

Producción de biomasa y bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* en sistemas lote y lote alimentado

Ramírez Castillo M. L.^{1*}, Guerrero Reyes J.¹, Hernández Díaz A.¹, Valdez Castro L.¹, Arana Cuenca A.²

¹Universidad Politécnica de Puebla, Tercer Carril del Ejido “Serrano” S/N, San Mateo Cuanalá, CP 72640, Juan C. Bonilla, Puebla, México

²Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca-Ciudad Sahagún Km 20, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, Zempoala Hidalgo 43830 México.
e-mail: letyram@unam.mx

Resumen. Este trabajo muestra el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en biorreactor en los sistemas de cultivo lote y lote alimentado en forma lineal. Se siguió la cinética de fermentación midiendo los parámetros de operación (temperatura, pH, oxígeno disuelto y agitación) además de la biomasa y la producción de etanol al final del cultivo.

Palabras clave – levadura, cultivo lote, cultivo alimentado, bioetanol.

1. Introducción

Las investigaciones para la producción de bioetanol se han incrementado con las crisis energética y ambiental que se presentan a nivel mundial. Anteriormente, el etanol como combustible era obtenido por fermentación de glucosa de maíz en los EUA y de sacarosa de azúcar de caña en Brasil. La producción mundial de bioetanol alcanzó en el 2006 alrededor de 51 billones de litros, 17 billones fueron producidos por Brasil y 18 billones por EUA [1]. Actualmente se desarrolla la tecnología para obtener azúcares fermentables y producir bioetanol a partir de residuos sólidos orgánicos de origen urbano [2] o agrícola como los provenientes de frutas, soya, arroz, tubérculos, mezquite [1,3,4,5,6,7]. También se han tratado residuos celulósicos integrando la hidrólisis o sacarificación a la fermentación [8,9,10]. Los microorganismos que se han utilizado para llevar a cabo la fermentación alcohólica son principalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces marxianus*, bacterias como *Zymomonas mobilis* [1,7,11,12] e incluso cultivos mixtos [3].

Sin embargo, para mejorar la producción de bioetanol (o de cualquier producto de interés) por fermentación no basta con controlar las variables de operación (pH, temperatura, etc.) u optimizar el medio de cultivo, también depende del sistema de cultivo utilizado o modo de operar el biorreactor.

Las fermentaciones clásicas que se han llevado a cabo, tanto a nivel laboratorio como industrial, para la producción de bioetanol son en sistema lote o batch; este tipo de cultivo presenta una baja productividad por la limitación de sustrato [1,3,7,13]. Se ha estudiado su producción en cultivo continuo pero a nivel industrial es escasamente utilizado, debido a que los costos de inversión son mayores, a pesar de presentar mayor productividad [11,14]. El cultivo lote alimentado o fed-batch es una mejor alternativa que conjuga las ventajas de los cultivos lote y continuo permitiendo el aumento de la productividad del proceso y no requiere gran inversión. En este sistema se alimentan continuamente nutrientes hasta alcanzar un determinado volumen, así controlando la entrada de sustrato se puede controlar la velocidad de crecimiento y de producción [15,16]. Pirt defiende que él fue el que introdujo el término “fed-batch” en 1973, para referirse a un cultivo batch alimentado continuamente con medio nutriente, desarrolla la teoría y demuestra que este cultivo tiene aplicaciones importantes en el control de las fermentaciones [17].

En el estudio de las fermentaciones, se plantean modelos matemáticos en base a los resultados experimentales, para simular y prever el comportamiento del microorganismo bajo condiciones dadas; así se evita el gasto excesivo de material y se realizan los experimentos necesarios para verificar los resultados. La simulación de los sistemas de cultivo se basa en los puntos siguientes:

- Ecuaciones de balance de masa para biomasa, sustrato y producto
- Modelos de crecimiento, consumo de sustrato y producción
- Condiciones de operación.

