto del pH fue el de mayor significación en el proceso de coproducción.

ABSTRACT

The present study was undertaken to find optimum fermentation conditions for the ethanol and endopolygalacturonase coproduction from sugarcane juice by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 strain. The Simplex method was utilized for the optimization of 7 variables: pH, temperature, total reducing sugar, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, CaCl_2 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Clarification and physico-chemical characterization of sugarcane juice was made. The growth and substrate utilization kinetics for a batch process under aerobic and anaerobic conditions, respectively, were investigated. Fermentation time was determined using the Monod Model which accounts for microbial growth in any environmental condition, assuming a substrate and product inhibition. The growth kinetic parameters for the yeast were calculated. Estimated optimum conditions were as follow: pH 4.5, temperature 31°C, total reducing sugars 125 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,48 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2, 73 g/L, CaCl_2 0, 33 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,54 g/L and an incubation period of 122 h. Ethanol productivity and accumulation values of 0,39 g/Lh and 47,6 g/L, respectively, were attained, whereas, endoPG accumulation value of 9,8 U/mL was achieved. The effect of pH was the most significant factor in influencing coproduction process.

INDICE

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
I.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Sustancias pécticas. Localización y función biológica.	3
1.1.1. Estructura de la pectina.	3
1.2. Enzimas pécticas.	4
1.2.1. Poligalacturonasas.	4
1.2.1.1. Potencialidades de las poligalacturonasas de levaduras.	5
1.2.1.2. Aplicaciones de las poligalacturonasas.	5
1.3. Fermentación alcohólica.	6
1.3.1. Fisiología microbiana de la fermentación alcohólica.	6
1.3.1.1. Requerimientos nutricionales.	8
1.3.2. Las levaduras en la fermentación alcohólica.	9
1.4. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	10
1.5. Producción de alcohol a partir del jugo de la caña de azúcar.	11
1.5.1. Clarificación del jugo de caña.	11
1.6. Optimización evolutiva.	12
1.6.1. Optimización Simplex.	12
1.6.1.1. Función membership.	13
II.- MATERIALES Y MÉTODOS.	14
2.1. Jugo de caña y otros medios de cultivo.	14
2.1.1. Caracterización del jugo de caña.	14
2.1.1.1. Determinación de pH y acidez total.	14
2.1.1.2. Determinación de sólidos disueltos (°Brix).	15
2.1.1.3. Determinación de Pol.	15
2.1.1.4. Determinación de Sacarosa, Reductores Libres y Totales.	15
2.1.1.5. Determinación de la remoción de turbidez.	15
2.2. Estudios cinéticos de la fermentación del jugo de caña bajo condiciones aerobias y microaerófilas.	15
2.2.1. Microorganismo.	15
2.2.2. Preparación del inóculo.	15
2.2.3. Estudio de la cinética del crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> en jugo de caña bajo condiciones aerobias.	16
2.2.4. Estudio de la cinética de consumo de sustrato para <i>Kluyveromyces marxianus</i> crecida en jugo de caña bajo condiciones de microaerofilia	16
2.2.4.1. Diseño experimental.	16
2.2.4.2. Medio de cultivo.	17
2.2.4.3. Fermentación batch.	17
2.2.4.4. Definición del modelo cinético, determinación del tiempo de fermentación y de los parámetros cinéticos de la fermentación alcohólica.	17

2.3.	Optimización de la coproducción de endopoligalacturonasa y etanol. .	19
2.3.1.	Definición del proyecto de optimización.	19
2.3.2.	Fermentación.	19
2.3.3.	Tratamiento de las muestras.	20
2.4.	Determinaciones analíticas.	20
2.4.1.	Determinaciones espectrofotométricas.	20
2.4.2.	Determinación de biomasa.	21
2.4.3.	Determinación de la actividad endopoligalacturonasa.	21
2.5.	Fórmulas y procedimientos de cálculos empleados.	21
2.6.	Análisis estadístico de los resultados.	22
III.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1.	Jugo de caña.	24
3.1.1.	Clarificación.	24
3.1.2.	Caracterización físico-química.	25
3.2.	Estudios cinéticos de la fermentación del jugo de caña por <i>Kluyveromyces marxianus</i> en condiciones aerobias y microaerófilas.	26
3.2.1.	Estudio de la cinética de crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> en jugo de caña en cultivo aerobio.	26
3.2.2.	Estudio de la cinética de consumo de sustrato para la levadura <i>K. marxianus</i> cultivada en jugo de caña bajo condiciones de microaerofilia.	29
3.2.2.1.	Determinación del tiempo de fermentación a partir del modelo cinético propuesto.	30
3.2.2.2.	Determinación de los parámetros cinéticos.	31
3.3.	Co-producción de etanol y endopoligalacturonasa por <i>K. marxianus</i> en jugo de caña.	32
3.3.1.	Producción de etanol.	32
3.3.2.	Producción de enzima.	32
3.3.3.	Condiciones óptimas para la co-producción de etanol y endopoligalacturonasa por <i>K. marxianus</i> en jugo de caña.	33
	CONCLUSIONES	37
	RECOMENDACIONES	38
	BIBLIOGRAFÍA	39
	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

Muchos productos que utilizamos en la vida diaria tienen su origen en procesos fermentativos, los cuales se definen, de forma general, como los cambios químicos que ocurren en las sustancias orgánicas, producidos por la acción de microorganismos y catalizados por las enzimas.

Son numerosos los productos obtenidos por esta vía, y las enzimas son unos de los que mayor valor industrial tienen, ya que son especialmente útiles debido a su especificidad y eficiencia cuando catalizan reacciones de interés a pH y temperatura moderados; que de otro modo, similares reacciones logradas por métodos químicos, pudieran requerir condiciones extremas de pH y temperatura y serían menos eficientes y menos específicas.

Dentro de las enzimas más utilizadas en la industria se encuentran las pectinasas, enzimas responsables de promover la degradación natural de las sustancias pécticas.

Las sustancias pécticas constituyen un componente principal de las paredes celulares vegetales y desempeñan, junto a la lignina, la función de garantizar la coherencia e integridad de los tejidos, embebiendo en su estructura las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Estas sustancias causan serios problemas en la elaboración de diferentes bebidas de frutas, especialmente durante la clarificación y filtración de los zumos, debido a que saturan y colmatan los filtros que se utilizan para llevar a cabo estos procesos.

Las pectinasas se clasifican, de acuerdo a su modo de actuar, en esterasas, encargadas de desesterificar la molécula de pectina, y en depolimerasas, las cuales atacan la cadena principal. (De Vries y Visser, 2001). Dentro de estas últimas se encuentran las poligalacturonasas, siendo las más importantes las endopoligalacturonasas, ya que promueven una rápida disminución del peso molecular de la molécula de pectina al fragmentar, mediante un ataque al azar, a la cadena principal de poligalacturonano, con mínima liberación de azúcares reductores (Armand *et al.*, 2000; Singh y Rao, 2002).

Las pectinasas tienen un amplio campo de aplicaciones en la extracción y clarificación de zumos de frutas y mostos de uvas, incrementando los rendimientos, facilitando las operaciones de prensado, filtración y concentración y contribuyendo a alargar la vida útil de los filtros. Otros usos de estas enzimas incluyen la producción de azúcares fermentables de la biomasa vegetal (Beldman *et al.*, 1984), extracción de aceites y pigmentos, tratamiento de fibras textiles (Cavaco-Paulo, 1998) y formulación de piensos (Blanco *et al.*, 1999), contribuyendo en estos últimos a una mejor asimilación de nutrientes por el animal.

En la actualidad, la principal fuente de enzimas pécticas para la industria es el hongo *Aspergillus niger*. Los preparados comerciales obtenidos a partir de este hongo son una mezcla de las distintas enzimas pécticas (endo- y exo- poligalacturonasas, pectina liasas y pectina esterasas), así como de otras enzimas producidas por el microorganismo, que pueden tener efectos indeseables sobre los productos tratados (Blanco *et al.*, 1999). Entre los efectos no deseables es importante destacar los que se derivan de la acción de las

amilasas, las arabinofuranosidasas y sobre todo de las pectina esterasas que liberan metanol al producto, compuesto altamente tóxico. (Almeida *et al.*, 2005)

Por otra parte, se conoce que durante la fermentación alcohólica, es posible producir de forma simultánea otros productos que contribuyen a valorizar y diversificar este proceso tales como biomasa, enzimas, etc., que pueden ser utilizados fundamentalmente en la industria alimentaria para el consumo humano y animal. (Serrat, 2003) (García-Garibay, 1987). Las **enzimas endopoligalacturonasas** constituyen un ejemplo de lo anteriormente dicho, las cuales se obtienen conjuntamente con el etanol cuando se emplea la levadura *Kluyveromyces marxianus* en el proceso de fermentación de azúcares (Serrat *et al.*, 2004). Estas investigaciones han demostrado la factibilidad técnica de coproducir etanol y enzima a escala industrial, lo cual podría ser valorado como una alternativa para la diversificación de la industria alcohólica en nuestro país.

Por último, el éxito en la obtención de los productos deseados en un proceso fermentativo depende de la capacidad de mantener una serie de parámetros en condiciones óptimas, donde el microorganismo puede desarrollar favorablemente sus funciones.

Teniendo en cuenta la importancia que reviste para la industria disponer de un proceso optimizado para la obtención de enzima y alcohol a partir de un sustrato barato y de fácil adquisición, nos trazamos la siguiente hipótesis:

Si se logran definir las condiciones óptimas del proceso de obtención simultánea de endopoligalacturonasa y alcohol por una levadura a partir del jugo de la caña de azúcar, entonces se podrán obtener valores de producción significativos de ambos productos, constituyendo así una alternativa viable a aplicar para la diversificación de la industria alcohólica.

Partiendo de esta perspectiva, con este trabajo nos proponemos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Establecer las condiciones óptimas para la producción concomitante de endopoligalacturonasa y alcohol por *Kluyveromyces marxianus* a partir del jugo de la caña de azúcar.

Objetivos Específicos:

- Realizar la clarificación y caracterización físico-química del jugo de caña que se utilizará como sustrato para la fermentación.
- Estudiar la cinética de crecimiento, bajo condiciones aerobias y de fermentación alcohólica, de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en el jugo de caña.
- Encontrar las condiciones óptimas de cultivo para la producción simultánea de endopoligalacturonasa y alcohol a partir del jugo de la caña de azúcar, mediante el empleo del método de optimización secuencial Simplex.

Revisión Bibliográfica

I.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.- Sustancias pécticas. Localización y función biológica.

Las sustancias pécticas constituyen un grupo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico y, en menor medida, ramnosa, arabinosa y galactosa. Forman parte de los polisacáridos estructurales de los tejidos vegetales, los cuales constituyen hasta el 90% de la pared celular de las plantas y se pueden dividir en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. (De Vries y Visser, 2001). La pectina se encuentra en todos los vegetales superiores en cantidades variables y se localizan en la lámina media, la capa intercelular aglutinante y en la pared primaria celular de las plantas. La principal función biológica de estas sustancias es de carácter estructural. La síntesis de las sustancias pécticas ocurre durante los estadios iniciales de desarrollo de la fruta y su concentración varía de acuerdo con el tipo y la variedad de ésta.

1.1.1.- Estructura de la pectina

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos los cuales presentan dos regiones diferentes bien definidas. Las regiones “lisas” consisten en un esqueleto formado por residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4 glicosídicos, que forman cadenas de homogalacturonano, los cuales pueden estar acetilados en el O-2 o en el O-3 o metilados en el O-6. Constituyen la fracción principal de la molécula de pectina. (**Figura 1a**)

Esta estructura alterna con regiones ramificadas “peludas”, en las cuales se identifican dos estructuras diferentes, un xylogalacturonano que consiste en un esqueleto de galacturonano sustituido con D-xilosa y el ramnogalacturonano I. En el ramnogalacturonano I los residuos de ácido D-galacturónico en el esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces α -1,2 glicosídicos, a los cuales pueden estar atados largas cadenas de arabinano y galactano por el O-4. También contiene grupos acetilo esterificando los O-2 y O-3 de los residuos de ácido galacturónico del esqueleto (De Vries y Visser, 2001) (**Figura 1b**)

Por su grado de polimerización y esterificación las sustancias pécticas se clasifican en protopectinas, un precursor de las sustancias pécticas insoluble en agua y altamente esterificado y polimerizado; los ácidos pectínicos (pectinatos), se les llama así a los ácidos poligalacturónicos que tienen una pequeña porción de grupos metilo; y los ácidos pécticos (pectatos) que son ácidos poligalacturónicos libres de grupos metilo. Atendiendo únicamente al contenido en metoxilo, se les considera pectina de alto metoxilo (HM) si el grado de esterificación es superior al 50%, por el contrario, las pectinas de bajo metoxilo (LM), tienen un grado de esterificación igual o menor al 50 % (Ross *et al.*, 1992). Su grado de esterificación varía en función del vegetal del cual la sustancia péctica es extraída: la pectina de manzana presenta un grado de esterificación de un 80 – 90 % y la pectina cítrica se sitúa entre el 45 – 60 %.

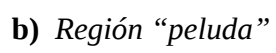


Figura 1.- Estructura de la pectina

1.2.- Enzimas pécticas.

Bajo esta denominación se agrupan aquellas enzimas que tienen a las sustancias pécticas como sustratos naturales.

Las diferencias estructurales entre la cadena principal de las regiones “lisas” y “peludas” de la pectina tiene implicaciones para las enzimas involucradas en la degradación de estas regiones. (De Vries y Visser, 2001)

De acuerdo a su mecanismo de acción, pueden ser clasificadas en esterasas, depolimerasas eliminativas (liasas) y las depolimerasas hidrolíticas (poligalacturonasas). La pectina esterasa (E.C. 3.1.1.11) cataliza la hidrólisis de los grupos ester carboxílicos metilados de la pectina en ácido péctico y metanol. La pectina liasa (E.C. 4.2.2.10) corta los enlaces α -1,4 glicosídicos por un mecanismo de β -eliminación (transeliminación) formando en el galacturónido un doble enlace entre los carbono 4 y 5 en el extremo no reductor. Las endopoligalacturonasas (E.C. 3.2.1.15) realizan una hidrólisis al azar del polímetro, mientras que las exopoligalacturonasas (E.C.3.2.1.67) actúan secuencialmente por el extremo no reductor. (De Vries y Visser, 2001; Jacob y Prema, 2006) **(Figura 2)**

1.2.1.- Poligalacturonasas.

Las enzimas poligalacturonasas [poli(1,4- α -D-galacturonido)] glicanohidrolasa, (EC.: 3.2.1.15) (PG) hidrolizan los enlaces α -1,4 glicosídicos entre residuos de ácido D-galacturónico adyacentes y actúan específicamente en el homogalacturonano o en las “partes lisas” de la molécula de pectina. (Benen *et al.*, 1999).

Son la clase más abundante y estudiada de enzimas pécticas, encontrándose ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos, donde desempeñan las más diversas funciones biológicas relacionadas con el crecimiento, desarrollo, nutrición, reproducción y fitopatogenicidad, entre otras. (Chatterjee *et al.*, 1995; Shevshik *et al.*, 1996; Bergey *et al.*, 1999; Alebeek *et al.*, 2003)

Las enzimas poligalacturonasas son producidas por una amplia variedad de organismos como hongos, bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos nemátodos parásitos de plantas; tal es el caso de las endopoligalacturonasas. Las exopoligalacturonasas, por su parte, aparecen en diferentes frutas y vegetales, y pueden ser producidas por hongos y algunas bacterias. (Alkorta *et al.*, 1998) Generalmente se encuentran presentes en consorcio con otras pectinasas y proveen la maquinaria enzimática necesaria para degradar la compleja estructura de la pectina a carbohidratos fácilmente asimilables.

Entre las levaduras la actividad pectinolítica es una cualidad relativamente rara y está restringida a unas pocas especies de los géneros *Kluyveromyces* (Pereira *et al.*, 1999), *Cándida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, entre otras. (Strauss *et al.* 2001; Serrat, 2003). La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao y del café, de uvas, higos y asociadas al deterioro de algunos alimentos y frutas en conserva

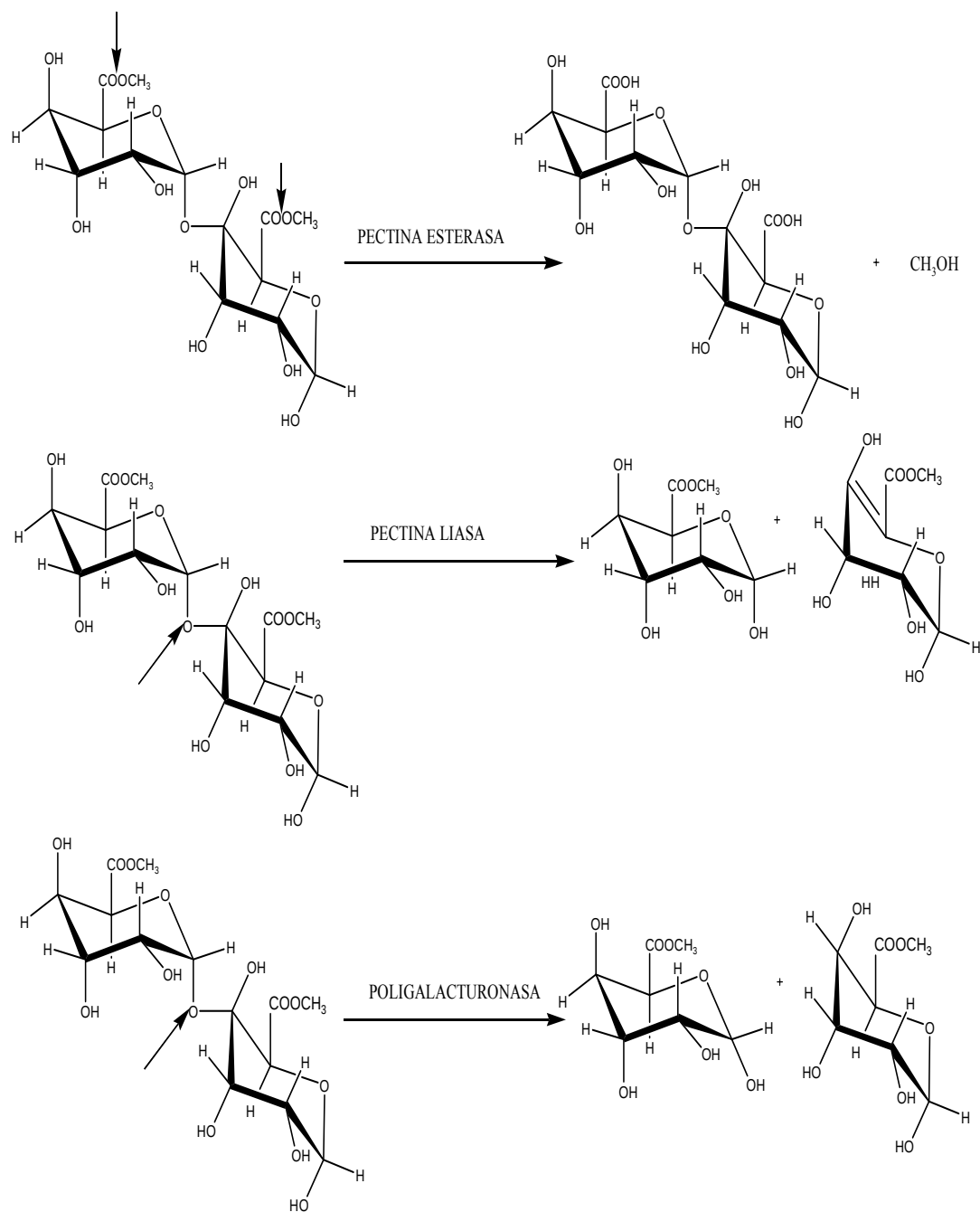


Figura 2.- Mecanismo de acción de las distintas pectinasas

(Blanco *et al.*, 1999) y se caracterizan por producir exclusivamente endopoligalacturonasa extracelular. (Serrat, 2004). Aunque muy pocos, existen reportes sobre la producción de enzimas pectinesterasas en especies del género *Saccharomyces*. (Jayani, 2005)

1.2.1.1.- Potencialidades de las poligalacturonasas de levaduras

Los preparados pectinolíticos comerciales que existen en la actualidad son de origen fúngico y están constituidos por mezclas complejas de varias enzimas pécticas y no pécticas. La presencia en ellos de actividades indeseables se ha convertido en una limitante para muchas de sus aplicaciones. Numerosas levaduras que solo producen poligalacturonasa como única enzima péctica, podrían erigirse en una interesante alternativa a las pectinasas de hongos. (Serrat, 2003) En la elaboración de preparados de pectina, que solo requieren del concurso de actividad endopoligalacturonasa y donde la presencia de otras actividades repercute negativamente sobre el rendimiento y la pureza, es indiscutible la superioridad de preparados puros como los sintetizados por levaduras.