La Ecuación General de Balance de Masa se observa en la Ec. (1) y su ecuación diferencial en la Ec. (2), son válidas para todos los sistemas de cultivo (lote, continuo, alimentado) y dependiendo

de la variable (biomasa, sustrato y producto) serán los términos de las ecuaciones diferenciales.

$$\text{Entrada} - \text{Acumulación} = \text{Generación} - \text{Consumo} \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\frac{dM}{dt} = M_e - M_s + R_G - R_C \quad \text{Ec. (2)}$$

La bibliografía permite desarrollar las ecuaciones para cada tipo de cultivo, revisar los principios de modelado y obtener la solución de las ecuaciones diferenciales para realizar la simulación [13,14,16,18,19,20].

1.1 Cultivo lote

Es el modo de operación más simple y más utilizado en la industria por la baja inversión que requiere al no necesitar dispositivos adicionales al biorreactor normal. Es el menos productivo por la limitación de nutrientes con el tiempo al aumentar el crecimiento y no se puede controlar la velocidad de crecimiento. En la Figura 1 se muestra un esquema general del cultivo y su comportamiento cinético de las variables, visto como caja negra no hay entradas ni salidas y el volumen permanece constante.

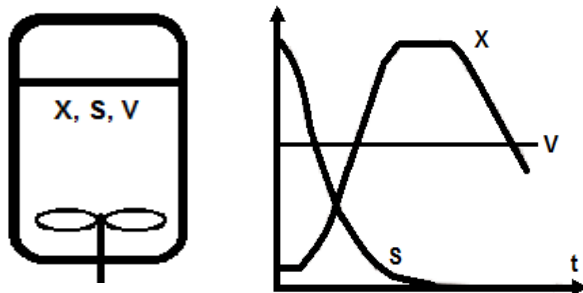


Figura 1 Representación de cultivo lote, esquema general y cinética del cultivo.

Las Ecs. (3-5) describen este modo de operación para biomasa (x), sustrato (s) y producto (p).

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\frac{ds}{dt} = -q_s x = -\frac{\mu x}{Y_{xs}} \quad \text{Ec. (4)}$$

$$\frac{dp}{dt} = q_p x \quad \text{Ec. (5)}$$

1.2 Cultivo alimentado

En este modo de operación se adiciona uno o varios nutrimentos limitantes a lo largo del cultivo en vez de agregarlos todos al inicio. Las ventajas principales del cultivo son que maximiza el crecimiento celular obteniendo una alta densidad, aumenta la producción de metabolitos, evita la inhibición de nutrientes o productos tóxicos y no

requiere alta inversión. Existen tres tipos de cultivos fed batch de acuerdo al modo de alimentación del sustrato: exponencial, lineal e intermitente. Se han empleado extensamente para la producción de biomasa, antibióticos, aminoácidos, enzimas, polisacáridos y metabolitos como etanol o ácidos orgánicos; por supuesto empleando gran variedad de microorganismos [15,17,21,22]. La Figura 2 muestra un esquema de tipo de cultivo y de su comportamiento cinético.

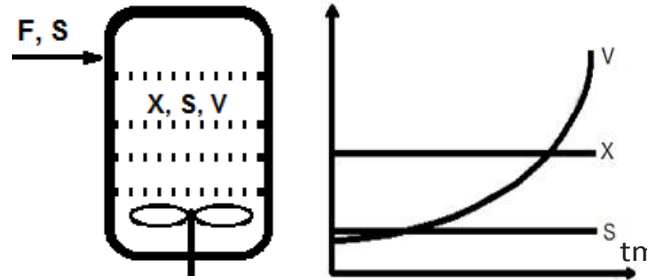


Figura 2 Representación de cultivo lote alimentado, esquema general y cinética del cultivo.

Las Ecs. (6-9) describen este modo de operación para biomasa (x), sustrato (s), producto (p) y volumen (V).

$$\frac{dx}{dt} = x \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \quad \text{Ec. (6)}$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{F}{V} (s_e - s) - \frac{\mu x}{Y_{xs}} \quad \text{Ec. (7)}$$

$$\frac{dp}{dt} = \mu x Y_{px} - \frac{F}{V} p \quad \text{Ec. (8)}$$

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad \text{Ec. (9)}$$

El objetivo de este trabajo es estudiar la cinética de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en cultivos lote y lote alimentado lineal para la producción de biomasa y bioetanol.