Por otro lado el hecho de que algunas levaduras sean capaces de sintetizar constitutivamente enzimas poligalacturonasas, constituye una ventaja desde el punto de vista productivo ya que pueden ser obtenidas como un producto colateral de otra producción (p.e. biomasa, vino cerveza, etc.) contribuyendo a aminorar los costes.

Otra excelencia de las levaduras es que, a pesar de que su productividad se considera baja (Blanco *et al.*, 1999), presentan mayor velocidad de crecimiento y estructura unicelular, cualidades que le confieren importantes ventajas respecto a los hongos para el cultivo sumergido a gran escala. (Serrat, 2003)

1.2.1.2.- Aplicaciones de las poligalacturonasas

Muchas de las aplicaciones industriales de las pectinasas están basadas en la actividad hidrolítica que ejercen sobre la pectina.

En el tratamiento de zumos de frutas, como la preparación de jugos de cítricos y naranjas, son preferidos los preparados puros de endopoligalacturonasas para mantener su turbidez y el aspecto opaco. (Almeida *et al.*, 2003)

Se ha demostrado que en las fermentaciones de vinos realizadas con poligalacturonasas de *S. cerevisiae*, los procesos de clarificación se facilitan y el tiempo de filtración se reduce hasta un 50% en algunos casos. (Vilanova *et al.*, 2000)

Las pectinasas son de gran utilidad para aumentar la productividad y la eficiencia en las fermentaciones naturales. Así por ejemplo, en la fermentación húmeda de las semillas de café la adición ex profeso de preparados de pectinasa proveniente de levadura, permite reducir a aproximadamente la décima parte el tiempo de fermentación previa del café para lograr la separación final de las partículas de pericarpio aún adheridas a las semillas (Jayani *et al.*, 2005). Pueden ser usadas conjuntamente con otras celulasas y carbohidrasas en la formulación de alimento animal para facilitar la asimilación de los nutrientes por los animales. (Blanco *et al.*, 1999).

Nuevas y prometedoras aplicaciones de esta enzima están relacionadas con la obtención de hidrolizados y fragmentos de pectina con actividad biológica (reguladora), siendo de gran utilidad en la agricultura. Los oligogalacturonidos con grado de polimerización entre 7 y 16 inducen la respuesta defensiva en plantas frente a patógenos, estimulan el crecimiento celular y la maduración de frutos (caña de azúcar, café, cítricos, papa, tomate, ajo, tabaco, plátano, etc.) (Cabrera, 1999). Además pueden sustituir parcial o totalmente las hormonas tradicionales de los esquemas de micropropagación de diferentes cultivos (Serrat, 2003). También se les atribuye actividad benéfica sobre las bifidobacterias (valor prebiótico) y constituyen una importante fuente de fibra dietética. (Lang y Dörnenburg, 2000)

1.3.- Fermentación alcohólica

El alcohol etílico se puede considerar uno de los más antiguos productos orgánicos conocidos. Con fórmula molecular C_2H_5OH es conocido también como etanol, metil carbinol o alcohol de caña o de granos (ICIDCA. 2000)

Su producción por fermentación data del milenio V a.n.e., en la antigua Mesopotamia, en la fabricación de vinos. Este proceso ha sido, a lo largo de la historia, uno de los mas estudiados, dando origen al descubrimiento de la participación de los microorganismos en la producción de diferentes compuestos de difícil acceso por la síntesis orgánica. (ICIDCA. 1986)

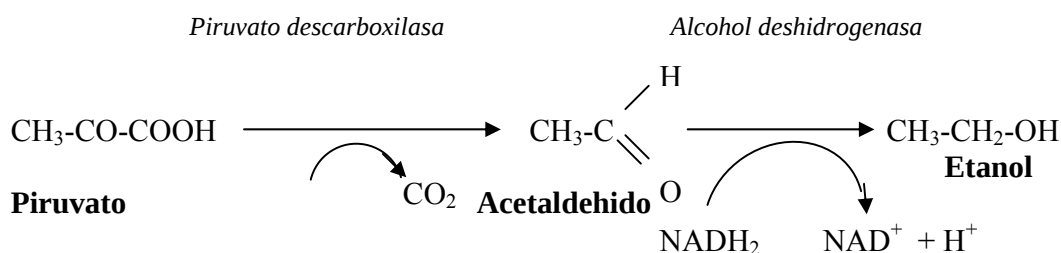
El etanol puede ser producido a partir de tres tipos principales de materiales biológicos:

- Materias azucaradas: contienen carbohidratos simples como fuente de azúcares (caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc)
- Materias amiláceas: contienen los carbohidratos en forma de almidones como fuente de azúcares (yuca, maíz, papa, etc)
- Materias celulósicas: los carbohidratos se encuentran en formas más complejas como celulosas y hemicelulosas (madera, residuos agrícolas, etc.)

El proceso de producción a partir de estos materiales consta de tres etapas fundamentales: preparación de la materia prima para su fermentación (conversión de carbohidratos en azúcares simples o asimilables por los microorganismos productores de alcohol), fermentación y separación del alcohol, concentración y purificación. (ICIDCA. 2000)

1.3.1.- Fisiología microbiana de la fermentación alcohólica

Las levaduras y otros microorganismos, en condiciones anaerobias, son capaces de convertir las hexosas, vía glucólisis, en piruvato y posteriormente descarboxilar el piruvato para obtener acetaldehído. Para mantener el balance redox, el acetaldehído es finalmente reducido a etanol. De este modo son generados 2 mol de ATP por molécula de hexosa (Claassen *et al*, 1999)



La fermentación alcohólica es un proceso caracterizado principalmente por varios factores que inducen respuestas de estrés en las levaduras (bajo pH, presión osmótica, bajo contenido de nitrógeno, etc). Por ello la respuesta al estrés en las levaduras es esencial para asegurar su supervivencia, adaptación y crecimiento tanto en hábitats naturales como en condiciones industriales.

La fermentación etanólica en las levaduras puede estar alterada como resultado de cambios que se produzcan en el medio de cultivo. (Moat *et al.* 2002)

En presencia de concentraciones de azúcares por encima del 14 % w/v, ocurre el proceso denominado plasmólisis celular, debido a los efectos osmóticos provocados por el exceso de solutos en el medio de crecimiento; disminuyendo así la velocidad de la fermentación (Vogel y Todar, 1997).

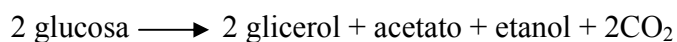
Cuando el medio de cultivo contiene sulfito de sodio, el acetaldehído es atrapado formando un complejo de adición con el bisulfito, formándose el glicerol como producto principal:



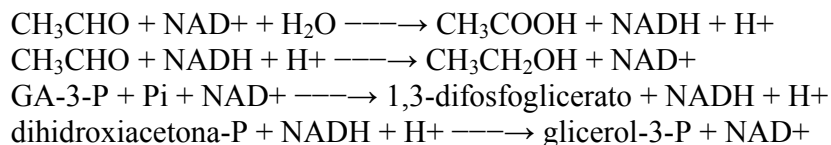
En estas condiciones, el acetaldehído se inhabilita y no puede fungir como aceptor de iones hidrógeno. En este caso, el fosfato de dihidroxiacetona se convierte en el principal aceptor de iones hidrógeno formando glicerol-3-fosfato, el cual es posteriormente hidrolizado en glicerol y grupos fosfato. La fermentación no se cambia completamente en la dirección de formación del glicerol de manera que no es posible agregar suficiente bisulfito para ligar todo el etanol sin incurrir en un efecto tóxico adicional. Es por ello que siempre se encontrará entre los productos finales bajas concentraciones de etanol. (Moat *et al.* 2002)

El pH del medio también juega un rol importante ya que una variación de éste, afecta los estados iónicos de los componentes del medio y de la superficie celular exterior. Se afecta el crecimiento por la influencia que ejerce en la actividad de las enzimas permeasas en la membrana citoplasmática o enzimas asociadas a la pared celular. (Vogel y Todar, 1997)

Generalmente las levaduras crecen activamente en medios con valores bajos de pH. En condiciones de alcalinidad se observa otro modelo de fermentación



Bajo estas condiciones ocurre una reacción de dismutación hidrolítica, en la cual 1 mol de acetaldehído es oxidado a acetato y el otro es reducido a etanol. Esta secuencia está catalizada por dos deshidrogenadas NAD-dependientes:



La oxidación del acetaldehído a acetato no produce ATP debido a que la reacción ocurre directamente sin la formación del intermediario acetyl-CoA. (Moat *et al.* 2002)

Aunque la fermentación etanólica es un proceso anaerobio, se requieren niveles de O₂ muy bajos para la síntesis del ergosterol, el cual es un componente esencial de la membrana celular de la levadura, y es necesario además para la síntesis de ácidos grasos insaturados. (Vogel y Todar, 1997). Por otra parte la introducción de oxígeno en una suspensión de levaduras en reposo que está fermentando glucosa, detiene la producción de etanol. Este fenómeno, denominado **efecto Pasteur**, se ha estudiado profundamente con el objetivo de dilucidar el mecanismo involucrado. Las células de levaduras que están en crecimiento no muestran un notable efecto Pasteur, estas células sólo respiran del 3 al 20% del azúcar catabolizable y el resto se fermenta. El mecanismo involucrado en el cese de la fermentación de las células en reposo (ej: en condiciones de ausencia de nitrógeno) es una inactivación progresiva del sistema de transporte de azúcares. Como consecuencia, la contribución de la respiración al catabolismo de la glucosa, el cual es pequeño en las células en crecimiento, se vuelve significativo bajo las condiciones de ausencia de nitrógeno. (Moat *et al.* 2002)

La concentración de etanol en el medio de cultivo influye negativamente en el crecimiento de la levadura, ya que provoca daños a la membrana citoplasmática y a la membrana de varios orgánulos: desnaturalización de las proteínas celulares, inhibición de los sistemas de transporte, cambios en el perfil temperatura-crecimiento, etc. Esto puede resultar en una pérdida de la viabilidad celular, reducción de la velocidad específica de crecimiento y reducción en la velocidad específica de fermentación (Hack y Marchant, 1998). Otros autores plantean que el efecto inhibitorio es debido a un efecto de deshidratación general y a la inhibición específica de algunas enzimas como la alcohol deshidrogenasa y la hexoquinasa (Bajpai y Margaritis, 1982)

1.3.1.1.- Requerimientos nutricionales.

Para su crecimiento y metabolismo, la levadura necesita de determinados nutrientes esenciales. Un requerimiento nutricional lo constituyen las fuentes de nitrógeno, que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno (N) es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspartico para su incorporación a la pared de las células.

El fósforo (P) y el azufre (S) son indispensables en el proceso de asimilación, y juegan un importante papel en la fermentación. El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes.

Los iones K^+ y Mg^{2+} son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K^+ aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K^+ actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg^{2+} es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K^+ como el Mg^{2+} se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato. (Ertola, 1997)

El ión Ca^{2+} parece ejercer una acción favorable sobre la levadura y la fermentación. Es activamente tomado por las células durante el crecimiento e incorporado a las proteínas de la pared celular. Además mantiene el pH intracelular estable en presencia de condiciones ambientales adversas. (Atkinson y Mavituna, 1983)

Los aminoácidos y vitaminas del grupo B, como tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, niacina, etc., representan para las levaduras factores esenciales, sin los cuales no se produce crecimiento celular. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de co-enzimas. (Ertola, 1997)

1.3.2.- Las levaduras en la fermentación alcohólica.

Los microorganismos mejor conocidos para la producción de etanol son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más comúnmente utilizada, pero también ha sido empleada *Kluyveromyces fragilis*. En condiciones aerobias y en presencia de altas concentraciones de glucosa, *Saccharomyces cerevisiae* crece bien, pero produce poco alcohol. En condiciones anaerobias, sin embargo el crecimiento es lento y el piruvato producido durante el catabolismo es procesado por la piruvato descarboxilasa a acetaldehído y CO_2 . Se produce entonces etanol a partir de acetaldehído mediante la reducción por la alcohol deshidrogenasa. (Crueger y Crueger, 1993)

De forma general, las levaduras presentan características que las hacen microorganismos de elección con respecto a bacterias y hongos, para su utilización industrial, entre las que se encuentran:

- Crecen rápidamente y producen el producto deseado en corto tiempo, lo cual abarata la producción y disminuye el riesgo de contaminación en el fermentador.
- Debido a su rápido crecimiento es mucho más fácil el control de las condiciones fermentativas.
- No son dañinas a humanos, plantas o animales. (Brock y Madigan, 1991)

Investigaciones realizadas recientemente (Serrat, 2004) han demostrado las potencialidades de la levadura *Kluyveromyces marxianus* para ser utilizadas en los procesos de fermentación etanólica.

1.4.- *Kluyveromyces marxianus*

La levadura *Kluyveromyces marxianus*, también llamada *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces cicerisporus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Candida kefir*, (Jay, 1994) ha sido definida por algunos autores como una levadura respiratoria, la cual en condiciones aerobias, convierte pequeñas cantidades de glucosa en etanol, y en condiciones anaerobias o limitadas de oxígeno, muestra altos valores de producción específica de etanol. (Hack y Marchant, 1998).

Se plantea que esta levadura termotolerante tiene un gran potencial para uso en fermentaciones industriales, principalmente en climas cálidos (Hack y Marchant, 1998) por su habilidad de crecer a altas temperaturas en un amplio rango de sustratos incluyendo inulina y galactosa.

Algunas de las características que la hace un organismo de elección es que es capaz de producir solamente un tipo de enzima pectinolítica (endopoligalacturonasa), a esto se le añade que es considerada un organismo GRAS (generalmente reconocido como seguro), por lo que las enzimas pueden producirse de forma económica como subproductos durante la producción de proteína unicelular. (Blanco *et al.*, 1999) Por otro lado se plantea que esta levadura es una de las que mayor velocidad de crecimiento presentan y tienen alta capacidad de convertir azúcares en biomasa, incluso cuando la fuente de carbono no esta limitante, esto es muy importante a la hora de utilizar esta levadura en procesos para obtener compuestos ligados a la producción de biomasa, con altas producciones y productividades. (Graciano *et al.*, 2007)

Presenta un gran potencial para la producción industrial de diversos compuestos como son los aromas, tal es el caso del 2-feniletanol derivado de la bioconversión de L-fenilalanina; la enzima β -galactosidasa, muy utilizada en la preparación de productos a base de leche y suero para mejorar los problemas de insolubilidad y de baja dulzura del producto (Gamarra y col. 2000); la enzima inulinasa, responsable de la hidrólisis de la inulina en fructosa y oligofructanos, siendo la primera un edulcorante bien tolerado por los diabéticos, que mejora la absorción del hierro en los niños y favorece la eliminación del etanol de la sangre de los alcohólicos. (Skowronek y Fiedurek , 2004).

El hecho de que el 90 % de las proteínas secretadas por esta levadura bajo condiciones anaerobias son endopoligalacturonasas hace a este microorganismo un sistema muy atractivo para la producción de poligalacturonasas, enzimas de gran aplicación en el procesamiento de frutas o jugos de frutas (Pereira *et al.*, 1999)

Otra aplicación muy importante de esta levadura es su utilización como probiótico, con efectos muy beneficiosos en la salud del hospedero tales como la inmuno modulación, el mejoramiento de la flora intestinal, control del colesterol sérico y la reducción de la ocurrencia de enfermedades inflamatorias intestinales (Kaur *et al.*, 2002; Ouwehand *et al.*, 2002; Tuohy *et al.*, 2003, Kumura *et al.*, 2004)

Estudios realizados han demostrado la capacidad de esta levadura de producir altas concentraciones de etanol en el medio de fermentación. Se han reportado cepas de *K.*

marxianus que han producido una concentración máxima de etanol de 44.3 g/L, a 45 °C y en un medio definido (Hack y Marchant, 1998) y otras capaces de acumular altos niveles de enzima endoPG en el medio extracelular (Serrat y col., 2002)

No obstante a lo anterior, Hack y Marchant (1998) en estudios realizados con la cepa IMB3 de esta levadura, demostraron que presentaba baja tolerancia al etanol y bajo crecimiento en condiciones limitadas de oxígeno, por lo que no era viable utilizarla en fermentaciones batch industriales.

1.5.- Producción de alcohol a partir del jugo de la caña de azúcar.

El jugo de caña o guarapo es un líquido ácido, opaco y turbio, rico en carbohidratos y minerales. (**Tabla I**). Se ha reportado, así mismo, un apreciable contenido de proteínas de interés y aminoácidos libres en el jugo. La **Tabla II** muestra la composición aminoacídica de este material. (Almazán y col., 1982). La variabilidad de la composición del guarapo, tanto en sus componentes minerales como orgánicos, puede estar dada por las diferencias del clima, de los terrenos y de otros factores ambientales. Estas variaciones son más bien cuantitativas que cualitativas, ya que todos los jugos contienen aproximadamente los mismos constituyentes pero en proporciones variables. (Spencer-Meade, 1967)

Constituye una de las alternativas más ampliamente utilizadas en la producción de etanol. No obstante, existen diferentes criterios con relación a su utilización como sustrato.

Algunos autores lo consideran un producto no aconsejable para la producción de alcohol y proponen su mezcla con azúcares o mieles, para buscar un enriquecimiento del material, o, en su defecto, una concentración por evaporación para lograr un contenido más alto de azúcares. (Almazán y col., 1982).

Otros, sin embargo, plantean que debido a su alto contenido de sacarosa, su utilización en la industria alcoholera es ventajosa. (Sadae-Tano y Batista 2003). Por otra parte, en el jugo de caña no están presentes sustancias inhibitoras del crecimiento microbiano, como los compuestos furanos (furfural e hidroximetilfurfural) que contienen las melazas, originados de las reacciones Maillard de las pentosas y las hexosas durante la hidrólisis ácida. (Spencer-Meade, 1967)

1.5.1.- Clarificación del jugo de caña.

El proceso de clarificación de este sustrato tiene un especial interés, ya que la fermentación alcohólica del jugo es altamente productora de espuma, en comparación con las mieles, pues se llega hasta un incremento de 70 a 80 % del volumen inicial. Se proponen, para ello, diferentes variantes, desde los esquemas más sencillos, donde el material es pasado a través de tamices vibratorios, seguido de un calentamiento hasta 90-95 °C, a los más complejos, que implican precipitación, por cambio de temperatura y adición de diferentes agentes químicos, como fosfato tricálcico, lechada de cal, etc. Después de este proceso, en

Tabla I.- Composición promedio del guarapo (Almazán, 1982)

Componente	Porcentaje sólidos solubles
°Brix	15,4 – 18,0
ART	8,2 – 9,6
Sacarosa	7,8 - 8,2
Glucosa	2 - 4
Fructosa	2 - 4
N ₂ (total)	0,012 – 0,1
P ₂ O ₅	0,0034 – 0,013
Proteínas	0,46 – 0,53
Ácidos orgánicos	1,17 – 3,07
Cenizas	1,70 – 5,15
Ca	0,15 – 0,29
Mg	0,22 – 0,38

Tabla II.- Composición aminoacídica del guarapo crudo (Almazán, 1982)

Aminoácido	Rango (%)
Acido glutámico	0,064 - 0,087
Acido aspártico	0,055 – 0,071
Leucina	0,051 – 0,071
Alanina	0,037 – 0,055
Lisina	0,038 – 0,051
Valina	0,036 – 0,044
Glicina	0,034 – 0,047
Treonina	0,029 – 0,048
Serina	0,020 – 0,038
Isoleucina	0,027 – 0,030
Arginina	0,024 – 0,030
Fenilalanina	0,022 - 0,030
Tirosina	0,016 – 0,021
Histidina	0,008 – 0,030
Prolina	0,001 – 0,013

cualquiera de sus variantes, el jugo se decanta, se enfría y es enviado a la etapa de fermentación. En relación con el tiempo de fermentación, éste resulta variable, pero mayor, en todos los casos, que cuando se utilizan mieles finales lo que determina, así, un mayor número de fermentadores. (ICIDCA, 1986)

1.6.- Optimización evolutiva (EVOP)

Utilizando modelos matemáticos es posible entender mejor el proceso de fermentación y calcular los efectos de las variables del proceso sobre los resultados de la fermentación, y lograr la optimización de una forma más rápida y más económica. El uso de estos modelos puede ayudar también al desarrollo de mejores estrategias de control para las fermentaciones. (Crueger y Crueger, 1993)

La optimización evolutiva (EVOP) es un proceso iterativo en el cual se genera una figura simplex por la corrida de un experimento más que el número de variables que se quiere optimizar. Este método debe su nombre a que es un proceso que evoluciona lentamente hacia el óptimo.

El procedimiento comienza por la generación de una figura simplex, que es un triángulo cuando se optimizan dos variables, un tetraedro cuando son tres las variables optimizadas, incrementando a un poliedro de $n+1$ lados donde n es el número de variables a optimizar. El punto experimental con la respuesta más pobre se elimina y se genera un nuevo punto por reflexión del punto eliminado a través del centroide de la figura simplex. Este proceso continúa hasta que se logre un óptimo.

Durante el proceso de optimización evolutiva, sólo se explora una región limitada de la superficie de respuesta y, por tanto, sólo se tiene una información mínima del efecto de las variables y de sus interacciones. Esta información es necesaria para determinar los rangos dentro de los cuales deben ser controladas las variables para lograr una operación óptima. Además esta técnica se aproxima al óptimo más cercano, por lo que se desconoce si es un óptimo local o el óptimo para todo el proceso.

A pesar de estas limitaciones, la técnica de optimización EVOP es muy útil, se pueden manipular varias variables a la vez y siempre se obtendrá como resultado un óptimo. (Vogel y Todar, 1997; Skowronek y Fiedurek, 2004).

1.6.1.- Optimización Simplex

Es una técnica secuencial alternativa a la EVOP y se basa en un diseño geométrico conocido como simplex regular de n dimensiones. (Abalos, 2001).

Cuando el Simplex es utilizado para optimizar sistemas experimentales, cada vértice se corresponde con un set de experimentos (**Figura 3**)

Después de las variantes iniciales, el proceso simplex es secuencial, con la adición y evaluación de un nuevo experimento cada vez. El simplex evalúa las respuestas que se obtienen de las variantes que se incorporan al simplex inicial, y busca los mejores niveles

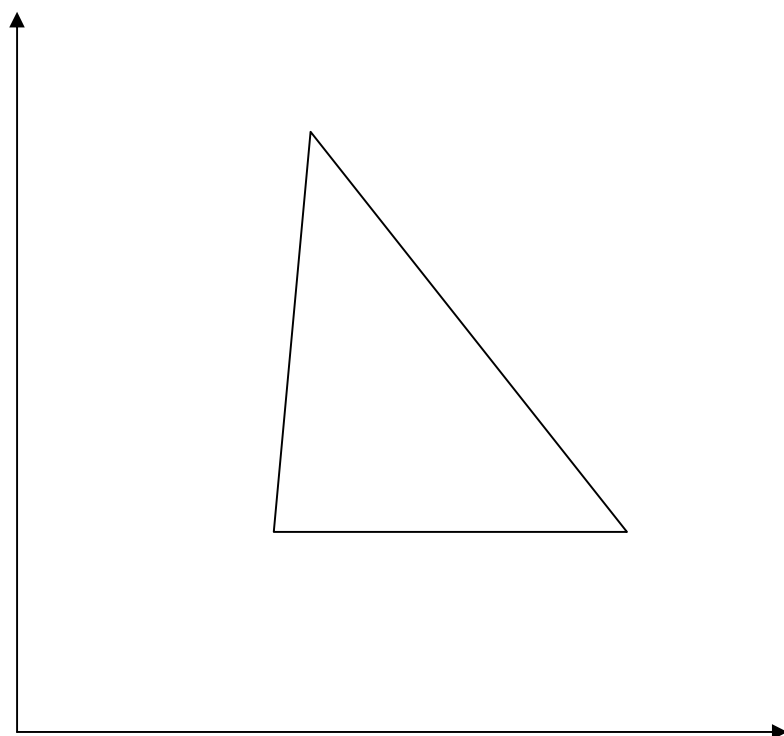


Figura 3.- Simplex definido para tres condiciones experimentales diferentes para dos variables control

de las variables control para el próximo experimento. La optimización termina cuando se logra el óptimo o cuando las respuestas no pueden ser mejoradas.

El método Simplex puede ser **Básico** o **Modificado**. En el primer caso sólo se pueden trabajar hasta tres variables respuesta, y la figura simplex adopta una forma inicial que no varía durante la búsqueda del óptimo. En el segundo caso, el método simplex puede ajustar su forma y tamaño en dependencia de la respuesta obtenida en cada paso, como consecuencia se logrará la región óptima más rápidamente que en el simplex básico. (User's guide MultiSimplex)

1.6.1.1.- Función “membership”.

El software Multisimplex utiliza la teoría fuzzy, con la función membership, para dar una descripción real del objetivo de optimización. Diferentes variables respuesta, con escalas y objetivos de optimización diferentes, pueden ser combinadas en una única respuesta llamada valor agregado de la “membership function”.

La función “membership” de la variable, la cual oscila entre 0 y 1, varía su forma dependiendo de la característica que se desea describir, pero la idea básica es la misma: transformar diferentes variables respuestas en una magnitud que puede ser adecuadamente comparada y combinada con otras. (User's guide MultiSimplex).

Materiales y Métodos

II.- MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente, en el período comprendido entre Diciembre 2006 - Marzo 2008.

2.1.- Jugo de caña y otros medios de cultivo

Se empleó jugo de caña de azúcar (primario) colectado en el mes de Marzo del 2007, en el CAI Dos Ríos del municipio Palma Soriano en la provincia de Santiago de Cuba.

Para la preparación del inóculo y los experimentos de fermentación se utilizaron los siguientes medios (composición, g/L)

- **Medio de mantenimiento de levaduras (YPG):** extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20 y agar 15, pH 6,5-7,0.
- **Medio de propagación del inóculo:** jugo de caña clarificado para una concentración de azúcares reductores totales (ART) de 20; sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, 2; hidrógeno fosfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, 2.

Para los experimentos de fermentación, el guarapo crudo se clarificó y conservó de acuerdo al siguiente esquema (Klibansky y col., 1985).

- añadir fosfato de calcio monobásico $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ a razón de 300 mg de $\text{P}_2\text{O}_5/\text{L}$.
- Calentar a 80 °C por 20 minutos.
- Dejar enfriar y centrifugar (Hitachi, Japón) a 3000 rpm y 4 °C por espacio de 15 minutos.
- Alicuotar en frascos plásticos y conservar en congelación (-20 °C).

2.1.1.- Caracterización del jugo de caña

Al jugo de caña (crudo y clarificado) se le realizó un control de calidad determinando parámetros tales como pH, acidez total, °Brix, Pol, Sacarosa y Azúcares Reductores Libres y Totales, según los procedimientos descritos en el **Manual de Métodos Analíticos para el Control Unificado. Azúcar Crudo (1996)** del Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras. Se le determinó, además, el contenido de proteínas solubles por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y la concentración de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} utilizando la técnica de volumetría por formación de complejos (Alexéiev, 1976), previa mineralización con los ácidos nítrico y sulfúrico. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.1.1.1.- Determinación de pH y acidez total

El pH se determinó mediante lectura directa en un pHmetro marca PACITRONIC (Alemania), empleando un electrodo combinado; el equipo se calibró previamente con soluciones tampón a los pH 4,0 y 7,0 (UNI-CHEM®). La acidez total se determinó a través

del método potenciométrico, utilizando para ello una solución estándar de NaOH 0,1 N. El resultado se expresó como gramos de ácido acético en 100 gramos de jugo.

2.1.1.2.- Determinación de sólidos disueltos (°Brix).

La determinación de los grados Brix se realizó por el método refractométrico. Las lecturas se realizaron por triplicado.

2.1.1.3.- Determinación de Pol.

Para esta determinación se utilizó un sacarímetro marca Hilger Microptic, con tubo de observación de 200 mm y lámpara de sodio. Las muestras se clarificaron previamente con acetato básico de plomo (Método de Schmitz-Horne), y las lecturas se realizaron por triplicado.

2.1.1.4.- Determinación de sacarosa, reductores libres y reductores totales.

Estas determinaciones se realizaron según el Método de Eynon-Lane a volumen constante de 75 ml, previa inversión de la sacarosa por el método de Walker.

2.1.1.5.- Determinación de la remoción de turbidez.

Para ello se determinó la absorbancia del guarapo clarificado y sin clarificar a 620 nm contra un blanco de agua destilada y se calculó el porcentaje de remoción, según la expresión:

$$\% \text{ remoción} = [(A_{sc} - A_c) / A_{sc}] * 100$$

Donde:

A_{sc}: absorbancia del guarapo sin clarificar.

A_c: absorbancia del guarapo clarificado.

2.2.- Estudios cinéticos de la fermentación del jugo de caña bajo condiciones aerobias y microaerófilas.

2.2.1.- Microorganismo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, de la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. El mismo se conservó en cuñas de YPG, a 4 °C y subcultivado a intervalos de 15-21 días.

2.2.2 Preparación del inóculo

Un frasco erlenmeyer de 200 mL de capacidad, que contenía 40 mL de medio de propagación (véase 2.1) se inoculó con una azada de la levadura crecida en YPG. El frasco

se incubó en agitación (Zaranda rotacional P SELECTA España) a 30 °C y 200 rpm durante 10 horas.

Este cultivo se utilizó para inocular (1 % v/v) un frasco erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de propagación, el cual se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. Este constituyó el inóculo utilizado posteriormente en los estudios cinéticos y de optimización.

2.2.3.- Estudio de la cinética del crecimiento de la levadura *K. marxianus* en jugo de caña bajo condiciones aerobias.

Durante el curso de la segunda propagación (frasco de 500 mL, ver 2.2.2) se tomaron muestras cada 1 hora en las primeras 8 horas, y luego cada ½ hora hasta finalizar a las 14 horas, determinando en cada caso el contenido de biomasa por el método espectrofotométrico. Los datos obtenidos se llevaron a un gráfico de logaritmo de la concentración de biomasa versus el tiempo de fermentación ($\ln X$ vs. t), para la estimación de la $\mu_{\text{máx}}$ de la pendiente de la recta de regresión.

2.2.4.- Estudio de la cinética de consumo de sustrato para *K. marxianus* crecida en jugo de caña bajo condiciones de microaerofilia.

2.2.4.1.- Diseño experimental

Para realizar este estudio, primeramente se definieron siete factores, cuyos rangos se describen en la **Tabla III (b)**. Los ART (como jugo de caña) se estudiaron en el rango de 50-125 g/L, porque por debajo del mínimo valor, no tendría sentido la fermentación ya que se obtendrían valores muy bajos de etanol, y si se sobrepasa los 125 g/L, la fermentación no ocurriría o sería demasiado lenta, debido a los fenómenos de inhibición por sustrato (Hack y Marchant, 1998), y por producto, ya que es conocido que la tolerancia máxima de esta cepa al etanol es de un 8 % v/v (Serrat, comunicación personal). El rango de pH y temperatura escogido es el reportado para el cual la enzima es estable (Jayani *et al.*, 2005). Las concentraciones de las sales a utilizar se definieron de acuerdo a lo reportado en la literatura, para este proceso fermentativo (Atkinson y Mavituna, 1983).

Definida la región objeto de estudio, se diseñaron 6 situaciones representativas, en las cuales se varía solamente la temperatura (T) y los ART (como jugo de caña) como los parámetros, considerados a priori, de mayor significación en el crecimiento de la levadura. Se tuvieron en cuenta tres niveles para estos factores. Al resto de las variables a estudiar (pH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, CaCl_2 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se les asignó un valor medio (½) o un valor mínimo (0) en dependencia de los valores tomados por las variables principales. **(Tabla III (a))**

El estudio cinético comprendió dos etapas:

- en una primera experiencia se ensayaron las variantes 1, 2 y 3. Se tomaron muestras cada 4 horas y la fermentación tuvo una duración total de 34 horas.
- una segunda experiencia incluyó las variantes 4, 5 y 6. En este caso las muestras fueron tomadas cada 12 horas por un espacio de 72 horas de fermentación.

Tabla III.- Diseño experimental utilizado para el estudio de la cinética de consumo de sustrato.

a) Factores y niveles

Experimento	ART	T	Otros parámetros
1	1	0	0
2	0	1	0
3	½	0	½
4	½	½	0
5	0	½	½
6	0	0	½

0, nivel bajo; ½, nivel medio; 1, nivel alto

b) Definición de los niveles para cada variable

Variable	Nivel		
	0	1/2	1
ART (g/L)*	50	87,5	125
T (°C)	25	35	45
[H ⁺] (uM)**	1	16,3	31,6
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0	1,5	3
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	0	1,5	3
CaCl ₂ (g/L)	0	0,5	1
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0	0,5	1

* como jugo de caña clarificado

** se estimó de la medición del pH, el cual se ajustó con KOH 1 N y H₃PO₄ 1 N según el caso.

En todos los casos las muestras fueron analizadas para el contenido de reductores totales por el método Somogyi (1952) modificado por Nelson (1957), previa hidrólisis ácida según el método de Walker.

2.2.4.2.- Medio de cultivo

Para la preparación de los diferentes medios de cultivo se utilizaron soluciones stock (10X) de las sales minerales. Al fijar la concentración de los diferentes componentes del medio, se tuvo en cuenta la posterior dilución que tendría lugar al añadir el inóculo. El pH fue ajustado con soluciones de H₃PO₄ 1 N y KOH 1 N para lograr concentraciones hidrogeniónicas altas (pH ácido) o bajas (pH básico), respectivamente. Los medios se esterilizaron a 110 °C, 0,5 atm. por 15 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

2.2.4.3.- Fermentación batch.

Los experimentos se realizaron en tubos de ensayo de 98 x 14 mm (longitud x Ø), con tapa de teflón, termo resistentes y de 10 ml de capacidad (marca HACH), los cuales contenían un volumen total de medio de cultivo de 2,5 ml. Se inocularon con 250 µL (10 % v/v) del cultivo de propagación (véase 2.2.2) y se incubaron bajo condiciones estáticas a la temperatura establecida para cada experimento.

Para cada tiempo de fermentación y variante experimental, se retiraban dos tubos para el correspondiente análisis de ART. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.4.4.- Definición del modelo cinético, determinación del tiempo de fermentación y de los parámetros cinéticos de la fermentación alcohólica.

Durante el crecimiento celular en un cultivo batch se observan varias fases tal como se muestra en la **Figura 4**.

La velocidad de crecimiento está influenciada por diversos factores tales como la concentración de nutrientes, las condiciones ambientales y la naturaleza del propio organismo. En condiciones batch, la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato asume la forma de cinética de saturación. Este comportamiento está descrito matemáticamente a través de la expresión de **Monod**:

$$\mu = \frac{(\mu_{\text{máx.}} * S)}{(K_s + S)} \quad (1)$$

donde S es la concentración del sustrato limitante (se asume que es la fuente de carbono y energía) y K_s está definida como la concentración de sustrato en la cual la velocidad máxima de crecimiento (μ_{máx}) se reduce a la mitad.

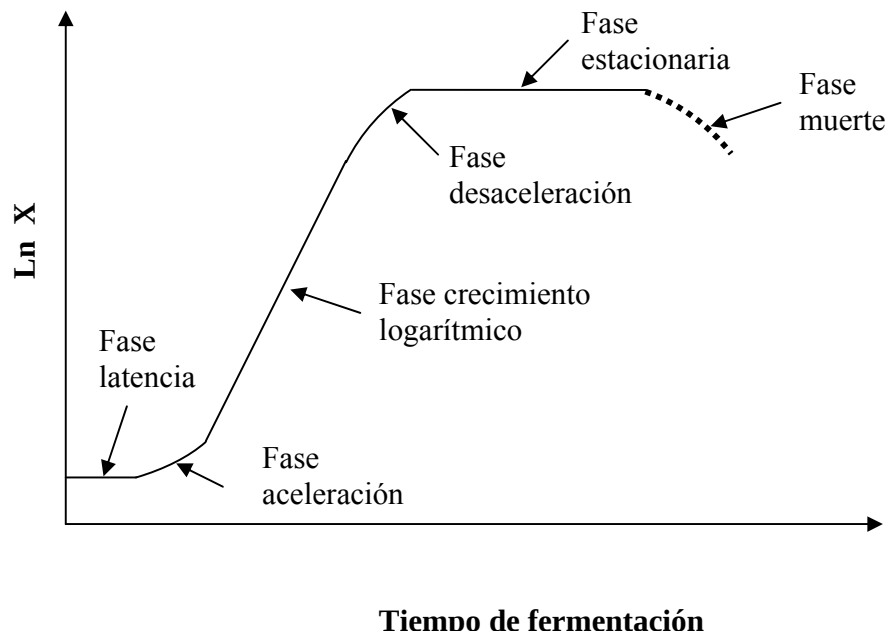


Figura 4.- *Curva de crecimiento en cultivo batch*

Concentraciones muy elevadas de alcohol en el medio de cultivo pueden retardar gradualmente el crecimiento microbiano y finalmente inhibirlo por completo. Si se denota K_p como la concentración inhibitoria de etanol, se puede definir este proceso según:

$$P_{inh} = K_p / (K_p + P) \quad (2)$$

Altas concentraciones de sustrato también inhiben el crecimiento celular debido a un efecto osmótico. Si se denota K'_s como la concentración de sustrato inhibitoria del crecimiento, se puede definir lo anterior según:

$$S_{inh} = K'_s / (K'_s + S) \quad (3)$$

La combinación de estas tres ecuaciones da como resultado una expresión de μ en función de la inhibición por producto y por sustrato:

$$\mu = \frac{(\mu_{m\acute{a}x} \cdot S)}{(K_s + S)} * \{K_p / (K_p + P)\} * \{K'_s / (K'_s + S)\} \quad (4)$$

Por otra parte, el consumo de sustrato durante el crecimiento microbiano está dado por la expresión:

$$-dS/dt = (1/Y_{x/s}) dX/dt + m_s X \quad \text{donde} \quad (5)$$

$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S) \text{ es el rendimiento de biomasa,} \quad (6)$$

$$dX/dt = \mu X \text{ es la expresión del crecimiento exponencial, y} \quad (7)$$

m_s es el coeficiente de mantenimiento.

Como m_s es muy pequeño, se puede despreciar el término $m_s X$ en (5), combinando las ecuaciones 4, 5, 6 y 7, e integrando (asumiendo que $Y_{x/s}$ permanece constante), se obtiene una expresión para el tiempo de fermentación en función de la concentración remanente del sustrato $t = f(S)$, la cual responde a la forma:

$$t = a_1 S^2 + a_2 S + a_3 \ln S + a_4 \ln X + a_5 \quad (8)$$

donde los coeficientes a_1 , a_2 , a_3 , a_4 y a_5 son funciones de las constantes de inhibición por sustrato y por producto (K'_s y K_p), de la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) y de la constante de saturación (K_s), y X es la concentración de biomasa (células viables), que se calcula en función de la concentración de sustrato : $X = X_0 + Y_{x/s} (S_0 - S)$

Los pares de datos (S,t), correspondientes a cada experimento, se ajustaron al modelo (Ec. 8) mediante un algoritmo de regresión no lineal con ayuda del software Statistica, (versión 6.0, STATSOFT, Tulsa, Ok., USA). Se utilizaron como valores iniciales para la estimación de los coeficientes del modelo, los siguientes:

$$\begin{aligned}\mu_{\text{máx}} &= 0,562 \text{ (h}^{-1}\text{)} && \text{(Serrat, 2003)} \\ K_s &= 1,900 \text{ (g/L)} && \text{(Ghaly, et al., 1997)} \\ K'_s &= 112,510 \text{ (g/L)} && \text{(Ghaly, et al., 1997)} \\ K_p &= 20,650 \text{ (g/L)} && \text{(Ghaly, et al., 1997)} \\ Y_x &= 0,031 \text{ (g/g)} && \text{(Serrat, 2003)} \\ Y_p &= 0,44 \text{ (g/g)} && \text{(Serrat, 2003)}\end{aligned}$$

Este modelo se utilizó para estimar los tiempos de fermentación en las experiencias de optimización, estableciendo como criterio para finalizar la fermentación, un consumo de sustrato (ART) del 98 %.

2.3.- Optimización de la coproducción de endopoligalacturonasa y etanol.