2. Materiales y métodos

2.1 Microorganismo

Se utilizó una cepa de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*. Se propagó en medio YPS en placas y tubos inclinados adicionando 15 g L⁻¹ de agar al medio. Una vez esterilizados, se siembran y se incuban a 30 °C durante 24 h. Se conservan en refrigeración resembrándose cada mes.

2.2 Medios de cultivo

En la Tabla 1 se muestra la composición del medio de cultivo empleado para realizar el pre-inóculo en tubos, el inóculo en matraz y el cultivo en reactor de 4 litros.

Tabla 1 Medio sintético para producción de etanol [4].

Compuesto	Concentración (g L ⁻¹)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	5
Sulfato de amonio	1
Fosfato de potasio	1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.5

2.3 Proceso de fermentación

El pre-inóculo se realizó en un tubo con 10 mL de medio, se sembró la cepa y se incubó 24 h a 30 °C y 250 rpm. El inóculo se llevó a cabo en un matraz de 250 ml con 150 ml de medio, se adicionó el pre-inóculo y se incubó 48 h a 30 °C y 250 rpm.

El cultivo lote fue realizado en un reactor de 4 L con volumen de operación de 1.5 L, el medio fue esterilizado en el reactor durante 30 min a 121 °C. Se agregó el inóculo y el cultivo se llevó a cabo a 30 °C. Se inició con una aireación de 1 vvm, pero la agitación y la aireación fueron aumentadas dependiendo de la demanda de oxígeno disuelto, de tal manera que se evitó su disminución por debajo del 10 %.

El cultivo lote alimentado en forma lineal partió del cultivo lote. La alimentación lineal de una solución concentrada de sacarosa, $s_e=150$ g L⁻¹, se realizó con una bomba peristáltica Masterflex controlada a velocidad constante para dar un flujo de $F=0.1332$ L h⁻¹, se usó una tubería de diámetro adecuada para lograr el F . El volumen final fue de 2.5 L.

2.4 Métodos analíticos

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de la fermentación. Las determinaciones que se le realizaron fueron azúcares reductores, etanol y proteína extracelular.

2.4.1 Determinación de biomasa

El crecimiento de biomasa se siguió por medio de la medición a 600 nm de la densidad óptica (DO) de la muestra, cuando fue necesario se realizaron diluciones con agua destilada para medir DO con valores menores de 1.

La determinación de la concentración de biomasa se realizó por el método gravimétrico. La muestra se centrifugó a 9000 rpm durante 5 min en tubos Eppendorf, previamente puestos a peso constante, se separó el paquete celular (biomasa) del sobrenadante. Se hicieron dos lavados de la biomasa y posteriormente se secó a 90 °C hasta peso constante.

El sobrenadante se conservó para hacer la determinación de azúcares reductores, etanol y proteína extracelular.

2.4.2 Determinación de etanol

La determinación de etanol se realizó en los sobrenadantes mediante HPLC. Además se realizó la destilación del sobrenadante final en rotavapor, el destilado se analizó por cromatografía de líquidos en un equipo HPLC marca Shimadzu. Se utilizó una columna H⁺ Aminex, usando como eluente agua grado HPLC, flujo de 0.5 mLmin⁻¹ a 30 °C y un detector de índice de refracción (IR). Se realizó una curva estándar de etanol.

2.4.3 Determinación de azúcares

Los azúcares reductores fueron determinados por el método de DNS descrito por Bernfeld en 1951 [23]. Se leyeron las muestras a una absorbancia de 540 nm, realizándose una curva estándar de glucosa con testigos de concentración conocida en el rango 0-2 g L⁻¹.

2.4.4 Determinación de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se determinó por el método de Biuret [24]. Las muestras se leyeron a 560 nm, se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) entre 0 y 3 g L⁻¹.