Para realizar este estudio se utilizó el método secuencial Simplex, con el objetivo de obtener un aproximado de la combinación óptima de los valores para los diferentes parámetros que influyen en la producción conjunta de etanol y endopoligalacturonasa por la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011. Para este propósito se utilizó el software MultiSimplex A.B. (v. 2.1.1) Grabitech, Suecia, 1988.

2.3.1.- Definición del proyecto de optimización.

Se consideraron 7 variables control que se estimó podían tener una influencia importante en las respuestas a evaluar. Los factores y niveles con los cuales se trabajó se describen en la **Tabla IV**.

La respuesta que se estudió fue la producción conjunta de enzima endopoligalacturonasa (expresada en U/mL) y etanol (expresado como productividad volumétrica, en g/Lh).

En las **Tablas V, VI y VII** se muestran los parámetros utilizados en el algoritmo de optimización

Se realizaron un total de 15 ensayos, de los cuales los 8 primeros correspondieron al primer Simplex, para llegar finalmente a un entorno óptimo para la producción simultánea de alcohol y enzima. (**Tabla VIII**)

2.3.2.- Fermentación

Los experimentos se realizaron por duplicado, al igual que las determinaciones de biomasa, etanol, actividad enzimática y ART.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que en el estudio cinético (ver 2.2.4), excepto en lo que se refiere a las variables estudiadas, las cuales se ajustaron a los valores sugeridos por el Simplex

Tabla IV.- Variables independientes (factores) y niveles considerados para la optimización.

Variable	Nivel inferior	Nivel superior	Unidades
[H ⁺]	1	31.6	uM
T	25	45	°C
ART	50	125	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	3	g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	3	g/L
CaCl ₂	0	1	g/L
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0	1	g/L

Tabla V.- Definición de las variables control utilizadas en el método Simplex

	Variables control						
	[H ⁺]	T	ART	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄
Unidad	uM	°C	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Tamaño del paso	15,3	10	37,5	1,5	1,5	0,5	0,5
Valor de referencia	16,3	35	87,5	1,5	1,5	0,5	0,5
Decimales	1	0	1	2	2	2	2
Mezcla	N	N	N	N	N	N	N

Tabla VI.- Definición de las variables respuesta a optimizar en el Simplex

	Variables respuesta	
	PG	Etanol (Qvol)
	U/mL	g/Lh
Influencia	1	1
Tipo	1	1
Valor “blanco”	-	-
Límite inferior	0	1,2
Límite superior	25	2,5
Forma (R):	1	1

Tabla VII.- Algoritmo de optimización prefijado para el Simplex

	Algoritmo
Primer simplex:	modificado
Método:	modificado
Reevaluación:	2
No. Variables +:	3
Alfa:	1
Beta -:	0,5
Beta+:	0,5
Gamma:	2

α : coeficiente de reflexión

β -: coeficiente de contracción -

β +: coeficiente de contracción +

γ : coeficiente de expansión

Tabla VIII.- Matriz de experimentos sugeridos por el método Simplex para optimizar coproducción de etanol y PG

Exp.	[H ⁺] (uM)	T (°C)	ART (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)
1	24	40	106.3	2.25	0.75	0.25	0.25
2	24	28	106.3	0.75	2.25	0.75	0.25
3	8.7	40	68.8	0.75	0.75	0.75	0.25
4	8.7	28	68.8	2.25	2.25	0.25	0.25
5	8.7	40	106.3	2.25	2.25	0.75	0.75
6	24	28	68.8	2.25	0.75	0.75	0.75
7	24	40	68.8	0.75	2.25	0.25	0.75
8	8.7	28	106.3	0.75	0.75	0.25	0.75
9	26.2	42	63.4	2.46	2.46	0.82	0.18
10	7.1	42	110.1	1.02	2.52	0.34	0.02
11	18.4	29	82.5	1.84	1.2	0.61	0.55
12	24.8	31	125	2.48	2.73	0.33	0.54
13	31.4	28	88.8	2.63	1.02	0.73	0.91
14	27	26	78.1	2.63	1.45	0.73	0.91
15	16.3	35	87.5	3.44	1.49	0.32	0.87

Nota: Las pruebas del 1 al 8 corresponden al primer Simplex

2.3.3.- Tratamiento de las muestras

Al finalizar la fermentación, los medios de cultivo se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. para separar la biomasa. El sobrenadante libre de células fue utilizado para determinar la concentración de alcohol, ART y la actividad enzimática.

La biomasa fue resuspendida en 1ml de EDTA 0,2 mol/L, con el objetivo de solubilizar el precipitado formado por las sales del medio de cultivo y por tanto, eliminar la interferencia que esto pudiera ocasionar en la determinación espectrofotométrica.

La proteína presente en el sobrenadante libre de células se precipitó con acetona helada (75 % v/v). Luego se centrifugó nuevamente y el sedimento se lavó con etanol absoluto helado. Finalmente se disolvió en igual volumen de buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0). Esta muestra se utilizó para la determinación de la actividad enzimática poligalacturonasa.

En caso de no procesarse el mismo día, el sobrenadante utilizado para la determinación de alcohol y ART, se conservó en tubos eppendorf en congelación (-20 °C). De igual manera se conservaron las muestras utilizadas en la determinación de la actividad enzimática, pero a estas se les añadió además, una solución de buffer fosfato (pH 7) 1 mol/L, para una concentración final de 0,16 mol/L, y alcohol para una concentración del 20 % v/v, y se conservaron a 4°C con el objetivo de garantizar la estabilidad de la enzima,.

2.4.- Determinaciones analíticas

2.4.1.- Determinaciones espectrofotométricas

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia LKB). Todas las determinaciones se ejecutaron según el método de curva de calibración (ANEXOS).

El etanol se determinó por el método de microdifusión y colorimetría (Conway, 1947, modificado por King y Wootton, 1956), usando como patrones soluciones de alcohol absoluto en un rango de 2 – 20 mg/ml. La lectura de la absorbancia se realizó a 590 nm.

Los azúcares reductores se determinaron según el método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1957), usando como patrones glucosa (Sigma), en el rango de 20-220 µg/mL. La lectura espectrofotométrica se realizó a 520 nm. En el caso de las muestras de fermentación, primeramente se efectuó la inversión de la sacarosa mediante hidrólisis ácida, tal como se describe en el método de Walker.

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 650 nm y se utilizó como patrón seroalbúmina bovina (BSA), (BDH, Inglaterra). La solución de BSA se calibró espectrofotométricamente a 280 nm.

2.4.2.- Determinación de biomasa

La concentración de biomasa en los ensayos se determinó espectrofotométricamente a 620 nm utilizando una curva patrón de absorbancia en el rango de 0,032-0,317 unidades. Esta curva se estandarizó gravimétricamente. Para este fin se tomó un cultivo de la levadura en jugo de caña de 14 horas, preparado según se describe en 2.2.2 y se le determinó la concentración de biomasa:

- a) directamente: como masa celular seca (gravimetría) luego de colectarse la biomasa por centrifugación (6000 rpm, 10 minutos), lavarse tres veces con agua destilada y secarse en estufa a $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- b) indirectamente: por espectrofotometría, utilizando una curva patrón preparada a partir de diluciones entre 10-100 % en volumen de la suspensión de biomasa. Las mediciones se realizaron a 620 nm. El patrón al 10 % se utilizó para realizar el conteo celular al microscopio en cámara Rosenthal.

2.4.3.- Determinación de la actividad endopoligalacturonasa.

Se empleó como sustrato ácido poligalacturónico (PGA) (Sigma) 0.5% (m/v) en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. La mezcla de reacción consistió de 400 μL de sustrato y 100 μL de una dilución adecuada del enzima en el mismo buffer del sustrato. La reacción enzimática se desarrolló a 37°C , durante 10 minutos. La actividad PG se estimó del incremento en el poder reductor del sustrato, determinado según el método de Somogyi (1952) modificado por Nelson (1957). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera $1\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de extremos reductores (como ácido galacturónico) bajo las condiciones de ensayo.

2.5.- Fórmulas y procedimientos de cálculo empleados

- *Velocidad específica de crecimiento (μ)*

Se expresa en unidades / hora y se deriva de la expresión:

$$X_t = X_0 * e^{\mu t}$$

Donde: X_0 = concentración inicial de biomasa

X_t = concentración de biomasa en el tiempo t

t = Tiempo (horas)

La constante (μ) se calcula representando $\ln X$ vs t, que en cultivos discontinuos corresponde a una recta de pendiente μ .

- *Rendimiento biomasa / sustrato ($Y_{X/S}$)*

$$Y_{X/S} = (X - X_0) / [S_0 - S]$$

Donde: $Y_{X/S}$ = Rendimiento de biomasa

[X] = Concentración de biomasa al tiempo t

[X₀] = Concentración de biomasa inicial

[S₀] = Concentración de sustrato inicial

[S] = Concentración de sustrato al tiempo t

- *Rendimiento producto / sustrato*

$$Y_{P/S} = [P] / [S_0 - S]$$

Donde: $Y_{P/S}$ = Rendimiento de producto

[P] = Concentración de producto al tiempo t

[S₀] = Concentración de sustrato inicial

[S] = Concentración de sustrato al tiempo t

- *Productividad volumétrica*

$$Q_v = [P] / t$$

Donde: Q_v = Productividad volumétrica

[P] = Concentración de producto

t = Tiempo de fermentación

- *Eficiencia de la fermentación alcohólica*

$$E = R_R / R_T$$

Donde: E = Eficiencia

R_R = Rendimiento Real

R_T = Rendimiento Teórico

En nuestro caso, donde el sustrato fermentativo es una hexosa, el rendimiento teórico es igual a 0,511, correspondiente a la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono.

2.6.- Análisis estadístico de los resultados

El primer Simplex corresponde a un diseño Plackett-Burman para 7 variables independientes, por lo que se sometió al correspondiente análisis estadístico (gráfico de

Pareto), con el objetivo de determinar la influencia de las diferentes variables en la respuesta final.

Para la interpretación de los parámetros muestrales se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t-student (para dos medias) y el análisis de varianza (ANOVA de clasificación simple). Se utilizó siempre un nivel de significación del 5 %. En los casos requeridos se utilizó el análisis de regresión lineal simple. Todos los análisis estadísticos se realizaron por el Statgraphics Plus 3.1 (Statistical Graphics Rockville, Md, USA).

Resultados y Discusión

III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Jugo de caña.

Para la utilización del jugo de caña de azúcar como sustrato fermentativo, es necesario el previo estudio de su composición de azúcares y de otros parámetros de calidad, lo cual es imprescindible para la correcta preparación de un medio de fermentación similar al industrial.

3.1.1.- Clarificación.

El jugo de caña es ácido, opaco y turbio por las impurezas insolubles y coloidales que contiene, consistentes en materias proteicas y no proteicas como colorantes, gomas, grasas, ceras y materias minerales. La literatura consultada plantea la necesidad de su tratamiento previo antes de la fermentación por su alta tendencia a la formación de espuma, dado su contenido en proteínas, lo cual, además de provocar pérdidas del volumen de fermentación, puede traer aparejado el arrastre de células de levaduras con la consecuente afectación en el rendimiento y la productividad del sistema (Klibansky, y col. 1985). En nuestro caso, además, estas proteínas contribuyen negativamente a la pureza del producto final, al ser las enzimas pépticas, sustancias de naturaleza proteica.

En el proceso de clarificación del guarapo se eliminan la mayor cantidad de impurezas solubles e insolubles. El empleo combinado de calor y de un agente clarificante es el procedimiento más ampliamente utilizado.

En la fabricación del azúcar, el jugo se clarifica mediante tratamiento químico con lechada de cal y calentamiento, lográndose neutralizar la acidez, a la par que se logra insolubilizar y precipitar, por razón del cambio de pH y temperatura, ciertos no azúcares, de naturaleza coloidal, que se separan por sedimentación (ICIDCA, 2000).

Este procedimiento no es conveniente emplearlo con un guarapo que se utilizará en un proceso fermentativo en presencia de levadura, puesto que las condiciones óptimas de pH para la fermentación son de 4,5 - 5,0, más cercanos a los del pH del jugo original; y este tratamiento torna al jugo neutro. Por otra parte la adición de cal elimina los compuestos de nitrógeno y los fosfatos del jugo, los cuales constituyen nutrientes esenciales para la levadura. Por último, el aumento del pH detiene el proceso de inversión de la sacarosa, lo cual resulta perjudicial para el crecimiento de la levadura en este medio (Spencer-Meade, 1967).

En nuestro caso, se realizó la clarificación con un fosfato ligeramente soluble y ácido (fosfato de calcio monobásico $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$), cuyas ventajas son que se obtiene un jugo más claro, ocurre una mayor eliminación de coloides, y el guarapo clarificado contiene una menor cantidad de sales de calcio. Al mismo tiempo, no afecta considerablemente el pH del jugo.

La adición de fosfatos solubles conlleva a la formación de un precipitado con los iones Ca^{2+} presentes en el guarapo, y en este precipitado se eliminan ciertos coloides por un proceso de adsorción, y la materia suspendida, por un proceso mecánico de englobamiento u oclusión.

Las partículas que han sido floculadas por un cambio de pH o adsorbidas por el precipitado de fosfato de calcio han pasado del estado coloidal al estado sólido, pero su naturaleza química ha permanecido invariable. Sin embargo los coloides que han sido coagulados por el calor han sufrido importantes cambios químicos e intramoleculares. Las proteínas y otras sustancias similares, los pentosanos y las gomas están entre los coloides que son coagulados por calor (Spencer-Meade, 1967).

En el procedimiento de clarificación empleado en este trabajo se logra, mediante la sedimentación, la separación de este precipitado, obteniéndose así un jugo transparente y limpio (**Figura 5**).

La medición de la absorción (620 nm) del guarapo clarificado y sin clarificar arrojó valores de 0,520 y 2,405 unidades de absorbancia respectivamente, lo cual es evidencia de que el objetivo de eliminar las impurezas coloidales en suspensión del jugo se logró, obteniéndose una remoción de un 78,4 % de la turbidez. Se puede decir entonces que el método de clarificación utilizado fue adecuado para nuestros fines.

3.1.2.- Caracterización físico-química.

En la **Tabla IX** se muestran los valores obtenidos para los diferentes parámetros evaluados en el jugo clarificado y sin clarificar. Al compararlos con los reportados en la literatura (Spencer-Meade, 1967), se pudo comprobar que existe correspondencia y que por tanto, el sustrato utilizado en el estudio es representativo.

Por otra parte al establecer una comparación entre ambos jugos (clarificado y sin clarificar) se comprobó que el jugo clarificado posee casi la misma composición que cuando no está clarificado exceptuando las impurezas precipitadas como las proteínas y los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esto, además, permite corroborar la calidad del proceso de clarificación, donde se logró un 77,8 % de remoción de material proteico.

La pequeña diferencia encontrada entre ambos jugos, en cuanto al porcentaje de sacarosa, puede ser debido a que durante la clarificación, la elevada temperatura (80 °C) provocara, conjuntamente con el pH ligeramente ácido del guarapo, la hidrólisis en bajas proporciones de la sacarosa presente en el jugo sin clarificar. Esto explica la reducción en el contenido de sacarosa en el guarapo clarificado, producto de lo cual se esperaría un aumento de los reductores libres, hecho que no ocurrió, lo cual puede deberse a la ocurrencia de reacciones de Maillard (caramelización) entre las proteínas presentes en el jugo y los reductores libres, provocando así la disminución de los mismos.

Referido a la diferencia de acidez entre ambos jugos, la literatura plantea que, durante la clarificación del guarapo ocurre un descenso del pH, cambio que está en función de la cantidad de P_2O_5 que contiene el jugo, y cuanto más alto sea el contenido de fosfato, más notable será la diferencia entre el pH del jugo clarificado y sin clarificar. Esta disminución



Figura 5.- Apariencia visual de la clarificación del jugo de caña con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$. (A) jugo clarificado, (B) jugo sin clarificar.

Tabla IX.- *Parámetros de calidad del guarapo clarificado y sin clarificar*

Parámetros	Jugo De Caña	
	Clarificado	Sin Clarificar
pH	6.0	5.5
Acidez total (%)	0.087	0.11
°Brix	22.6	22.2
Pol	19.75	19.8
Sacarosa (% m/m)	17.7	19.8
Reductores libres (% m/m)	0.76	1.01
ART (% m/m)	19.41	21.91
Proteínas (g/L)	0.80	3.60
Mg (% m/v)	0.23	1.15
Ca (% m/v)	0.13	0.65

es un resultado de la formación del precipitado de fosfato de cal (Spencer-Meade, 1967). A pesar de lo planteado anteriormente, en nuestro caso ocurrió lo contrario. Aunque ligeramente, el porcentaje de acidez del jugo clarificado (0,087 %) fue menor que el obtenido para el guarapo sin clarificar (0,109 %), lo cual puede deberse a un aporte que hiciera el fosfato de calcio utilizado en la clarificación, en el sentido de un aumento del pH.

Por otra parte es necesario señalar que la variabilidad de la composición del guarapo, tanto en sus componentes minerales como orgánicos, puede estar dada por las diferencias del clima, de los terrenos y de otros factores ambientales. Estas variaciones son más bien cuantitativas que cualitativas, ya que todos los jugos contienen aproximadamente los mismos constituyentes pero en proporciones variables (Spencer-Meade, 1967).

3.2.- Estudios cinéticos de la fermentación del jugo de caña por *K. marxianus* en condiciones aerobias y microaerófilas.

El estudio del comportamiento de un microorganismo bajo determinadas condiciones de cultivo, es una herramienta útil para predecir y controlar un proceso fermentativo. En nuestro caso nos permitió definir, mediante una cinética de crecimiento en condiciones aerobias, el tiempo óptimo para la toma del inóculo a utilizar en los experimentos de optimización.

El comportamiento de la levadura en condiciones microaerófilas, fue estudiado mediante una cinética de consumo de sustrato, cuyos resultados permitieron estimar el tiempo que debía durar el proceso fermentativo durante los estudios de optimización, para obtener altos valores de concentración de los productos finales, una vez consumida la fuente de carbono en una proporción de un 95-98 % del total disponible en el medio. Permitted además, determinar otros parámetros que describen la cinética del proceso fermentativo bajo estas condiciones.

3.2.1.- Estudio de la cinética de crecimiento de la levadura *K. marxianus* en jugo de caña en cultivo aerobio.

Los sistemas discontinuos para la producción de etanol se inician aeróbicamente para obtener la máxima biomasa, ya que si las condiciones anaerobias comienzan demasiado pronto, la densidad de la población no será lo suficientemente alta para obtener una buena productividad (Crueger y Crueger, 1993).

Como la finalidad de este estudio era determinar cómo se comportaba el crecimiento de la levadura en jugo de caña, y no su capacidad fermentativa, se fijó una concentración de ART de 20 g/L para garantizar que, conjuntamente con las condiciones aerobias, el metabolismo que predominara fuera el respiratorio y no hubiera inducción de un proceso fermentativo, para así obtener el mayor rendimiento de biomasa en este medio. Además se definirían las condiciones óptimas de propagación, y con ello la homogeneidad del inóculo a utilizar durante todo el estudio de optimización.

La **Figura 6** muestra la curva $\ln X$ vs t en jugo de caña con una concentración de ART de 20 g/L. La **Figura 7** muestra la determinación de la velocidad específica de crecimiento a partir de la fase exponencial de dicha curva.

En la Figura 6 se observa como en el transcurso de las 14 horas que duró el estudio de la cinética del crecimiento de la levadura, se manifestaron tres de las fases que caracterizan el crecimiento microbiano: una corta fase de latencia de aproximadamente 2 horas de duración que, aunque es pequeña, no es despreciable. Se esperaba que esta fase fuera prácticamente inexistente, debido a que el medio de cultivo tenía la misma composición que el medio de propagación utilizado para la levadura, es decir, se realizó la activación del microorganismo en un medio de igual composición que el medio de fermentación. A partir de este momento, comenzó un vertiginoso crecimiento iniciándose así la fase exponencial de la curva que culminó aproximadamente a las 9 horas de comenzada la fermentación. Finalmente se observó la fase de desaceleración entre las 9 y las 14 horas, donde la biomasa varió muy poco su concentración. Se decide terminar el estudio a las 14 horas ya que a partir de ese tiempo el comportamiento de la levadura se hizo irregular, probablemente debido a que el cultivo haya alcanzado la fase estacionaria. Los cambios que ocurren en esta etapa del crecimiento microbiano, tales como: extinción de nutrientes esenciales, acumulación de productos tóxicos, o desarrollo de un pH desfavorable, provocan cambios morfológicos y, en ocasiones, lisis celular, liberándose al medio nuevos sustratos que pueden servir como fuentes de energía para el crecimiento lento de los supervivientes (Moat y Foster, 2002). A esto se debe añadir, que el método espectrofotométrico utilizado en la determinación de la biomasa (método indirecto), es sensible a los cambios morfológicos que pueden sufrir las células en condiciones de stress, arrojando mediciones erróneas. De modo que para esta etapa de la fermentación, no resulta confiable continuar el estudio del crecimiento microbiano mediante estimaciones espectrofotométricas de la biomasa. Además la fase estacionaria no es de interés para nuestros propósitos.

La Figura 7 muestra la curva correspondiente a la fase exponencial del crecimiento cuya ecuación de regresión es $y = 0.8356x - 5.5022$ y $R^2 = 0,993$, a partir de la cual se obtuvo que la $\mu_{\text{máx}}$ de esta levadura en jugo de caña en condiciones aerobias, tiene un valor de $0,84 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de doblaje de 0,8 h.

Este valor de $\mu_{\text{máx}}$ es alto si se compara con otros valores obtenidos en trabajos realizados con cepas de *Kluyveromyces* bajo condiciones aerobias, tal es el caso de Banat *et al.* (1995) con la cepa IBM 3 de esta levadura ($\mu_{\text{máx}} = 0,58\text{-}0,63 \text{ h}^{-1}$) y más recientemente por Graciano *et al.* (2007) con la cepa ATCC 26548, ($\mu_{\text{máx}} = 0,56 \text{ h}^{-1}$). En ambos casos se utilizó glucosa como única fuente de carbono.

Este resultado se corresponde con lo planteado por Graciano *et al.* (2007) referente a que ésta es una de las levaduras que mayor velocidad de crecimiento presenta unido a una alta capacidad de conversión de azúcares en biomasa.

El rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) es uno de los principales parámetros estequiométricos del crecimiento microbiano, y describe como se incrementa la biomasa microbiana en consecuencia con la utilización de una cantidad de sustrato determinada. Da una medida de la eficiencia del proceso de producción y su valor puede estar influenciado por diferentes

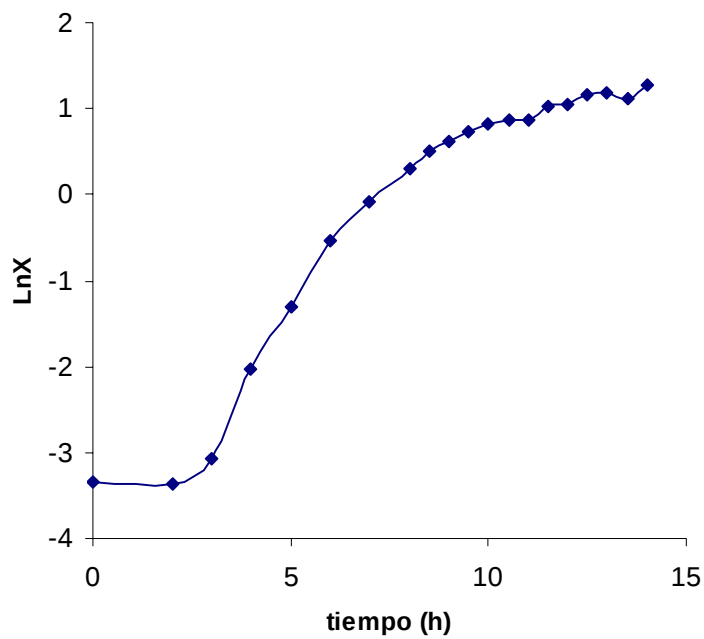


Figura 6.- Curva de crecimiento de la levadura *K.marxianus* en jugo de caña en cultivo aerobio.

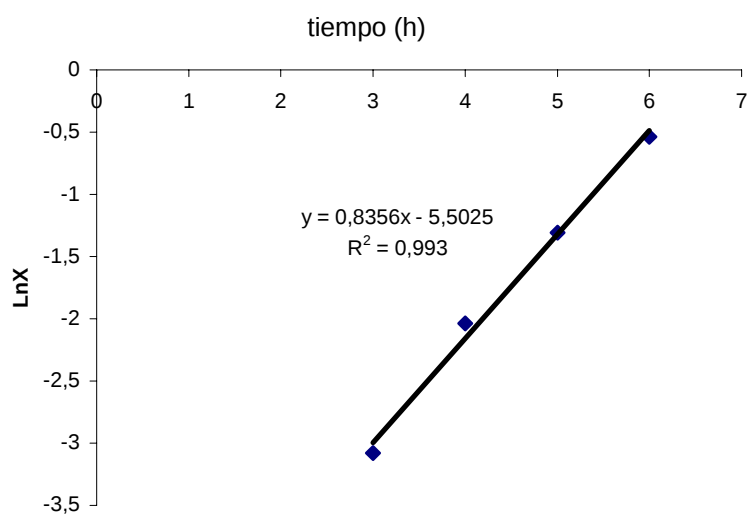


Figura 7.- Velocidad específica máxima de crecimiento de la levadura *K.marxianus* en jugo de caña en cultivo aerobio.

aspectos referentes a la composición del medio de cultivo, sus características físico-químicas y otros relacionados con el microorganismo.

En jugo de caña, bajo condiciones aerobias, la levadura *K. marxianus* tuvo un rendimiento de biomasa de 0,23 g/g el cual se considera bajo, si se compara con otros resultados como el obtenido por Graciano *et al.* (2007) ($Y_{x/s} = 0.51$), pero en glucosa. En general, el rendimiento de biomasa tiene un valor aproximado de 0,5 g/g cuando se utilizan azúcares como sustrato. En este caso, cabe pensar en la incidencia de factores nutricionales y energéticos, que pudieran haber afectado el crecimiento microbiano.

La levadura necesita para crecer algunas vitaminas del grupo B, como la biotina, tiamina, ácido pantoténico, etc. (Ertola, 1997). Es posible que el jugo de caña utilizado en nuestro estudio estuviera deficitario de alguna de estas vitaminas, por lo que el microorganismo debió de invertir energía para sintetizarlos, influyendo de manera negativa en el crecimiento y por lo tanto en el rendimiento de biomasa.

La levadura *K. marxianus* tiene como fuente principal de carbono la lactosa, pero puede crecer en una amplia variedad de sustratos (Serrat, 2003). En medios que contienen sacarosa, las levaduras deben secretar la enzima invertasa, encargada de hidrolizar este sustrato a sus unidades más sencillas (glucosa y fructosa). Una disfunción en este mecanismo pudiera igualmente afectar el crecimiento microbiano.

Otro factor que podría incidir en la prolongada fase de desaceleración, observada a partir de las 7-8 horas, pudiera estar relacionado con la existencia de un nutriente limitante diferente de la fuente de carbono (p. ej.: fósforo). Lamentablemente no se había podido determinar el contenido de esta sustancia en el jugo de caña en el momento de redactar este informe.

Ante la sospecha de una posible existencia de un metabolismo respiratorio-fermentativo, se hicieron determinaciones de alcohol, en diferentes momentos de la cinética, obteniéndose como resultado valores entre 0 – 2 g/L, los cuales se consideran insignificantes, descartándose la incidencia de este fenómeno en el rendimiento de biomasa obtenido.

Teniendo en cuenta el comportamiento del crecimiento de esta cepa en el jugo de caña, se decide tomar como inóculo, para los restantes ensayos que componen el presente trabajo, un cultivo de 8½ horas, lo cual corresponde al final de la fase logarítmica y al inicio de la fase de desaceleración, cuando la concentración de biomasa está en el orden de 1,67 g/L con una concentración celular de aproximadamente $7,7 \times 10^6$ cél/mL. A pesar de ser un inóculo pequeño, se decide tomarlo en estas condiciones para garantizar un óptimo estado fisiológico y alta viabilidad, y así evitar la utilización de células estresadas por las condiciones descritas anteriormente, propias de la fase de desaceleración, que pudieran existir en el cultivo, a un tiempo mayor.

3.2.2.- Estudio de la cinética de consumo de sustrato para la levadura *K. marxianus* cultivada en jugo de caña bajo condiciones de microaerofilia.

La **Figura 8** muestra la cinética de consumo de sustrato en un cultivo limitado de oxígeno. Como puede apreciarse el consumo de sustrato corresponde prácticamente a una cinética de orden cero ($-dS/dt = K$) en todos los experimentos, con valores de $R^2 > 0,8$.

Teniendo en cuenta los valores reportados en la literatura sobre el tiempo de fermentación alcohólica (ICIDCA, 2000; Serrat, 2003; Obregón, 2006), se fijó un lapso de 34 horas de fermentación para las variantes 1, 2 y 3 del estudio cinético. Como resultado se obtuvo que, para este tiempo, en ninguno de los experimentos, la cantidad de ART consumidos sobrepasó el 50 %, comportándose de la siguiente manera: 14,6 %; 49,4 % y 35,8 % para las variantes 1, 2 y 3 respectivamente, lo cual indicó que el tiempo de fermentación debía ser mayor.

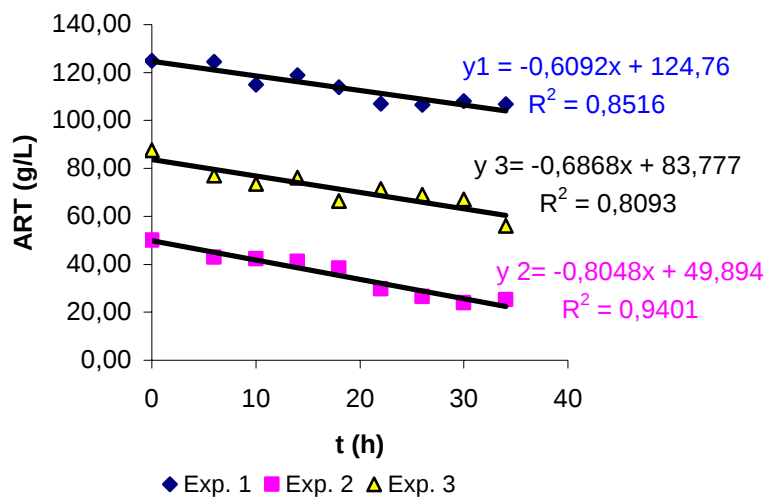
Por esta razón, se decidió extender el estudio cinético a 72 horas para los restantes experimentos del estudio. El porcentaje de ART consumidos bajo estas condiciones mejoró significativamente: 84 %, 98 % y 64,5 % para las variantes 4, 5 y 6 respectivamente. (**Figura 9**)

Según estos resultados, las fermentaciones realizadas bajo las condiciones de ART inicial de 50 g/L y 35 °C (Exp. 5) y de 87,5 g/L y 35 °C (Exp. 4) tuvieron el mejor comportamiento en cuanto al porcentaje de ART consumidos (98 % y 84 % respectivamente), contrario a lo obtenido en condiciones de ART 125 g/L a 25 °C, donde el consumo de reductores solamente alcanzó el 14,6 % del total.

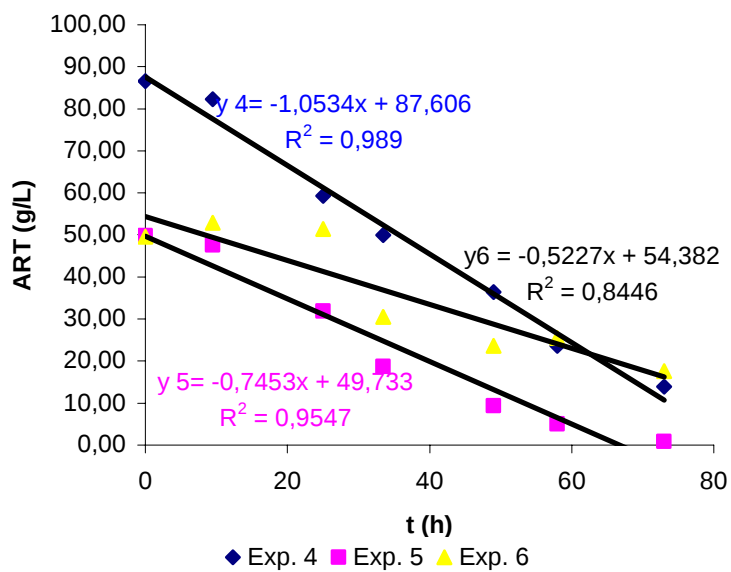
Este mayor consumo de sustrato, observado en la variante 5, puede estar dado, por una parte a una mayor producción de biomasa. Se reporta que esta levadura es termotolerante (Hack and Marchant, 1998) por lo que temperaturas mayores de 35 °C favorecen su crecimiento. Por otra parte, un elevado consumo de reductores puede deberse a su utilización, por parte de la levadura, en el mantenimiento celular, lo cual puede explicar el 84 % de ART consumidos observado en el experimento 4, donde no se suministró nutrientes en la formulación del medio, por lo que la levadura creció en condiciones de stress nutricional.

En el caso donde se obtuvo un 14,6 % de consumo de reductores (Exp. 1), se debe tener en cuenta que la utilización de concentraciones altas de sustrato, pudo inducir un proceso de inhibición por esta causa, afectando la velocidad de crecimiento al inicio de la fermentación y por ende el consumo de sustrato. Por otro lado la baja temperatura utilizada en esta experiencia (25 °C) debió incidir en una notable disminución de la $\mu_{m\acute{a}x}$, y por ende, en la velocidad de consumo de sustrato

En todas las variantes estudiadas la fermentación se extiende por espacios de tiempos superiores a las 48 horas, aspecto este que atenta contra la productividad y la economía del bioproceso. Un aspecto a considerar, y que tiene mucha importancia en los procesos fermentativos, es el tamaño del inóculo utilizado. Se plantea que la utilización de inóculos con alta concentración de células disminuye la influencia de la inhibición por etanol, (Vega



a)



b)

Figura 8.- Cinética de consumo de sustrato en cultivo limitado de oxígeno en jugo de caña .a) experimentos 1, 2 y 3. b) experimentos 4, 5 y 6. Cada punto experimental corresponde al promedio de dos experiencias independientes.

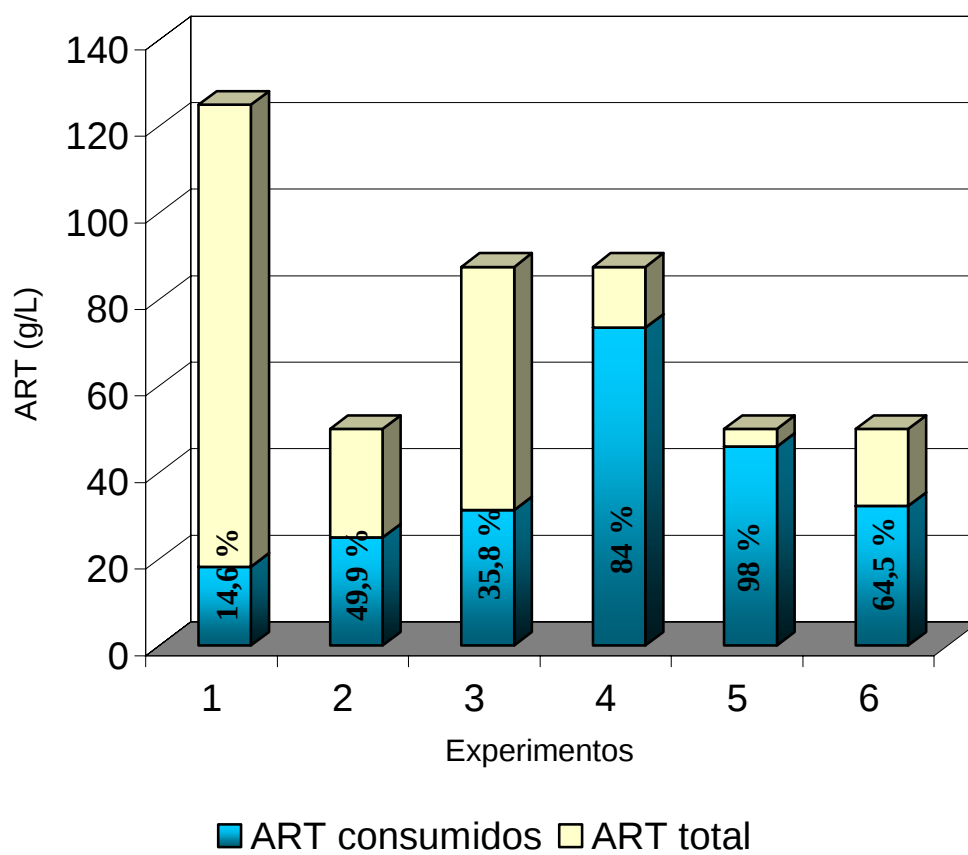


Figura 9.- Porcentaje del consumo de reductores en las variantes experimentales de la cinética anaerobia.

et al., 2004) y acorta la duración del proceso fermentativo. En nuestro estudio se utilizaron inóculos pequeños, por lo que esto pudiera ser un factor influyente en los resultados obtenidos.

3.2.2.1.- Determinación del tiempo de fermentación a partir del modelo cinético propuesto.

La producción de poligalacturonasa en *K. marxianus* está asociada al crecimiento con independencia de la temperatura de fermentación y de la concentración del sustrato. (Serrat, 2003). Su secreción comienza al inicio de la fase exponencial (Schwan, *et al.*, 1997) incrementándose la concentración de modo continuo hasta alcanzar su máximo valor hacia el inicio de la fase estacionaria, disminuyendo luego con el envejecimiento del cultivo. Por otra parte, el etanol es un metabolito primario, cuya producción está íntimamente relacionada con el crecimiento celular. Por ello, al garantizar un tiempo de fermentación adecuado, se garantiza un consumo máximo de sustrato, que se traduce en un máximo crecimiento y por tanto, en una máxima concentración de los productos finales. El tiempo óptimo de fermentación sería aquel para el cual el cultivo ha arribado, o se encuentra próximo, a la fase estacionaria de crecimiento (Serrat, 2003).

Teniendo en cuenta lo anterior, la data experimental (S,t) correspondiente a cada una de las variantes experimentales, se ajustó al modelo cinético descrito por la ecuación 8 (epígrafe 2.2.4.2 de la sección Materiales y Métodos), utilizándose para ello un algoritmo de regresión no lineal: En la **Tabla X** se presentan los valores correspondientes a los coeficientes de regresión y la varianza explicada por el modelo para cada una de las variantes experimentales ensayadas. El término independiente (a_5) no se incluye en la tabla por tratarse de la evaluación del modelo para el tiempo cero.

En la **Figura 10** se muestran los gráficos de correlación entre los tiempos predichos por el modelo y los tiempos reales observados, así como la ecuación de regresión, con su correspondiente valor de R^2 . En todos los casos los coeficientes de correlación no difieren significativamente de 1 y los coeficientes de determinación (R^2) se encuentran entre 0,71 y 0,88, con la excepción del experimento 3, donde $R^2 = 0,43$. Esto sugiere una validez aceptable del modelo para predecir los tiempos de fermentación en los ensayos de optimización. Por este motivo, el mismo fue utilizado en la estimación de los tiempos de fermentación para las diferentes variantes experimentales generadas por el Simplex.