2.5 Detalle matemático

Los datos experimentales se ajustaron a las ecuaciones cinéticas para producción de biomasa y consumo de sustrato. Se utilizaron los datos de cultivo por lote. Para el crecimiento se utilizaron las Ecuaciones de Monod y el Modelo Logístico, Ecs. (10) y (11) respectivamente.

$$\frac{dx}{dt} = x\mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Ec. (10)}$$

$$\frac{dx}{dt} = x_0 \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right) x \quad \text{Ec. (11)}$$

En el caso de consumo de sustrato se utilizó la Ec. (12) empleando los resultados de la Ec. (11) considerando únicamente el crecimiento.

$$\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{xs}} \frac{dx}{dt} \quad \text{Ec. (12)}$$

3. Resultados y discusiones

En la Fig. 3 se observa la evolución de los parámetros de operación del cultivo lote. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 10% aumentando la agitación y la aireación. En la Figura 4 se observa una cinética de crecimiento típica, sin fase de latencia y presentándose de inmediato la fase exponencial que permanece 12 h hasta la fase estacionaria. El mayor consumo de sustrato coincide con la fase exponencial agotándose a las 12 h. La mayor demanda de oxígeno coincide con la

fase exponencial. En la Tabla 3 se reportan los parámetros cinéticos obtenidos, destacando la $\mu_{max}=0.509 \text{ h}^{-1}$, la máxima concentración de biomasa cercana a 8 g L^{-1} y el rendimiento celular fue de $0.3 \text{ g}_x/\text{g}_s$. Estos datos permitieron realizar las simulaciones del crecimiento de la levadura con los Modelos de Monod y Logístico. Un mejor ajuste de los puntos se logra con el Modelo Logístico el cual describe de manera adecuada el crecimiento desde el inicio hasta el final del cultivo lote. El Modelo de Monod solo puede modelar el crecimiento en su fase exponencial. En el caso del sustrato consumido también la aproximación solo fue adecuada en la fase exponencial, Figura 4. Resultados similares de un mejor ajuste con el Modelo Logístico se encuentran en la fermentación de otros metabolitos [18]. La producción de bioetanol en este cultivo fue muy baja favoreciéndose el crecimiento celular.

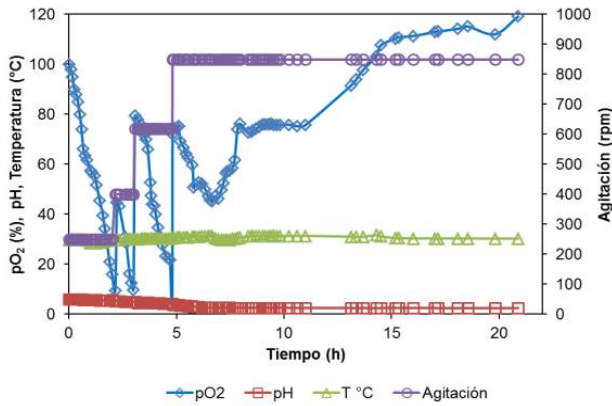


Figura 3 Evolución de los parámetros de operación en el cultivo lote de *Saccharomyces cerevisiae*.

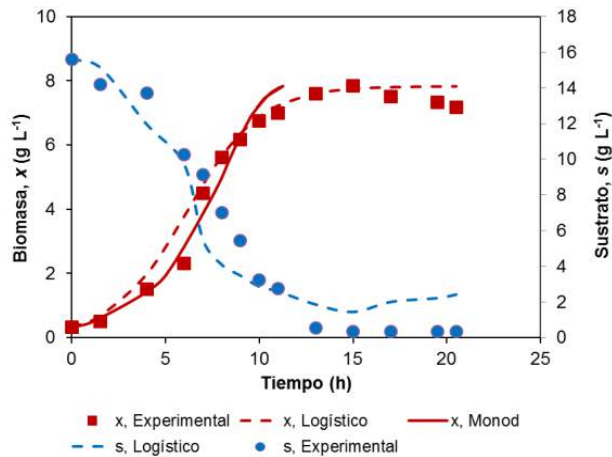


Figura 4 Cinética de fermentación en cultivo lote de *Saccharomyces cerevisiae* y simulación con los Modelos de Monod y Logístico.

Con respecto al cultivo alimentado linealmente, la Figura 5 presenta la evolución de los parámetros de operación incluyendo el flujo (F) y el volumen (V). El flujo permaneció constante cerca de 7 L h^{-1} cuando se alcanzó el volumen final establecido.

Tabla 3 Parámetros cinéticos obtenidos del cultivo lote.