Se debe destacar que, para tiempos largos de fermentación el modelo tiende sistemáticamente a predecir tiempos inferiores a los reales. En este sentido, algo muy importante a señalar es que en el diseño del modelo cinético no se tuvo en cuenta la muerte celular, fenómeno particularmente importante en condiciones de fermentación alcohólica. El etanol es inhibitorio a altas concentraciones y se sabe que esta levadura presenta una baja tolerancia al alcohol (Hack y Marchant, 1998). A medida que aumenta la concentración de etanol, la velocidad de crecimiento se reduce, por lo que el consumo de sustrato se enlentece y en la misma medida, la fermentación. Esto trae como resultado que el sustrato no se consuma en el tiempo calculado, sino que sea necesario un tiempo mayor para lograr un agotamiento del mismo. Otro aspecto no considerado es el posible agotamiento de algún nutriente esencial que lleve al cultivo a fase estacionaria

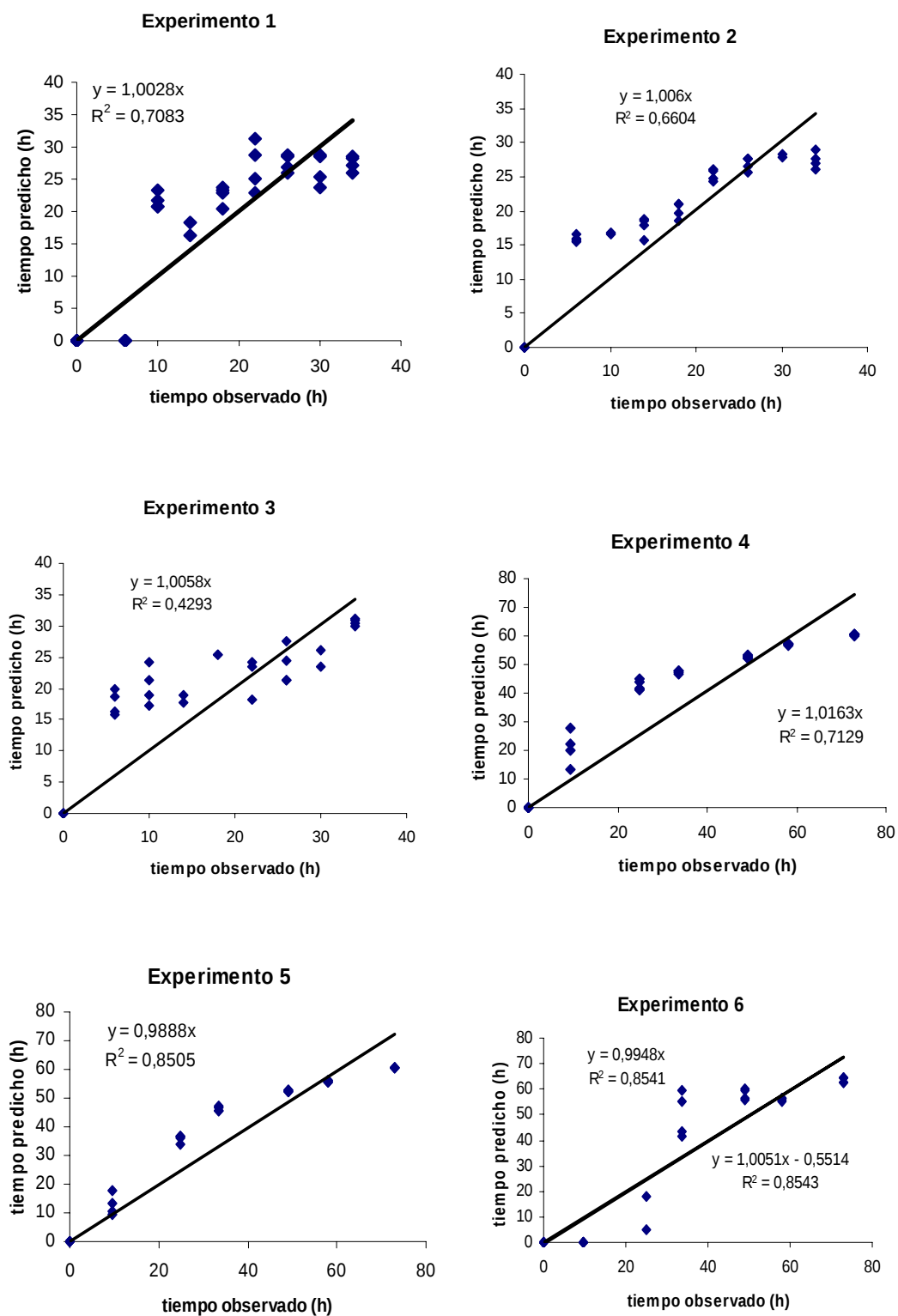


Figura 10.- Comparación entre los valores de tiempo predichos y los calculados para las diferentes variantes experimentales de la cinética microaerófila.

Tabla X.- Coeficientes de regresión y varianza explicada por el modelo cinético.

Experimento	Coeficientes de regresión				Varianza explicada (%)
	a_1	a_2	a_3	a_4	
1	2,10E-04	0,08	0,766	7,66	72,9
2	6,05E-04	0,09	1,45	6,67	79,5
3	2,36E-04	0,09	0,87	9,51	68,2
4	6,00E-04	0,095	1,019	10,192	81,3
5	1,20E-03	0,093	1,45	11,99	79,2
6	1,20E-03	0,095	1,45	12	44,1

Tabla XI.- Parámetros cinéticos estimados para la fermentación etanólica del jugo de caña.

Parámetro cinético	Experimento					
	1	2	3	4	5	6
K_s'	188,4	83,9	230,6	71,5	46,4	45
K_p	3,62	8,5	17,105	2,115	9,178	8,781
$\mu_{m\acute{a}x}$	-	0,50	0,22	0,15	0,35	0,28

No obstante, por los valores de R^2 obtenidos, se puede afirmar que el modelo cinético utilizado para predecir los tiempos de fermentación, se ajusta aceptablemente a la data experimental obtenida.

3.2.2.2.- Determinación de los parámetros cinéticos.

Se determinaron la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$), la constante de inhibición por sustrato (K'_s), y la constante de inhibición por producto (K_p), para cada uno de los experimentos que conformaron el estudio cinético en condiciones limitadas de oxígeno. Sus valores se muestran en la **Tabla XI**. Los valores de $\mu_{\text{máx}}$ se estimaron de las rectas de regresión de $f(s)$ vs. t , donde:

$$f(s) = a'_1 (S_0^2 - S^2) + a'_2 (S_0 - S) + a'_3 \ln (S_0/S) + a'_4 \ln X/X_0$$

siendo: $a'_i = a_i / (K'_s * K_p)$

La representación gráfica de $f(s)$ vs. t se muestra en la **Figura 11**.

Bajo condiciones de limitación de oxígeno la levadura mostró, en todos los casos, una velocidad específica máxima de crecimiento mucho menor que la obtenida en condiciones aerobias, resultado que era de esperar, pues, como características propias de esta especie se ha reportado la relativamente baja capacidad fermentativa. Los resultados de Serrat *et al.*, (2004), al estudiar la fermentación alcohólica en melazas de remolacha, confirman lo anterior, reportando un valor de $\mu_{\text{máx}}$ de $0,28 \text{ h}^{-1}$. Los valores obtenidos oscilan en un rango entre $0,15$ y $0,50 \text{ h}^{-1}$. Esta variación es lógica, debido a que este parámetro está influenciado tanto por el microorganismo utilizado como por las condiciones de cultivo, y aunque el microorganismo fue el mismo, las condiciones de cultivo variaron de un experimento a otro, en particular, en parámetros tan importantes como el pH y la temperatura. De forma general, se puede decir que la velocidad de crecimiento no fue alta, si se comparan estos valores con otros, como el de $0,6 \text{ h}^{-1}$ reportado por Hack y Marchant (1998) con una cepa de *K. marxianus* en glucosa. Debe tenerse en cuenta que la fuente de carbono usada en nuestro estudio fue la sacarosa, cuya asimilación requiere una previa inversión por la invertasa de la levadura. Los resultados sugieren que, probablemente, una de las causas de la inferior actividad fermentativa observada en esta cepa, se deba a la existencia de una pobre actividad sacarosa invertasa bajo las condiciones estudiadas.

La concentración inhibitoria de sustrato (K'_s) calculada estuvo en el orden de la concentración inicial utilizada para la fermentación, resultado que no descarta una posible inhibición de este tipo. En cuanto a los valores de la constante de inhibición por producto (K_p) obtenidos en estos experimentos, se deduce que la producción de bajas concentraciones de etanol, en estas condiciones, pudiera ejercer un efecto inhibitorio sobre la velocidad del crecimiento microbiano, lo que confirma la baja tolerancia al etanol de esta levadura. Aquí pudiera radicar el principal motivo de la relativa lentitud de estas fermentaciones.

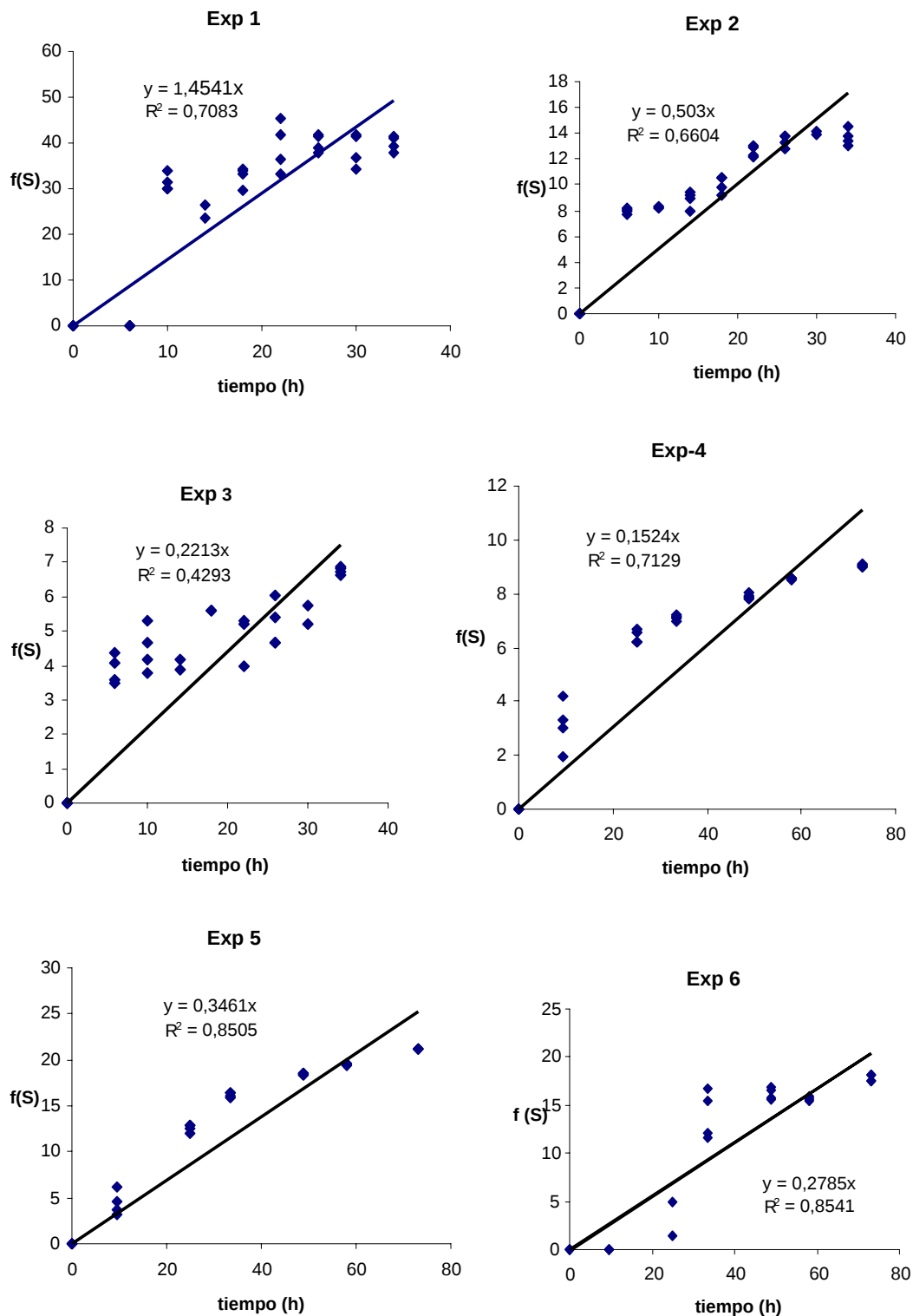


Figura 11.- Rectas de regresión para la estimación de la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de la levadura *K. marxianus* en jugo de caña en condiciones limitadas de oxígeno.

Los valores para K_s (constante de saturación) no se determinaron, porque generalmente son muy bajos, del orden de los mg/L, por lo que el error que se cometería en su estimación, pudiera ser considerablemente alto.

3.3.- Co-producción de etanol y endopoligalacturonasa por *K. marxianus* en jugo de caña.

Luego de 15 corridas se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla XII**. En ella se observa cómo a medida que se avanzó en la optimización de las condiciones fermentativas, se fueron alcanzando mejores resultados tanto para los acumulados de enzima como para la producción etanólica.

3.3.1.- Producción de etanol.

En la región óptima se alcanzó una concentración de etanol en el medio de 47,60 g/L y una productividad de 0,390 g/Lh. Similares valores fueron obtenidos con similares condiciones fermentativas en jugo de caña o melazas, tal es el caso de ^(a)Hack y Marchant (1998) que obtuvieron una concentración final de etanol de 40 g/L utilizando la cepa *K. marxianus* IMB3 en melazas, con una concentración de reductores de 100 g/L a 45 °C, Obregón y col. (2006) realizaron una optimización de un proceso de fermentación alcohólica utilizando jugos de caña energética con una concentración de reductores de 120 g/L, a 32-33 °C, con la cepa C/25-7-18 *Sacharomyces cerevisiae* tipo Hansen, con resultados del mismo orden, de igual forma, Limtong, *et al.*, (2007) lograron una productividad de 1,45 g/Lh y un rendimiento de 77,5 % utilizando la cepa *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-104 2 en jugo de caña, a 37 °C y un 22 % de azúcares totales.

Estos resultados, al igual que los obtenidos por De León-Rodríguez *et al.* (2008), en un estudio de optimización de la fermentación etanólica, indican que obtener de forma simultánea una alta producción y velocidad de producción del etanol, puede ser contradictorio, debido a que para lograr altos valores en la producción de etanol se necesitan altas concentraciones de sustrato lo cual puede inducir un efecto inhibitorio en la velocidad de crecimiento, afectándose así la productividad.

3.3.2.- Producción de enzima.

En el presente estudio se logró que en la región óptima, la levadura fue capaz de sintetizar 9,8 U/mL con una productividad de 0,08 U/mLh. Este resultado es muy similar, aunque superior, al obtenido por Serrat (2003) en melaza de remolacha, donde obtuvo una actividad enzimática de 9,1 U/mL, pero con una productividad mucho mayor (0,24 U/mLh).

Las condiciones, bajo las cuales se logró este resultado, son similares a otras reportadas en la literatura. Tal es el caso del estudio de optimización de la actividad pectinolítica realizado por Moyo *et al.* (2003), a pH 5, 32 °C y 91 horas de incubación. Por otra parte Bravo *et al.* (2000) obtuvieron máximas actividades en jugo de caña con pH 5,0, 28 °C y un tiempo de fermentación de 48 horas.

Tabla XII.- Valores de actividad enzimática, productividad etanólica y respuesta integrada obtenidos durante el proceso de optimización de la co-obtención de etanol y endopoligalacturonasa.

Experimento	Act. Enzimática (U/mL)	Etanol, productividad (g/Lh)	Respuesta integrada*
1	2,2 ± 1,1	0,253 ± 0,179	0,074
2	13,6 ± 0,8	0,166 ± 0,013	0,117
3	4 ± 0,1	0,252 ± 0,041	0,100
4	9,8 ± 1,2	0,214 ± 0,009	0,134
5	5,3 ± 1,2	0,359 ± 0,008	0,152
6	4,6 ± 0,7	0,226 ± 0,001	0,100
7	0,8 ± 0,3	0,209 ± 0,062	0,038
8	13,7 ± 0,6	0,177 ± 0,008	0,135
9	4,6 ± 0,7	0,380 ± 0,013	0,147
10	2,1 ± 0,4	0,444 ± 0,016	0,109
11	9,7 ± 0,3	0,220 ± 0,006	0,139
12	9,8 ± 1	0,390 ± 0,009	0,218
13	6,9 ± 1,2	0,335 ± 0,014	0,163
14	10 ± 1,1	0,265 ± 0,025	0,163
15	7,3 ± 0,9	0,344 ± 0,015	0,167

Nota: Los experimentos del 1 al 8 corresponden al primer Simplex

* Valor de la “membership function” generada por el Simplex

Se conoce que la máxima producción de poligalacturonasa ocurre cuando el cultivo se aproxima a la fase estacionaria del crecimiento y la densidad celular es elevada, y que además, es independiente de la temperatura y la concentración de sustrato (Serrat, 2003). Por lo tanto, aquellos factores que interfieran el crecimiento afectarán la producción enzimática de la levadura, tales como inhibidores del crecimiento y el envejecimiento del cultivo.

Anteriormente se hizo un análisis de la posibilidad de que el jugo de caña utilizado como sustrato de las fermentaciones, estuviera deficitario de algún nutriente esencial (vitaminas) para el crecimiento de la levadura, lo cual no puede ser descartado puesto que no se determinó el contenido de vitaminas en la caracterización realizada al sustrato. Esta pudiera ser causa del enlentecimiento del crecimiento microbiano. Un estudio realizado por Minussi *et al.* (1998) obtuvo que la utilización solamente de jugo de caña no indujo la producción de PG por el hongo *Penicillium griseoroseum*, lo contrario se obtuvo cuando el jugo de caña fue suplementado con extracto de levadura. Por su parte, Da Silva *et al.* (2005) reportan que no obtuvieron crecimiento de una cepa de *E. coli* en jugo de caña sin suplementar.

Otro factor que pudiera haber influido en estos resultados es el tiempo de duración de la fermentación. En estudios realizados sobre la producción de enzimas pectinolíticas en levaduras, se ha observado que largos períodos de cultivo disminuyen la actividad pectolítica. (Blanco *et al.* 1999). Resultados similares se han reportado en la obtención dichas enzimas en el hongo *Aspergillus fumigatus* MTCC 4163, alcanzándose un pico de actividad a los 2 días (Phutela *et al.* 2005), de igual forma Said *et al.* (1991) han reportado un máximo de actividad en *Penicillium frequentans* después de un cultivo de 48 horas, mientras que la actividad poligalacturonasa fue máxima al tercer día de incubación tal lo reportado por Hart *et al.* (1991) y Crotti *et al.* (1998) en *Rhizopus oryzae* y *Neurospora crassa*, respectivamente. En el caso de fermentaciones prolongadas, los aspectos relativos a la estabilidad de la enzima cobran particular relevancia.

3.3.3.- Condiciones óptimas para la co-producción de etanol y endopoligalacturonasa por *K. marxianus* en jugo de caña.

En la **Figura 12** se muestran los principales pasos de la secuencia de optimización.

A partir de la variante 13, el valor de la función “membership” (respuesta integrada) comenzó a mostrar valores similares (**Figura 13(b)**), indicando que el proceso de optimización había llegado a una región donde las respuestas no podían ser mejoradas, por lo que se determinó detenerlo. Si se hace una comparación con el comportamiento de esta respuesta en el simplex original, se observa lo antes dicho (**Figura 13(a)**).

De acuerdo a estos resultados se pudo concluir que para obtener una respuesta favorable en la coproducción de etanol y enzima endopoligalacturonasa en jugo de caña, se debían tener condiciones de fermentación cuyos parámetros estuvieran en el siguiente entorno:

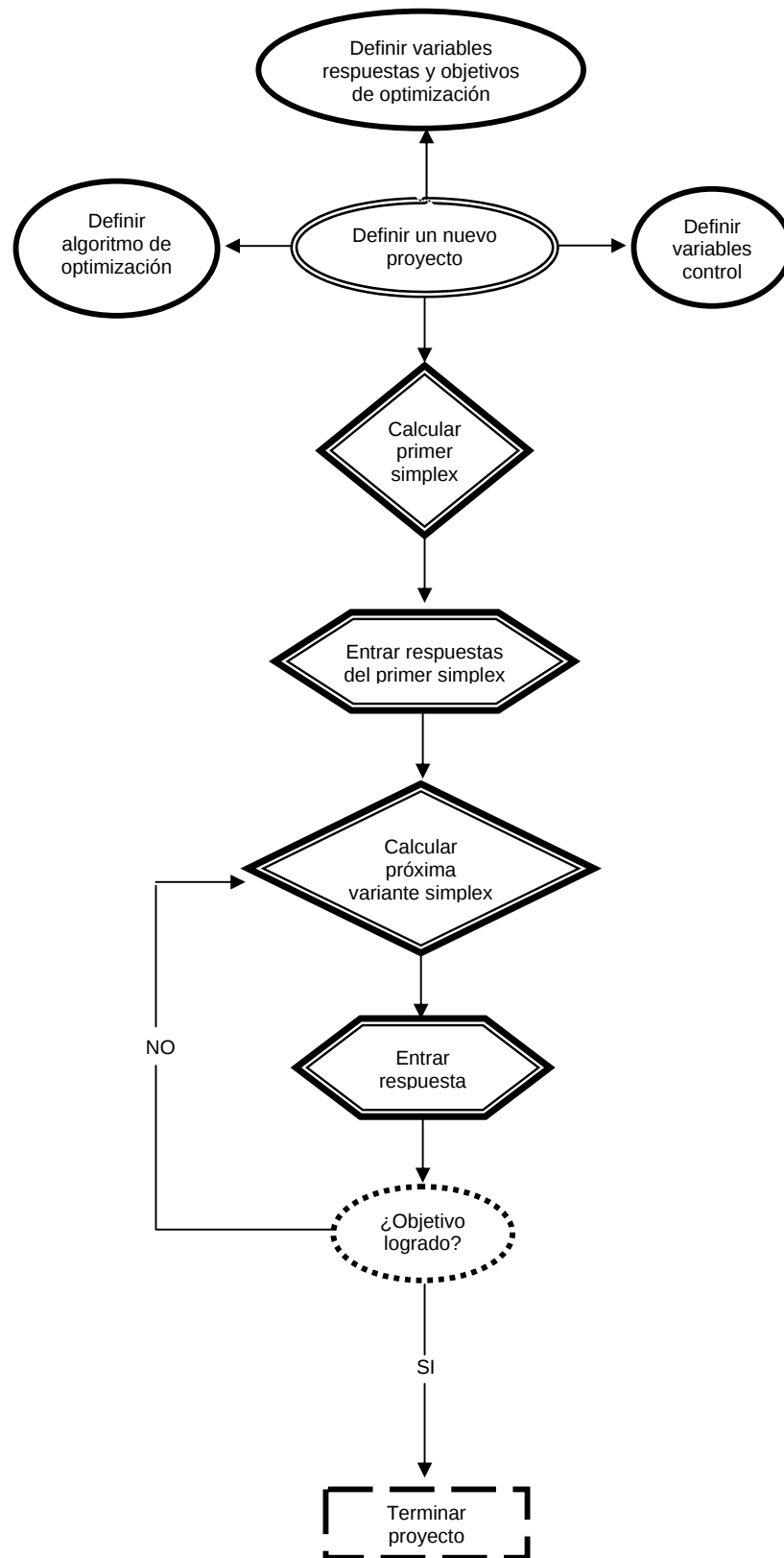
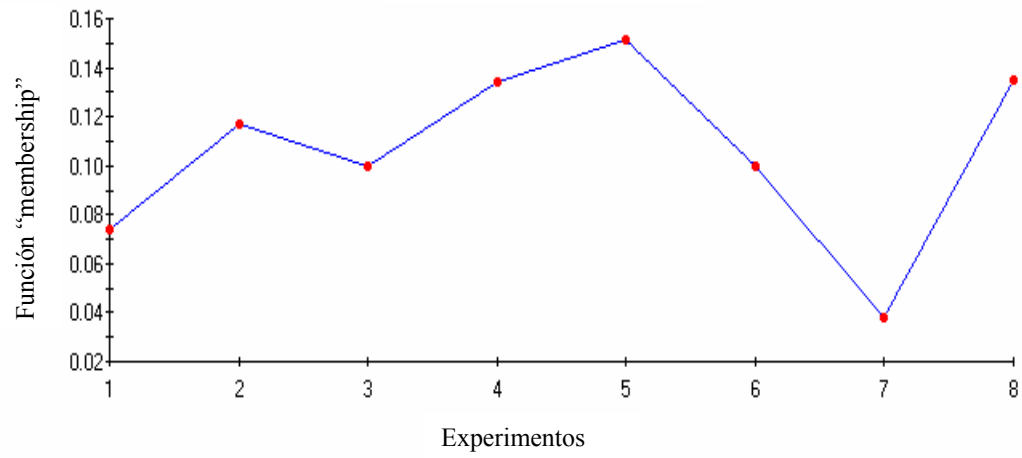


Figura 12.- Diagrama de flujo del proceso de optimización por el método Simplex

a)



b)

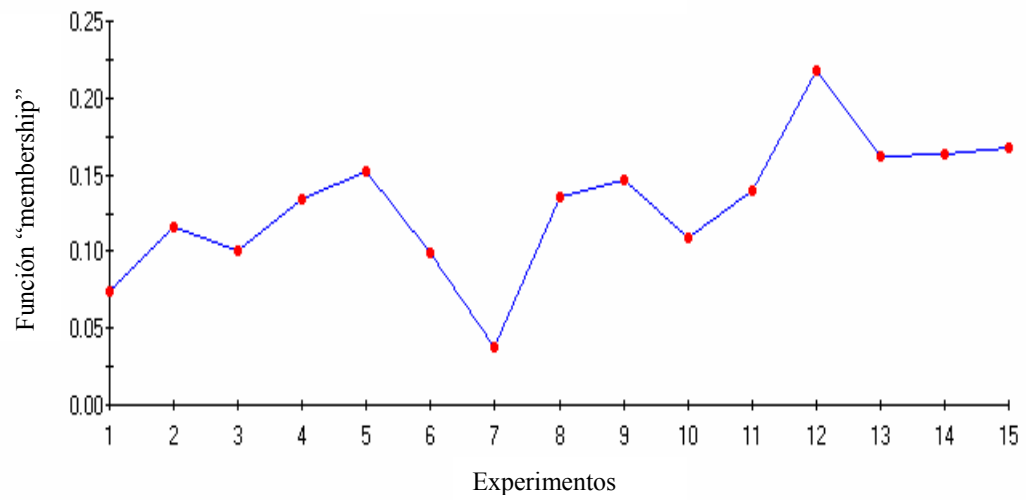


Figura 13.- Comportamiento del valor de la función "membership" a) en el primer simplex b) en el simplex optimizado.

ART = 125 g/L
[H⁺] = 24, 8 uM (pH 4,6)
T = 31°C
(NH₄)₂SO₄ = 2, 48 g/L
(NH₄)₂HPO₄ = 2, 73 g/L
CaCl₂ = 0, 33 g/L

MgSO₄.7H₂O = 0,54 g/L
Tiempo de fermentación = 122 horas

En la **Tabla XIII** se da un resumen de los parámetros productivos obtenidos bajo estas condiciones.

El rendimiento de biomasa es bajo, con respecto a otros valores reportados en la literatura, como el valor de 1,2 g/g obtenido por Ozmihi y Kargi, (2007) para la cepa *Kluyveromyces marxianus* DSMZ-7239, en una solución de suero y polvo de queso. Este resultado confirma que el crecimiento de esta levadura en jugo de caña está influenciado por las características propias del sustrato utilizado. Anteriormente se comentó la posible ausencia de algún nutriente esencial para el crecimiento celular que limitara su desarrollo en este medio. Por otra parte, la levadura necesita secretar la enzima invertasa necesaria para la hidrólisis de la sacarosa a sus unidades metabolizables (glucosa y fructosa), por ello no se puede descartar un fallo fisiológico de la cepa utilizada bajo las condiciones experimentales estudiadas. Lalue et al. (2004) plantean que la actividad invertasa de la levadura depende de la composición del medio y del tipo de cepa utilizada.

A pesar de obtenerse concentraciones de etanol y endoPG aceptables, la productividad volumétrica de ambos productos es baja, lo que corrobora el resultado anterior, ya que al estar asociados al crecimiento celular, su productividad se ve afectada. De esto se deduce que el cultivo creció bien pero de forma lenta, hecho que está reforzado por el valor de la eficiencia (82,5 %) del proceso fermentativo, el cual, aunque no es alto, es superior a otros valores reportados en la literatura, como el 77,5 % de eficiencia obtenido por Limtong et al., (2007) utilizando una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, en jugo de caña; Esto nos indica nuevamente que debemos pensar en la utilización de un inóculo mayor, para lograr la biomasa necesaria para que el proceso sea productivo. A similares conclusiones arribó Ozmihi y Kargi (2007) en su estudio de la cinética alcohólica en cultivo batch..

Se realizó un diseño experimental Plackett-Burman para identificar las variables que más influencia habían tenido en la respuesta conjunta de enzima y etanol (“función membership”), cuyo análisis estadístico arrojó como resultado que solamente un efecto, la concentración hidrogeniónica, era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (**Tabla XIV**) Para estimar la magnitud con la que contribuye a la varianza, se realizó un análisis de los componentes de la varianza, demostrándose que este factor contribuye con la máxima varianza ya que representa el 46,5 % del total de la variación en la respuesta conjunta.

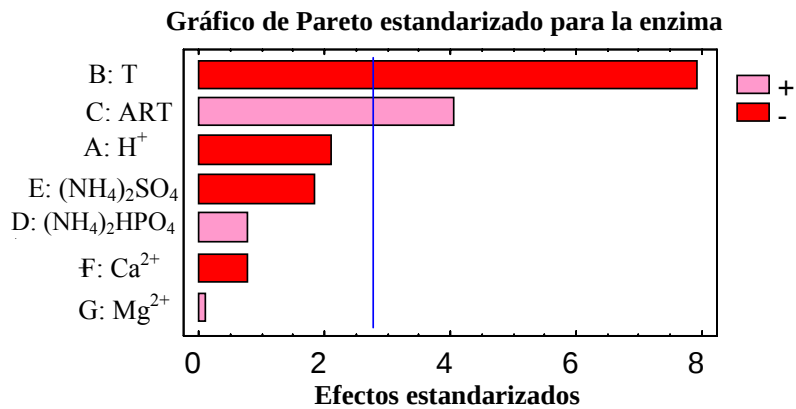
De acuerdo a estos resultados, el pH del medio de fermentación fue el parámetro de mayor influencia en ambas respuestas. Se trazaron las estimaciones en orden decreciente de importancia a través de un gráfico de Pareto, para las respuestas de etanol y PG por separado y para la respuesta conjunta (**Figura 14**), confirmándose que el efecto negativo del pH también estaba presente en ambos procesos por separado, aunque no fue la variable de mayor impacto en estos resultados.

Tabla XIII.- *Parámetros productivos y fisiológicos de la obtención de etanol y PG en el entorno optimizado.*

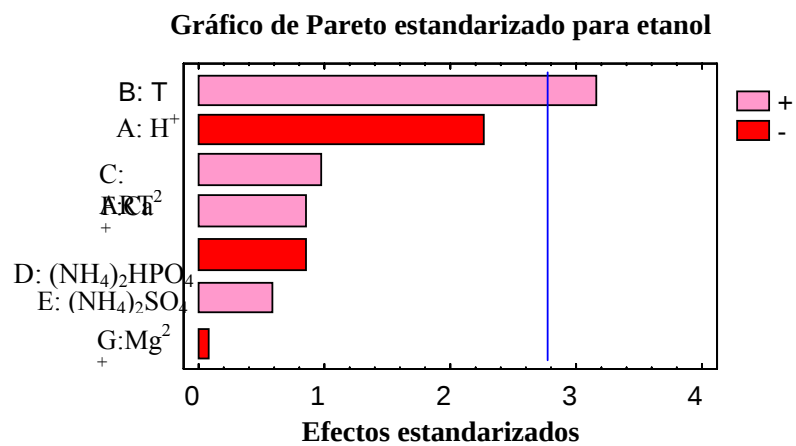
Parámetros	Región optimizada
Yx/s	0,02
Etanol (g/L)	47,60 ± 1,21
Q _{vol.} etanol (g/Lh)	0,390 ± 0,009
Eficiencia (%)	82,5 ± 2,1
A.E.(U/mL)	9,8 ± 1,0
Qvol. (U/mLh)	0,080 ± 0,01
Yp/x	5,537

Tabla XIV.- *Análisis de Varianza (ANOVA) para la respuesta integrada.*

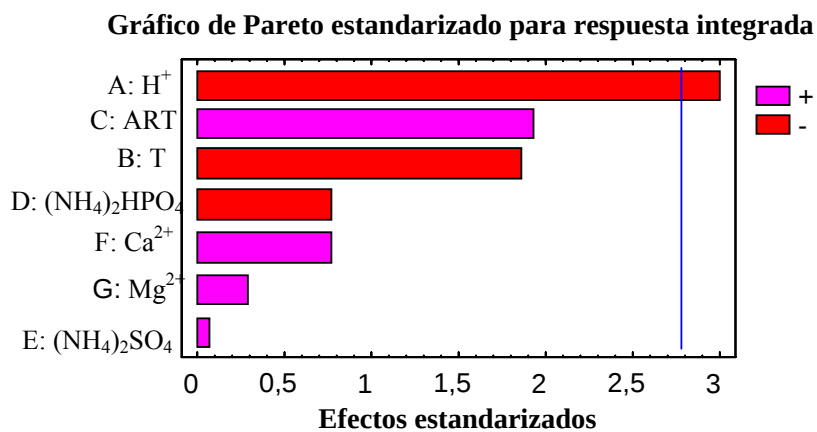
Parámetro	Error Estimación	Estadístico estándar	T	P-Valor
CONSTANTE	0,239292	0,10019	2,38838	0,0753
ART	0,00101778	0,000531064	1,91649	0,1278
Ca ²⁺	0,0303333	0,0398298	0,76157	0,4887
ion H⁺	-0,00388635	0,00130078	-2,98772	0,0404
Mg ²⁺	0,011	0,0398298	0,27617	0,7961
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-0,00606667	0,00796595	-0,76157	0,4887
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,000466667	0,00796595	0,05858	0,9561
T	-0,00368333	0,00199149	-1,84954	0,1381



a)



b)



c)

Figura 14.- Gráficos de Pareto para las respuestas a) producción de etanol, b) producción de enzima y c) producción conjunta etanol-enzima.

Todos los procesos biológicos están afectados por el pH, debido a que son catalizados por enzimas, que por su naturaleza son proteínas. La estructura terciaria de las proteínas es afectada por la concentración hidrogeniónica ya que los enlaces iónicos y covalentes; que son los responsables de mantener la estabilidad de esta estructura, son muy sensibles a las variaciones en las concentraciones de iones hidronio e hidroxilo.

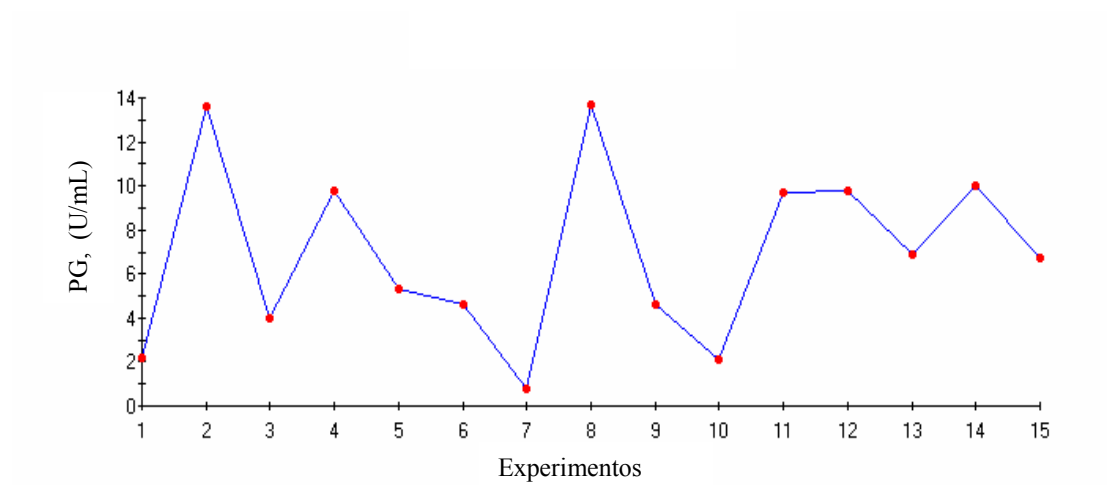
El pH tiene una influencia significativa en el proceso fermentativo debido a su efecto en el crecimiento de la levadura, la velocidad de la fermentación y la formación de productos. Por tanto el mantenimiento del pH es un parámetro importante a controlar durante la fermentación (Pramanik, 2003).

No existen muchas investigaciones que profundicen en el efecto del pH en el proceso de fermentación etanólica, no obstante se han realizado estudios en este sentido. Yadav *et al* (1997) obtuvieron valores incrementados de concentración de alcohol, productividad y eficiencia con valores de pH entre 4,0-5,0 y encontraron además que el rango de pH óptimo para la cepa *S. cerevisiae* HAU-1 estaba entre 4,5-5,0.

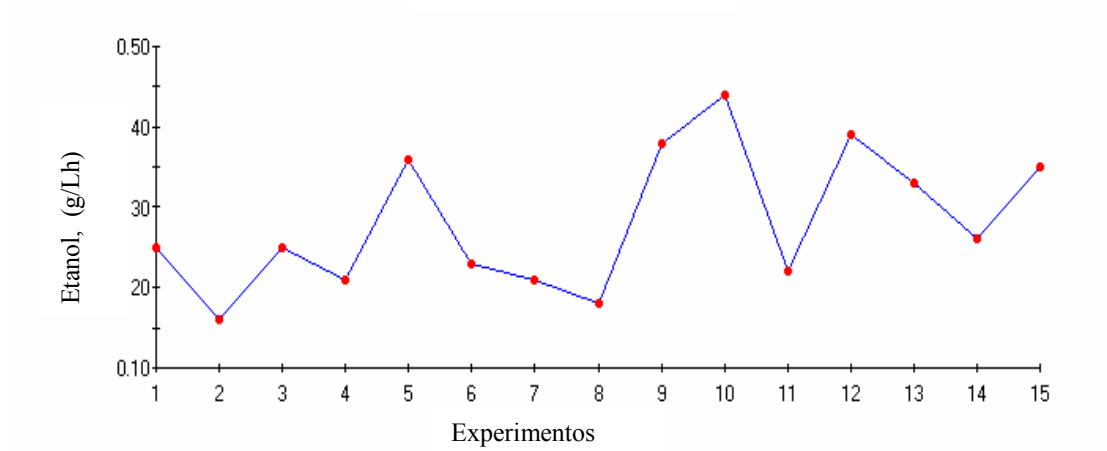
En un estudio realizado por Abrahão-Neto y col (1997) sobre la influencia de factores externos en el metabolismo fermentativo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que las variaciones en el pH podían influir alterando el comportamiento de enzimas tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la invertasa, ambas participantes en el crecimiento de la levadura. En el caso de esta última, se cree que los cambios en el pH, pudieran alterar la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína, provocando una inadecuada inserción de la macromolécula en la pared celular, durante su excreción.

Como se puede observar en el comportamiento de las respuestas (actividad enzimática y productividad volumétrica de etanol) por separado, obtenidas durante el curso de la optimización, (**Tabla XII** y **Figura 15**) el entorno óptimo para la producción conjunta de etanol y endopoligalacturonasa en jugo de caña, no es el más favorable para ninguno de los dos productos por separado. De hecho, ambas respuestas se contraponen en cuanto a algunas de las condiciones fermentativas. Por lo que es de esperar que los parámetros productivos tampoco tengan valores elevados, como los que caracterizan a ambos procesos por separado. En todo caso, en un proceso productivo que persiga la diversificación de la producción, debe buscarse una solución de compromiso, siempre que sea técnica y económicamente viable.

Se conoce que la principal desventaja de la producción de pectinasas de levaduras, es el bajo nivel productivo obtenido por fermentación batch. (Blanco *et al.*, 1999). Por otra parte, la fermentación de etanol, utilizando las técnicas de cultivo discontinuo, tiene una productividad limitada por dos factores: inhibición por etanol e inadecuada concentración celular (ICIDCA, 1986). Se conoce además que la velocidad de utilización del azúcar y la formación de etanol, se incrementan linealmente con un incremento de la concentración inicial de biomasa (Ozmihci y Kargi, 2007).



a)



b)

Figura 15.- Comportamiento de las respuestas por separado durante el curso de la optimización a) Actividad enzimática b) Productividad volumétrica de etanol.

Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos en esta investigación, se pudiera pensar en la utilización de cultivos continuos de alta densidad celular (Pérez y col., 2004), la cual se logra con células inmovilizadas. Las condiciones anaerobias se obtienen al estar las células de la levadura atrapadas en el interior del reactor o en la superficie de materiales poliméricos (Almeida, *et al.*, 2003). Esta tecnología combina muchas ventajas para ambos productos, pudiendo realizarse a altas velocidades de dilución sin riesgo de lavado del sistema, el tiempo de fermentación se reduce y la eficiencia aumenta. De igual forma, la inhibición por producto final resulta eliminada o reducida, ya que el alcohol es constantemente removido. Se ha llegado a obtener valores hasta de 100 g/Lh. Resultados similares (Ikonomopoulou *et al.*, 2003; Athanasiadis *et al.*, 2001) se han obtenido en la producción continua de pectinasas, donde los valores de productividades obtenidos para las poligalacturonasas son 10 veces superiores que los obtenidos en un cultivo batch.