Parámetro	Valor
μ_{max}	0.509 h^{-1}
K_s	$3.9 \text{ g}_s \text{ L}^{-1}$
Y_{xs}	$0.4918 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$
x_{max}	$7.83 \text{ g}_x \text{ L}^{-1}$

El volumen aumentó en forma lineal al igual que la biomasa total como puede observarse en la Figura 6, la concentración de biomasa permaneció constante con un valor alrededor de $9 \text{ g}_x \text{ L}^{-1}$, la proteína extracelular alcanzó concentraciones cercanas a 40 g L^{-1} . Al final del cultivo los máximos valores obtenidos fueron 23.5 g_x de biomasa total. La concentración final de etanol encontrada fue de $25 \text{ g}_{Et} \text{ L}^{-1}$ o 64 g de etanol total.

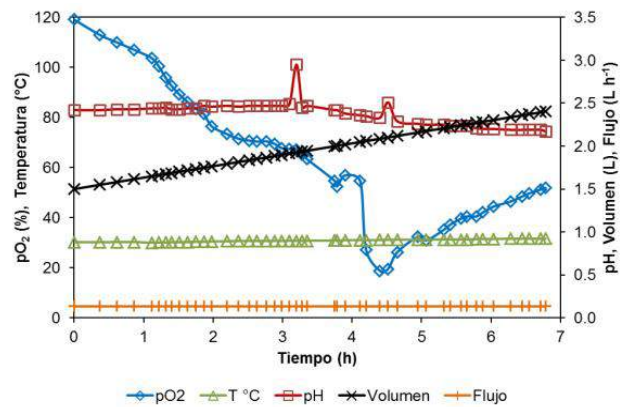


Figura 5 Evolución de los parámetros de operación en el cultivo lote alimentado lineal de *Saccharomyces cerevisiae*.

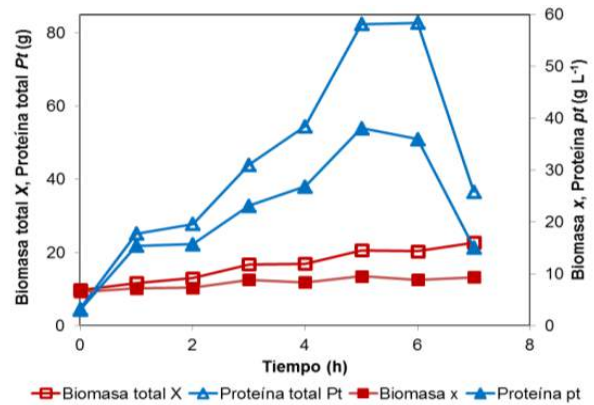


Figura 6 Cinética de fermentación en cultivo lote alimentado lineal de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que en el cultivo lote el crecimiento celular es favorecido no así la producción de etanol. Es en el cultivo lote alimentado donde se produce etanol. La estrategia de dividir la fermentación en dos fases se puede utilizar para mejorar la producción de otros metabolitos que se comporten de manera similar.

5. Nomenclatura

t	tiempo, h
x	concentración de biomasa, $g_x L^{-1}$
x_0	concentración de biomasa inicial, $g_x L^{-1}$
x_{max}	concentración de biomasa máxima, $g_x L^{-1}$
X	biomasa total, g_x
X_{max}	biomasa total máxima, g_x
s	concentración de sustrato, $g_s L^{-1}$
s_e	concentración de sustrato para cultivo alimentado, $g_s L^{-1}$
K_s	constante de saturación, $g_s L^{-1}$
Yx/s	rendimiento de biomasa con respecto a sustrato, $g_x g_x^{-1}$
q_s	velocidad específica de consumo de sustrato, $g_s g_x^{-1} h^{-1}$
q_p	velocidad específica de producción, $g_p g_x^{-1} h^{-1}$
V	volumen, L
F	Flujo, $L h^{-1}$
rpm	revoluciones por minuto, min^{-1}
vvm	volumen de aire por volumen de medio minuto, $L L^{-1} min^{-1}$

Símbolos griegos

μ	Velocidad específica de crecimiento, h^{-1}
μ_{max}	Velocidad específica de crecimiento máxima, h^{-1}

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca de maestría del Ing. Guerrero Reyes.

Referencias

- [1] Siqueira P.F., Karp S.G., Carvalho J.C., Sturm W., Rodríguez L. J. A., Tholozan J.L., Rani S. R., Pandey A., Soccol C.R. (2008). Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 99: 8156-8163.
- [2] Aiduan L.B., Antizar L.M.K. (2007). Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 30: 189-196.
- [3] Szambelan K., Nowak J., Czarniecki Z. (2004). Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *Biotechnology Letters*, 26: 845-848.
- [4] Monsalve G.J.F., Medina De P.V.I., Ruiz C.A.A. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Dyna*, 73(150): 21-27.
- [5] Tejada L.P., Tejada C., Villabona A., Alvear M.R., Castillo C.R., Henao D.L., Marimón W., Madariaga N., Tarón A. (2009). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscara de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*, 10: 120-125.
- [6] Hanh V.V., Kim K. (2009). Ethanol Production from Rice Winery Waste-Rice Wine Cake by Simultaneous Saccharification and Fermentation without Cooking. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(10): 1161-1168.
- [7] Silva C.G., Stamford T.L., de Andrade S.A., de Souza E., de Araújo J. (2010). Production of etanol from mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) pods mash by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5): 1-13.
- [8] Mohammad J.T., Keikhosro K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9:1621-1651.
- [9] Elliston A., Collins S.R.A., Wilson D.R., Roberts I.N., Waldron, K.W. (2013). High concentration of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste paper. *Bioresource Technology*, 134: 117-126.
- [10] Rezić T., Oros D., Marković I., Kracher D., Ludwig R., Šantek B. (2013). Integrated Hydrolyzation and Fermentation of Sugar Beet Pulp to Bioethanol. *Journal Microbiology and Biotechnology*, 23(9): 1244-1252.
- [11] Bayrock D.P., Ingledew W.M. (2001). Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27: 87-93.
- [12] Padín González C., Díaz Fernández M. (2009) Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29: 110-116.
- [13] Wang D., Xu Y., Hu J., Zhao G. (2004) Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(4): 340-346.
- [14] Herrera E., Hernández G., Moran A., Flores M., Cordova J., Femat R., Diaz M.D. (2009). Modelado matemático del cultivo lote y continuo del proceso fermentativo del tequila. Congreso Anual 2009 de la Asociación de México de Control Automático, Zacatecas, México.
- [15] Ramírez Castillo M.L., Uribealraa J.L. (2006) Improved process for exopolysaccharide production by *Klebsiella pneumonia* sp. *Pneumonia* by a fed-batch strategy. *Biotechnology Letters*, 26(16): 1301-1306.
- [16] Hernández D.A., Ramírez C.M.L., Sánchez S.J.P., Guerrero C.J.F., Cuervo P.V.D. (2012). Sistema de control de alimentación para cultivo lote alimentado exponencial en procesos de fermentación. *Revista Visión Politécnica*, 7(1): 9-13
- [17] Yamanè T., Shimizu S. (1984) Fed-batch Techniques in Microbial Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 30: 148-194.
- [18] Jakymec M., Morán H., Páez G., Ferrer J.R., Marmól Z., Ramones E. (2001). Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista Científica FCV-LUZ*, 11(1): 53-59.
- [19] Znad H., Blažej M. Báleš V., Markoš J. (2004) A kinetic model for gluconic acid production by *Aspergillus niger*. *Chem Pap*, 58(1): 23-28.
- [20] Song H., Jang S.H., Park J.M., Lee S.Y. (2008) Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochemical Engineering Journal*, 40: 107-115.
- [21] He G.Q., Kong Q., Chen Q.H., Ruan H. (2005) Batch and fed-batch production of butyric acid by *Clostridium butyricum* ZJUCB. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B(11): 1076-1080.
- [22] Hjersted J.L., Henson M.A., Mahadevan R. (2007) Genome-Scale Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism and Ethanol Production in Fed-Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5): 1190-1204.
- [23] Worthington Enzyme Manual (1972). Enzymes, enzyme reagents and reacted biochemicals. Worthington Biochemical Corporation. Freehold, New Jersey, U.S.A.
- [24] Stickland L.H. (1951) The Determination of Small Quantities of Bacteria by means of the Biuret Reaction. *J. gen. Microbiol.* 5: 698-703.