Conclusiones y Recomendaciones

CONCLUSIONES

- ✓ La clarificación del jugo de caña de azúcar con $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ a 80 °C permitió la remoción de proteínas e iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , y la conservación del contenido de azúcares del jugo.
- ✓ El estudio cinético del crecimiento de esta levadura, bajo condiciones aerobias, en el sustrato mencionado, permitió determinar el tiempo óptimo para la preparación del inóculo a utilizar en la producción conjunta de poligalacturonasa y etanol.
- ✓ La aplicación del modelo de Monod ampliado, considerando las inhibiciones por producto y por sustrato, resulta válido para el estudio de la fermentación alcohólica del jugo de caña por *Kluyveromyces marxianus*, y posibilita la predicción de los tiempos de fermentación en función del sustrato consumido de manera aceptable.
- ✓ Se establecieron las condiciones fermentativas óptimas para la producción simultánea de poligalacturonasa y etanol a partir de jugo de caña por la levadura *Kluyveromyces marxianus*, lográndose un acumulado de 9,8 U/mL de actividad endopoligalacturonasa y una productividad volumétrica de 0,39 g/Lh para el etanol, con una eficiencia en el proceso del 82,5%. Se encontró que el pH es el factor de mayor incidencia en este proceso fermentativo.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un proceso de optimización teniendo en cuenta los resultados obtenidos del análisis del diseño Placket-Burman.
- ✓ Estudiar este proceso fermentativo en condiciones de cultivo continuo.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

1. Abalos, A., (2001). "Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT 10 aplicando la Metodología de Superficie Respuesta. Caracterización y aplicación del producto". **Tesis de Doctorado**, Manresa, M.A. y Bastida, J. (Tutores). Universidad de Barcelona, España.
2. Abrahao-Neto, J.; Infanti, P.; Vitolo, M., (1997) "Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*." **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 14 (1).
3. Alebeek, GJWM; Van Scherpenzeel K.; Beldman G.; Schols H.A.; Voragen, A.G.J., (2003) "Partially esterified oligogalacturónidos are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*". **Biochemistry Journal** 372, 211-218.
4. Alexéiev, V. (1976) Análisis Cuantitativo. Editorial Mir Moscú. pag 347-351
5. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J. L., (1998) "Industrial applications of pectic enzymes: a review" **Process Biochemistry**, 33, (1), 21-28.
6. Almazán, O.; Klibansky, M.; Otero, M., (1982) "Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera". ICIDCA. Editorial Científico-Técnica. Cuba.
7. Almeida, C.; Brányik, T.; Moradas-Ferreira, P.; Teixeira, J. (2005) "Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain". **Process Biochemistry** 40 1937-1942.
8. Almeida, C.; Brányik, T.; Moradas-Ferreira, P.; Teixeira, J. (2003) "Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96 (6), 513-518.
9. Armand, S.; Wagnaker, M.; Sánchez-Torres, P.; Kester, H.; Van Santen, Y.; Dijkstra, B.; Visser, J.; Benen, J.(2000) **Boil. Chemistry** 275, 691-696.
10. Athanasiadis, I.; Boskou, D.; Kanellaki, M.; Koutinas, A., (2001) "Effect of carbohydrate substrate on fermentation by kefir yeast supported on delignified cellulosic materials" **Journal Agricultural Food Chemistry**, 49, 658-663.
11. Atkinson, B.; Mavituna, F., (1983) Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Macmillan Publishers Ltd. England. Cap. 5, 397-405
12. Bajpai, P.; Margaritis, A., (1982) "Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke juice". **Applied and Enviromental Microbiology**, 44 (6), 1325-1329.

13. Banat, I.; Marchant, D. (1995) "Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant fermentative yeast strains". **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 11, 304-306.
14. Beldman, G.; Rombouts, F.M.; Voragen, A.G.J.; Pilnik, W. (1984) "Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass". **Enzyme Microbiology Technology** 6, 503-507.
15. Benen, J.A.; Kester, H.C.; Visser, J., (1999) "Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N 400 endopolygalacturonases I, II and C" **European Journal Biochemistry**, 259, 577-585.
16. Bergey, D.R.; Orozco-Cárdenas, M.; De Moura, D.S.; Ryan, C.A., (1999) "A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves", **Process Natl. Academy Science USA**, 96, 1756-1760.
17. Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T.G. (1999) "Production of pectic enzymes in yeast" **FEMS Microbiology Letters** 175, 1-9.
18. Bravo, C.E.; De Carvalho, E.; Schwan, F.; Gómez, R.; Pilon, L., (2000) "Determination of suitable conditions for polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*", **Cienc. Agrotec.**, 24, 137-152
19. Brock, D.T.; Madigan, T.M., (1991) *Biology of Microorganisms*, 6ta ed., t. II, Prentice- Hall International, Inc, 372.
20. Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M. (1993) "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth". **Plant Journal**. 3, 1-30.
21. Cavaco-Paulo, A. (1998) "Processing textile fibers with enzymes: an overview" En:Eriksson K., Cavaco-Paulo, A (eds) **Enzyme applications in fibers processing**. Cap. 15 ACS Symposium Series 687. American Chemical Society, Washington, D.C. 180-189.
22. Chatterjee, A.; Cui, Y.; Liu, Y.; Dumenyo, C.K. (1995) "Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-hoserine lactone" **Applied Environmental Microbiology**, 61, 1959-1967.
23. Claassen, P.; Van Lier, J.; López Contreras, A.; Van Niel, E.; Sijtsma, L.; Stams, S.; De Vries, S.; Weusthuis, R., (1999) "Utilisation of biomass for the supply of energy carriers" **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52, 741-755.
24. Conway, J. (1947) "Microdiffusion analysis volumetric error". Crosby Lockwood, London.

25. Crotti, L.B.; Terenzi, T.H.F.; Jorge, J.A.; Polizeli, M. (1998) "Characterization of galactose induced extracellular and intracellular pectolytic activities from the exo-1 mutant strain of *Neurospora crassa*". **Journal Microbiology and Biotechnology**, 20, 238-243.
26. Crueger, W.; and Crueger, A. (1993) *Biotecnología. Manual De Microbiología Industrial*. Editorial Acribia. España. Cap. 7, 141-145.
27. Da Silva, G.; De Araujo, E; Silva, D.; Guimaraes, W. (2005) "Ethanol fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2" **Brazilian Journal of Microbiology**, 36, 395-404.
28. De León-Rodríguez, A.; Escalante-Minakata, P.; Barba de la Rosa, A.; Blaschek, H., (2008) "Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology" **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 47 (1), 76-82.
29. De Vries, R.P.; Visser, J. (2001) "*Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides". **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 65 (4), 497-522.
30. Ertola, R. (1997) "Microbiología Industrial" Cap. 5, 43-53.
31. Gamarra, G.; Ballena, J.C.; Woolcott-Hurtado, J., (2000) "Optimización de las condiciones fermentativas para la producción y extracción de β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus*". **Revista Peruana de Química e Ingeniería Química**, 3 (1).
32. Ghaly, A.E.; El-Taweel, A., (1997) "Kinetic Modelling Of Continuous Production Of Ethanol From Cheese Whey". **Biomass and Bioenergy**, 12 (6), 461-472.
33. Graciano, F.; Karoly, A.; Heinzle, E.; Wittmann, C., (2007) "Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source" **FEMS Yeast Research**, 7 (3), 422-435..
34. ^(a)Hack, C.J.; Marchant, R., (1998) "Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process." **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 20, 323-327.
35. Hack, C.J.; Marchant, R., (1998) "Ethanol adaptation in a termotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3", **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 20, 227-231.

36. Hart, H.E.; Parish, M.E.; Burns, J.R.; Wicker, L. (1991) "Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*", **Journal Food Science**, 56, 480-483.
37. ICIDCA (1986) La Industria De Los Derivados De La Caña De Azúcar.. Editorial Científico-Técnica. Cuba. Cap. XII, 341-349.
38. ICIDCA (2000) Manual De Los Derivados De La Caña De Azúcar. Tercera Edición. Cuba. Cap. 4, 198-336.
39. Ikonomopoulou, M.; Kanellaki, M.; Soupioni, M.; Koutinas, A., (2003) "Effect of freeze-dried immobilized cells on delignified cellulosic material in low-temperature and ambient-temperature wine making." **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 104, 23-36.
40. Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (1996) "Manual de Métodos Analíticos para el Control Unificado. Azúcar Crudo". La Habana. Cuba.
41. Jacob, N.; Prema, P. (2006) "Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*" Pectinases from Actinomycetes, **Food Technology and Biotechnology** (44) 2, 263-267.
42. Jay, J.M. (1994) Microbiología Moderna De Los Alimentos, 3ra ed., Acribia, S.A., Zaragoza, España,,: 36-39.
43. Jayani, R.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005) "Microbial pectinolytic enzymes: A review" **Process Biochemistry**, 40, 2931-2944.
44. Kaur, I; Chopra K.; Saini, A., (2002). "Probiotics: Potential pharmaceutical applications". **European. Journal. Pharmaceuthical. Science** 15,1-9
45. Klibansky, M.; González, L.; Plaza, A.; Rodríguez, M.; Verdecia, O. (1985), "Evaluación de diferentes métodos de tratamiento de jugo de caña para la producción de alcohol". Revista ICIDCA, XIX (3), 1-5.
46. Kumura, H.; Tanoue, Y.; Tsukahara, M.; Tanaka, T.; Shimazaki, K., (2004) "Screening of dairy yeast strain for probiotic applications". **American Dairy Science Association**, 87, 4050-4056.
47. Lalluce, C.; Palmieri, M.; Lopes da Cruz, R.,(2004) "Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* al high temperatures and high cell densities." **Biotechnology and Bioengineering**, 37 (6), 528-536.
48. Lang, C.; Dörnenburg, H., (2000) "Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases", **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53, 366-375.

49. Limtong, S.; Sringiew, Ch.; Yongmanitchai, W., (2007) "Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*". **Bioresource Technology**, 98 (17), 3367-74.
50. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.; Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with foling-phenol reagent". **Journal of Biology and Chemistry**.193, 265-275.
51. Minussi, R.; Soares-Ramos, J.; Coelho, L.; Cavalcante, J.; Silva, D., (1998) "Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*", *Rev. Microbiología*, 29 (4)
52. Moat, A.; Foster, J.; Spector, M. (2002) *Microbial Physiology*. Fourth edition Cap.18, 582-612.
53. Moyo, S.; Gashe, B. A.; Collison, E. K.; Mpuchane, S. (2003) "Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology". **International Journal of Food Microbiology**. 85, (1-2), 87-100.
54. Nelson, N.J.(1957). "Colorimetric analysis of sugars". **Methods of Enzymology**. 3, 85-86.
55. Obregón, J.; Hernández, R.; Sebrango, C.; Curbelo, I. (2006) "Fermentación alcohólica: optimización mediante el modelo biológico vivo y el sustrato jugos de caña energética conservado". **Rev. Centro Azúcar**, 1, 59-63.
56. Ouwehand, A.; Salminen, C.; Isolauri, E. (2002), "Probiotics: An overview of beneficial effects". *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279–289.
57. Ozmihci, S.; Kargi, F., (2007) "Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations." **Bioresource Technology**, 98 (16), 2978-2984.
58. Pérez, B.; Ospina, S.; Godoy, R., (2004) "Cultivos de alta densidad celular por retención interna: aplicación a la fermentación continua de etanol". **Revista Colombiana de Biotecnología**, 6 (2), 25–30.
59. Pereira, M.; Schwan, R.; Teixeira, J., (1999) "Isolation, screening and characterization of flocculating and pectinase producing *Kluyveromyces* strains", **Food Technology and Biotechnology**, 37 (4), 257-261.
60. Phutela, U.; Dhuna, V.; Sandhu, S.; Chadha, B., (2005) "Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels." **Brazilian Journal of Microbiology**, 36, 63-69.

61. Pramanik, K. (2003) "Parametric studies on batch alcohol fermentation using *Saccharomyces* yeast extracted from toddy." **Journal Chin. Institute of Chemical Engineering**, 34 (4), 487-492.
62. Ross, J.M.; Saura, D.; Coll, L.; Laencina, J. (1992) "Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectolíticas" **Alimentación, Equipos y Tecnologías**. 149-154.
63. Sadae-Tano, M.; Batista, B., (2003) "Effect of the presence of initial ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*", **Brazilian Journal of Microbiology**, 34 (3)
64. Said, S.; Fonseca, M.J.V.; Siersera, V. (1991) "Pectinase production by *Penicillium frequentans*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 7, 607-608.
65. Schwan, R.; Cooper, R.; Wheals, A. (1997) "Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast." **Enzyme and Microbial Technology**, 21 (4), 234-244.
66. Serrat, M., (2003). "Producción, purificación y caracterización de la poligalacturonasa de una cepa de levadura aislada de residuales del beneficio húmedo del café". **Tesis de Doctorado**, Bermúdez, R.C. y Villa, T.G. (Tutores). Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, 2003.
67. Serrat, M.; Bermúdez, R.C.; Villa, T.G., (2004) "Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*. Potential use of polygalacturonase in foodstuffs" **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 117, págs. 49-64.
68. Serrat, M.; Bermúdez, R.C.; Villa, T.G., (2002) "Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 97, 193-208.
69. Shevchik, V.E.; Condermine, G.; Hugouvieux-Cottepattat, N.; Robert-Baudouy, J., (1996) "Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia crysanthemae* 3937" **Molecular Microbiology**, 19, 455- 466.
70. Singh, S.A.; Rao, A.G. (2002) "A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*" **Biotechnology Applied Biochemistry** 35, 115-123.
71. Skowronek, M.; Fiedurek, J., (2004) "Optimisation of inulinase production by *Aspergillus niger* using Simplex and Classical method." **Food Technology Biotechnology**, 42 (3), 141-146.

72. Somogyi, M. (1952) "Notes of sugar determination". **Journal of Biology and Chemistry**. 159, 19-23.
73. Spencer-Meade (1967), Manual del Azúcar de Caña. Edición Revolucionaria. La Habana. Cap. 3, 25.
74. Strauss, M.L.; Jolly, N.P.; Lambrechts, M.G.; Van Rensburg, P. (2001) "Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts", **Journal of Applied Microbiology**, 91, 182-190.
75. Tuohy, K.; Probert, H.; Smejkal, M.; Gibson, G. (2003). "Using probiotics and prebiotics to improve gut health." **Drug Discovery. Today** 8, 692-700.
76. User's guide to MultiSimplex 2.1 (2000).
77. Vega, J., Navarro, A., Clausen, E., Gaddy, J. (2004) "Effect of inoculum size on ethanol inhibition modelling and other fermentation parameters". **Biotechnology and Bioengineering**, 29 (5), 633-638.
78. Vilanova, M.; Blanco, P.; Cortés, S.; Castro, M.; Villa, T.G.; Sieiro, C., (2000) "Use of a PGU1 recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations", **Journal of Applied Microbiology**, 89, 876-883.
79. Vogel, H.; Todar, C. (1997) Fermentation and Biochemical Engineering Handbook. Principles, Process Design, and Equipment. Second Edition. Noyes Publications. USA. Cap 3, 122-159.

ANEXOS

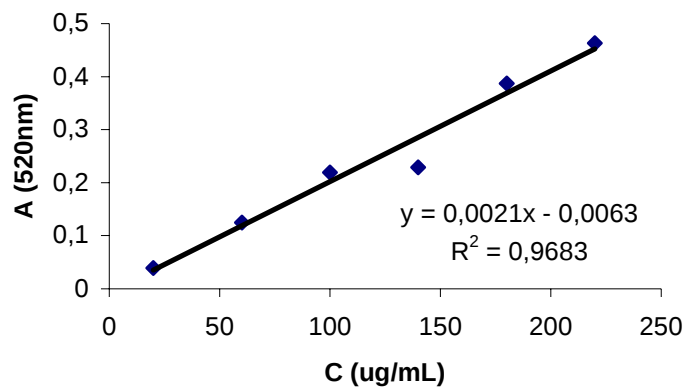


Figura A.- Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson.

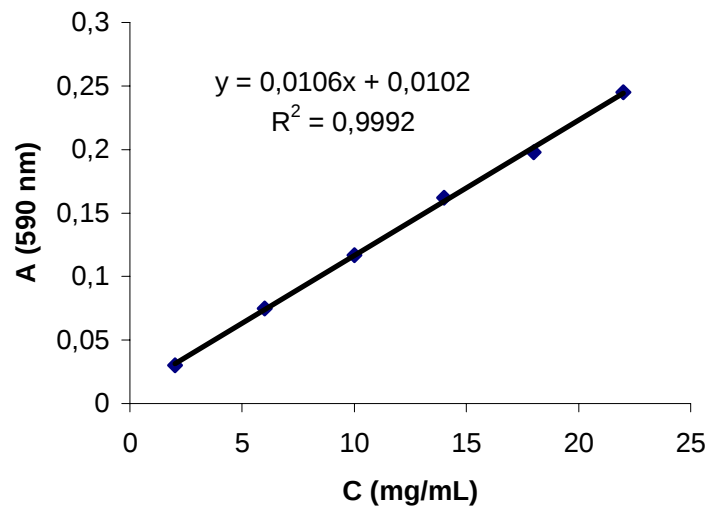


Figura B.- Curva de calibración para la determinación de alcohol por el método de Conway.

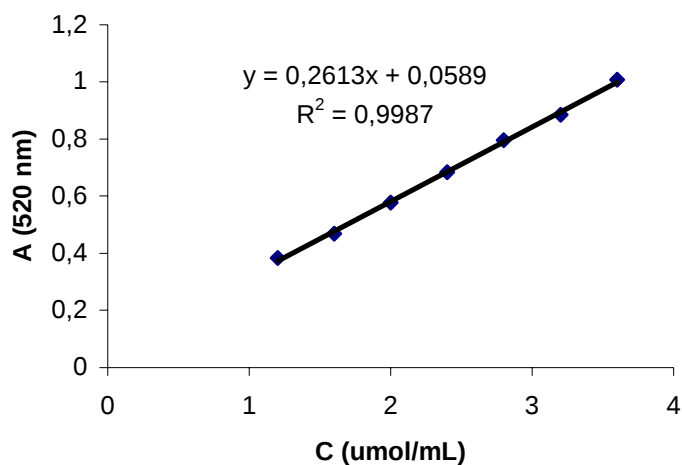


Figura C.- Curva de calibración de ácido galacturónico para la determinación de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson.

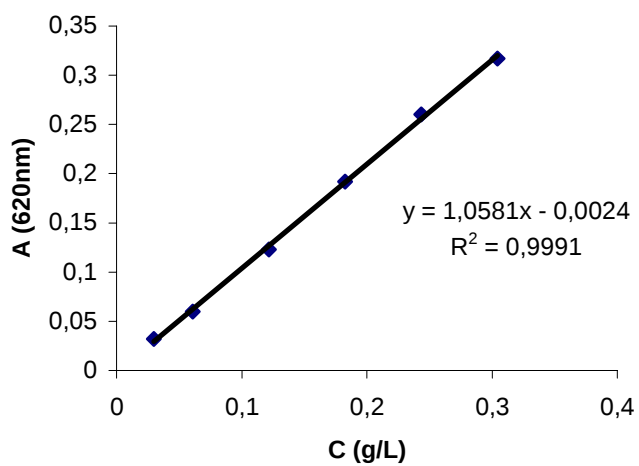


Figura D.- Curva de calibración para la determinación de biomasa por el método espectrofotométrico.

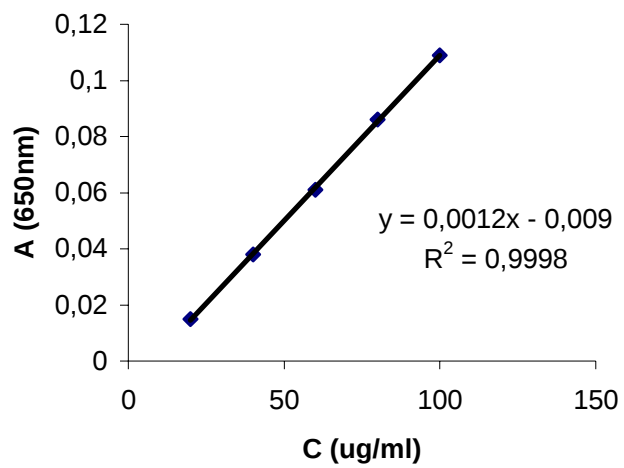


Figura E.- Curva de calibración de BSA para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry.