

ESTUDIO SOBRE LA TRANSFORMACIÓN DE ETANOL POR
CANDIDA UTILIS EN DOS TIPOS DE CULTIVO:
CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

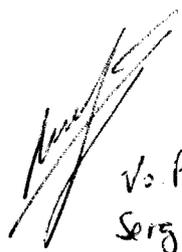
TESIS QUE PRESENTA LA

I.B.I. ISABEL DE LA LUZ MEMBRILLO VENEGAS

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAESTRO EN
INGENIERÍA QUÍMICA

JULIO DE 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA



Vs. Pr
Sergio Reza Moscow

El trabajo aquí presentado fue realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa con el apoyo del Dr. Sergio Revah Moiseev, agradezco de manera muy especial su paciencia y confianza en que llegaría a concluirse.

Mis agradecimientos también al Dr. Sergio Huerta (UAM-I) y Dr. Sergio Caffarel (TESE) por sus valiosas sugerencias para que el documento fuera más claro.

Atentamente

Isabel de la Luz Membrillo Venegas

Resumen

Se estudió el crecimiento de *Candida utilis* sobre etanol y/o glucosa en cultivos por lote y por lote alimentado. Los resultados para el PPcultivo por lote indican que no es necesaria la presencia de azúcar para la síntesis de acetato de etilo, pero ésta se ve sensiblemente mejorada al adicionar etanol (los rendimientos mejoran de 0.18 a 0.52 g éster/g etanol). En cultivos por lote alimentado, las mayores concentraciones de acetato de etilo se obtienen cuando hay una mayor concentración de células en el medio a una velocidad de alimentación de alcohol de 0.6 g//L/h. La síntesis de acetato de etilo se ve afectada por la concentración de oxígeno, los niveles superiores se obtienen arriba de 10% de OD y debajo de 80%;sin embargo, si se desea evitar la producción de ácido acético debe cuidarse que el nivel relativo de oxígeno en el medio se mantenga por debajo del 70%. La síntesis de este éster también es afectada por el nivel de alcohol en el medio (la conversión aumenta con la concentración de etanol desde 10-35 g/L).

Resumen	i
Indice	iii
Indice de figuras	v
Indice de tablas	viii
Introducción	ix
Nomenclatura	xi
Capítulo 1: Antecedentes y justificación	1
ANTECEDENTES	3
1.1. Producción de aromas en la industria alimentaria	3
1.2. Producción de ésteres de acetato y catabolismo de etanol.	5
1.2.1. Subproductos en la síntesis de acetato de etilo: aldehídos y ácidos	8
1.2.2. Influencia del nivel de etanol en el medio para la producción de acetato de etilo y otros metabolitos	10
1.2.3. Efecto de la concentración relativa de oxígeno disuelto sobre la transformación de etanol a biomasa y distintos metabolitos	11
1.2.4. Efecto de la presencia de azúcar y el tipo de cultivo en la formación de ésteres de acetato y acetaldehído por levaduras	12
1.3. Empleo de vinazas en la producción de acetaldehído y acetato de etilo	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	16
ESTRATEGIA METODOLÓGICA	17

Capítulo 2: Material y Métodos	19
2.1. Materiales y medio de cultivo	21
2.2. Dispositivos experimentales	22
2.3. Métodos analíticos	23
2.4. Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)	25
2.5. Cultivo por lote alimentado	25
Capítulo 3: Cultivo por lote: resultados y análisis	27
3.1. Cultivo por lote para la producción de acetato de etilo: efecto de la presencia de glucosa y etanol	29
3.2. Estudios sobre la capacidad de <i>Candida utilis</i> para producir otros ésteres	33
3.3. Efecto de la concentración relativa de oxígeno (%OD) en la síntesis de acetato de etilo	35
Capítulo 4: Cultivo por lote alimentado: resultados y análisis	39
4. Sistema alimentado continuamente con etanol	41
4.1. Descripción de la acumulación de productos y consumo de sustratos por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado	41
4.2. Análisis comparativo de la acumulación de productos en los tres cultivos por lote alimentado	47
4.3. Consumo de sustratos.	54
4.4. Eliminación de alcohol.	58
4.5. Coeficiente respiratorio	60
4.6. Producción de metabolitos	63
4.7. Balances de carbono	70
Capítulo 5: Conclusiones	77
Bibliografía	83
Apéndices	93

Indice de figuras

Fig. 1.1 Esquema general del metabolismo de azúcares y etanol por levaduras en condiciones aeróbicas	7
Fig. 1.2 Modelo hipotético de las vías de consumo de etanol por levaduras	9
Fig.2.1 Arreglo experimental del sistema I	23
Fig. 2.2 Arreglo experimental del sistema II	23
Fig. 3.1. Crecimiento, consumo de sustratos y formación de acetato de etilo para <i>Candida utilis</i> empleando glucosa como primera fuente de carbono en el Sistema I.	30
Figura 3.2. Crecimiento, consumo de sustratos y formación de productos para <i>Candida utilis</i> empleando glucosa como primera fuente de carbono. Sistema I.	31
Figura 3.3. Consumo de etanol, crecimiento y producción de acetato de etilo a distintos niveles de oxígeno disuelto. Aireación = 0.2 VVM. Sistema II	36
Fig. 4.1. Concentración de biomasa, alcohol y metabolitos en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado. Caso 1	42
.Fig. 4.2. Densidad celular y nivel relativo de oxígeno en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado. Caso 1.	43
Fig. 4.3. Concentración de biomasa, alcohol y metabolitos en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado. Caso 2.	44
Fig. 4.4. Densidad celular y nivel relativo de oxígeno en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado. Caso 2.	45
Fig. 4.5. Concentración de biomasa, alcohol y metabolitos en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado. Caso 3.	46
Fig. 4.6. Densidad celular y nivel relativo de oxígeno en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por <i>Candida utilis</i> en el cultivo por lote alimentado. Caso 3.	47
Fig. 4.7. Comparación de la velocidad específica de crecimiento (μ) de <i>Candida utilis</i> en tres cultivos por lote alimentado.	48
Fig. 4.8. Comparación del crecimiento de <i>Candida utilis</i> y acumulación de acetato de etilo en tres cultivos por lote alimentado.	49

Fig. 4.9. Comparación de la acumulación de ácido acético y acetaldehído en el reactor para los tres cultivos por lote alimentado de <i>Candida utilis</i>	50
Fig. 4.10. Comparación de la acumulación de alcohol en el reactor para los tres cultivos por lote alimentado de <i>Candida utilis</i> .	52
Fig. 4.11 Comparación del nivel relativo de oxígenos en el reactor para los tres cultivos por lote alimentado de <i>Candida utilis</i>	53
Fig. 4.12. Evolución de la tasa específica de consumo de etanol para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	56
Fig. 4.13. Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.	57
Fig. 4.14. Tasa de eliminación de alcohol para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.	59
Fig. 4.15. Coeficiente respiratorio para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	62
Fig. 4.16. Comparación de la productividad volumétrica de acetato de etilo para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	63
Fig. 4.17. Comparación de la productividad específica de acetato de etilo para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	64
Fig. 4.18. Comparación de los rendimientos de acetato de etilo para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	65
Fig. 4.19. Comparación de la productividad volumétrica de acetaldehído para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.	66
Fig. 4.20. Comparación de la productividad específica de acetaldehído para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.	66
Fig. 4.21. Comparación de los rendimientos de acetaldehído para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.	67
Fig. 4.22. Comparación de la productividad volumétrica de ácido acético para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	68
Fig. 4.23. Comparación de la productividad específica de ácido acético para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	68
Fig. 4.24. Comparación de los rendimientos de ácido acético para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	69

Indice de tablas

Tabla 1. I Aromas y sabores obtenidos por vía biotecnológica	4
Tabla 1.II Cultivos para producción de acetato de etilo y acetaldehído por levaduras	13
Tabla 1.III Comparación del precio de distintos solventes que pueden obtenerse por fermentación	15
Tabla 3.I. Rendimientos de algunos productos formados durante el crecimiento de levaduras	33
Tabla 3.II. Diseño experimental para el estudio de esterificación de <i>Candida utilis</i>	34
Tabla 3.III. Rendimientos y velocidad de consumo de alcohol para <i>Candida utilis</i> creciendo en etanol a dos niveles de oxígeno en el medio	37
Tabla 4.I. Comparación de la acumulación de productos y crecimiento en tres cultivos por lote alimentado de <i>Candida utilis</i> creciendo sobre etanol.	53
Tabla 4.II. Consumo de sustratos y velocidad de eliminación de alcohol en el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	58
Tabla 4.III. Producción de metabolitos en el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa	70
Tabla 4.IV. Resultados del balance de carbono para los tres experimentos por lote alimentado	71
Tabla 4.V. Balance de materia (65 horas) para el cultivo por lote alimentado de <i>Candida utilis</i> .	74

Introducción

La producción de aditivos alimenticios por vías biotecnológicas brinda seguridad en la calidad de los productos y buena aceptación de parte de los consumidores por tratarse de sustancias de origen natural; además, ofrece una amplia gama de posibilidades de uso de materiales alternativos. El acetato de etilo y acetaldehído son metabolitos de alto valor agregado empleados como aditivos en distintos alimentos; sin embargo, el producir únicamente alguno de los dos no es una tarea fácil. La síntesis de estos compuestos se da simultáneamente y se asocia frecuentemente a la formación de ácido acético.

Este trabajo es un estudio descriptivo de la producción de estos metabolitos por la levadura *Candida utilis*; incluye el efecto de las condiciones del medio de fermentación en dos diferentes sistemas de fermentación: cultivo por lote y cultivo por lote alimentado. Esencialmente, los medios de cultivo utilizados se prepararon con alcohol para simular las concentraciones que contienen las aguas residuales de la producción de alcohol (menor al 10%) para estudiar su efecto sobre la síntesis de los productos concernientes a este trabajo. Asimismo, se presenta el estudio del efecto de la disponibilidad de oxígeno en el cultivo sobre la síntesis de estos metabolitos, principalmente sobre la producción de acetato de etilo.

A, acetaldehído
AA, ácido acético
AE, acetato de etilo
CE, tasa de eliminación de alcohol, g/L-h
CR, coeficiente respiratorio, (mmol CO₂ producido/mmol O₂ consumido)
E, etanol
G, glucosa
OD, oxígeno disuelto (%)
P, concentración de producto (g/l)
qE, velocidad de consumo de etanol (g/l h)
qO₂, velocidad de consumo de oxígeno (g/g h)
r_{AE}, productividad volumétrica de acetato de etilo, g/l-h
r_{pa}, productividad volumétrica de acetaldehído, g/l-h
VVM, tasa de aireación, L/L-minuto
X, concentración de biomasa (g/l)
Y, rendimiento (g /g)
Y_{AE/E}, rendimiento de acetato de etilo respecto al etanol consumido (g /g)
Y_{X/E}, rendimiento de biomasa respecto al etanol consumido (g/g)

Letras griegas:

μ , tasa específica de crecimiento (h^{-1})
 μ_{max} , máxima tasa específica de crecimiento (h^{-1})
 α , coeficiente estequiométrico del etanol en la ec. 4.7
 β , coeficiente estequiométrico del amonio en la ec. 4.7
 χ , coeficiente estequiométrico del oxígeno en la ec. 4.7
 δ , coeficiente estequiométrico de la biomasa en la ec. 4.7
 ϵ , coeficiente estequiométrico del acetato de etilo en la ec. 4.7
 ϕ , coeficiente estequiométrico del acetaldehído en la ec. 4.7
 γ , coeficiente estequiométrico del ácido acético en la ec. 4.7
 η , coeficiente estequiométrico del dióxido de carbono en la ec. 4.7
 ω , coeficiente estequiométrico del agua en la ec. 4.7

Capítulo 1:

Antecedentes y justificación

ANTECEDENTES

1.1. Producción de aromas en la industria alimentaria

A partir de la segunda guerra mundial, se dio auge a la producción industrial de alimentos que pueden ser almacenados por tiempos prolongados, con esto es posible su transportación y distribución bajo condiciones climatológicas extremas. Sin embargo, con frecuencia, el procesamiento de los alimentos frescos va acompañado de la pérdida de propiedades organolépticas de estos y por ello se hace necesario el empleo de aditivos alimenticios que sustituyan las propiedades perdidas.

Desde los años 70 hasta la actualidad, los alimentos naturales con procesamiento químico han cubierto gran parte del mercado mundial. Los consumidores demandan mayor variedad de formas en sus alimentos, así como que éstos sean naturales, dietéticos, y sanos al mismo tiempo que son rápidos de preparar. De la mezcla de ingredientes y los estilos de preparación tomados de las mejores cocinas étnicas se han generado sabores únicos. El mezclado y balance de los ingredientes, así como el método de presentación son importantes para la creación óptima de liberación de sabor, picante, sensación al gusto y textura (Gatfield, 1988; Cheetham, 1994; Uhl, 1996).

Para la creación de estos alimentos se requiere del empleo de aditivos; la incorporación de estas sustancias ha aportado enormes ventajas, particularmente económicas. Los sustitutos de leche, quesos, carne, sopas y jugos de frutas, por ejemplo, han ofrecido al consumidor final nuevas alternativas económicas diferentes a las tradicionales. Estos productos presentan una calidad constante, una mayor vida de anaquel y un mejor perfil nutricional. Por otro lado, también ha sido posible generar nuevos productos fuera de las temporadas de cosecha y su aceptación en el mercado ha seguido una tendencia siempre creciente, apoyada en grandes campañas publicitarias y mercadotécnicas. Estos cambios en el patrón de consumo tradicional han propiciado una rápida obsolescencia de productos de consumo corriente y, por lo tanto, han favorecido una fuerte competencia en el desarrollo de otros (García y Quintero, 1993). La lista de aditivos relacionados con las propiedades organolépticas en la industria alimentaria incluye a los sabores artificiales, saborizantes, colorantes, aromas, antioxidantes y texturizantes.

En este trabajo, se pretende hacer énfasis sobre la producción de aromas. La principal producción de aromas y sabores para la industria alimentaria se da en la industria química, son también fuente de estas sustancias útiles como aditivos distintos productos de origen vegetal o animal y compuestos obtenidos de algún proceso enzimático o microbiano. Las mejores alternativas para la producción de aromas naturales son biotecnológicas. La biotecnología moderna comprende la bioquímica, la biología celular y manipulación de microorganismos. En la tabla 1.1 se listan distintos microorganismos capaces de producir sabores por vía biotecnológica. En conjunto, el resultado de estas investigaciones brinda buenos resultados en la síntesis de aromas (Cheetham, 1993 y 1994; Gatfield, 1988).

Tabla 1.1. Aromas y sabores obtenidos por vía biotecnológica

Microorganismo	Compuestos producidos	Característica organoléptica	Referencia
<i>Ceratocystis sp</i>	Terpenos	Principales componentes de los olores de aceites esenciales	Lanza y Palmer., 1977 Gatfield, 1988
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Esteres y aldehídos	Tonos afrutados	Meza y col., 1998
<i>Candida sp</i> <i>Sporobolomyces odorus</i> <i>Trichoderma viride</i>	Lactonas	Impresiones afrutadas Olor y sabor a coco	Yong y Lim, 1986 Maga, 1976
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Pirazinas	Olor a nuez y productos cárnicos	Gatfield, 1988
<i>Candida utilis</i> <i>Aspergillus niger*</i> <i>Mucor miehei*</i> <i>Hansenula mrakii</i>	Esteres	Sabor afrutado Olor a banana	Janssens y col., 1992
<i>Penicillium sp.</i>	Metil cetonas	Sabor a queso	Janssens y col., 1992
Levaduras	Aldehídos	Imparten sensación a "frescura"	Murray y col., 1988
<i>Ceratocystis</i> <i>Thielaviopsis</i> <i>Mycoacia uda</i>	Alcoholes Compuestos aromáticos	Sabores alcohólicos Olor almendrado	Latrasse y col., 1986

* Se emplean las enzimas de estos microorganismos.

Desde principios de este siglo, se ha mostrado que los microorganismos pueden generar olores agradables, siendo útiles como biocatalizadores. La principal ventaja de la biocatálisis radica en que las enzimas y microorganismos catalizan reacciones específicamente, estereoquímicamente y en condiciones suaves, permitiendo un ahorro energético durante la producción de aromas. Además, los microorganismos producen características complejas de sabor que son difíciles de conseguir mediante la síntesis química y pueden sustituir a los sabores obtenidos de vegetales y animales (de extracción costosa debido a sus bajas concentraciones en las materias primas).

Entre los compuestos producidos por microbios que se emplean como sabores destacan los ésteres; por ejemplo, el acetato de etilo y el butirato de etilo tienen una demanda anual en el mercado de los Estados Unidos de 14,405 kg y 137.259 kg respectivamente; y su precio oscila entre 100-500 dólares/kg. Por otro lado, desde 1986, el mercado de los sabores ha tenido un aumento de alrededor del 5% anual (Williams y col., 1988; Cheetham, 1993 y 1994). El acetato de etilo ha sido empleado como aditivo en la industria alimentaria y de bebidas alcohólicas; es usado comúnmente para reforzar una nota "frutal" y es parte esencial en el *bouquet* de bebidas fermentadas (Bol y col., 1987 y Armstrong y col., 1984 a).

1.2. Producción de ésteres de acetato y catabolismo de etanol.

Aunque la producción de ésteres por microorganismos se conoce desde los años 20, fue hasta los 50 que la formación de estos compuestos por levaduras se volvió motivo de estudio, con especial interés en el acetato de etilo. Los trabajos de Davies y col. (1951) y Tabachnik y Joslyn (1953) con distintas especies de las levaduras *Pichia* y *Hansenula*, mostraron que puede formarse acetato de etilo a partir de glucosa y/o etanol. Para estudiar la transformación de etanol a distintos metabolitos, es necesario considerar las siguientes enzimas que participan en su transformación, así como las que intervienen en su síntesis, entre éstas destacan:

- Alcohol acetil transferasa (AAT), enzima responsable de la esterificación del etanol y el acetil-CoA (proveniente del ácido acético). La AAT se encuentra principalmente en las membranas celulares de las levaduras, con lo que los ésteres formados son liberados al medio sin llegar a ocasionar una acumulación tóxica en las células;

además, es una enzima inducible por la presencia del alcohol (Armstrong y col., 1984 a, 1984 b; Bol y col., 1987). También es probable que a elevadas concentraciones de acetato de etilo esta enzima tenga una actividad alta (Yoshioka y Hashimoto, 1984 a; Kallel-Mhiri y col., 1993; Kallel-Mhiri y Miclo, 1993) y que juegue un papel importante en la regulación de la formación de células o en el crecimiento de las levaduras mediante el consumo de acetil-CoA por la isocitrato liasa para producir citrato, útil como precursor de la gluconeogénesis (Kallel-Mhiri y Miclo, 1993; Lehninger, 1984).

- Etanol deshidrogenasa, enzima que gobierna la reducción reversible del acetaldehído a etanol, rige la producción de acetaldehído (Kallel-Mhiri y col, 1993). Cuando produce el alcohol, no requiere de la presencia de oxígeno (Lehninger, 1984)
- Alcohol oxidasa, responsable de la oxidación del etanol en presencia de oxígeno y peróxido para la síntesis de acetil-CoA (Kallel-Mhiri y col. , 1993; Kallel-Mhiri y Miclo, 1993; Gancedo y Serrano, 1989). Se inhibe en una concentración de acetaldehído de 1 g/L en un 8% y al 50% cuando la concentración de este metabolito alcanza 4 g/L (Chiang y col, 1991).
- Por otro lado, se ha postulado la existencia de una esterasa constitutiva en *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis* capaz de transformar el acetato de etilo formado en acetato y etanol (Kallel-Mhiri y col., 1993) y que puede disminuir la actividad aparente de la AAT.

En la producción de ésteres de acetato participan otras enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En el organigrama respiratorio de los microorganismos heterótrofos aerobios (figura 1.1) una de las vías metabólicas que producen mayor cantidad de energía es el ciclo Krebs, que constituye en las células aeróbicas la ruta común final de la oxidación de todas las moléculas combustibles. Para que ocurran todas las reacciones involucradas en esta vía, es indispensable la incorporación de acetil-CoA, proveniente de la oxidación de los glúcidos (teniendo como intermediario al etanol). En esta vía metabólica, se liberan átomos de hidrógeno (poder reductor) que se dirigen a la cadena respiratoria por un proceso de fosforilación oxidativa. El ácido cítrico, primer intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se forma a partir de la condensación del acetil-CoA con el oxalacetato, esta reacción es catalizada por la enzima citrato-sintetasa. Esta reacción es la primera etapa condicionante del ritmo del ciclo y de su velocidad depende

en gran medida la disponibilidad del acetil-CoA. La enzima aconitasa utiliza el ácido cítrico que se forma, ésta requiere de la presencia del ion férrico para funcionar, así que en ausencia de este cofactor se acumularán el ácido cítrico y el acetil-CoA, el cual puede desviarse a la síntesis de ésteres (Thomas y Dawson, 1978; Willets, 1989).

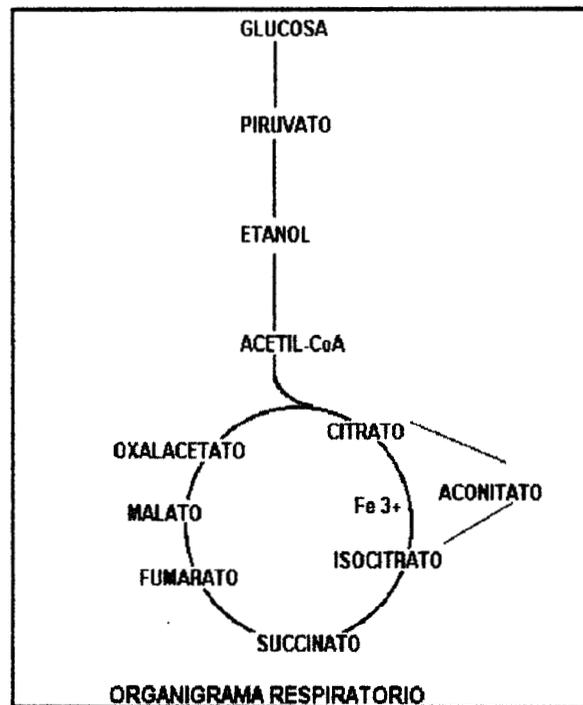


Fig. 1.1. Esquema general del metabolismo de azúcares y etanol por levaduras en condiciones aeróbicas (Lehninger, 1984).

Otro punto a tomarse en cuenta para la producción de ésteres es el hecho de que el etanol facilita la acidificación del medio y permite la síntesis de ácidos orgánicos, en este caso, como es de esperarse, se mejora la síntesis de acetato (Votruba y Páca, 1992; Páca y Marek, 1996 a). Para favorecer también la síntesis de ésteres, es necesario evitar altas concentraciones de acetaldehído (mayores a 0.58 g/L, Stanley y col., 1993 y 1997); ésto puede conseguirse manteniendo una buena aereación en el medio de cultivo que permita el arrastre de este compuesto dada su elevada volatilidad, con esta acción se ve disminuida la inhibición de la síntesis de acetil-CoA sintetasa para *Candida utilis*, (Prokop y col., 1978).

1.2.1. Subproductos en la síntesis de acetato de etilo: aldehídos y ácidos.

Como ya se indicó, uno de los productos del catabolismo del etanol es el acetaldehído, que es un intermediario de importancia comercial; puede producirse sintéticamente de la oxidación catalítica del etanol o del etileno. Este líquido incoloro de olor sofocante produce un agradable aroma frutal al ser diluido. Es una materia prima en la industria química de la manufactura de ácido acético, anhídrido acético, alcohol butílico, butiraldehído, cloral, piridina y otros derivados. Respecto a la calidad de los alimentos, la presencia de acetaldehído es esencial para decir si un alimento es fresco o no. Este material juega un papel significativo en el sabor al yogur y ciertos sabores afrutados, tales como el de naranja. La concentración de esta sustancia en los jugos de fruta es de 120 ppm, 32 ppm en vinos blancos y 83 ppm en los tintos (Mc Closkey, 1981). Desde mediados de los años 70 se ha puesto interés en su producción por métodos biológicos para ser empleado como aditivo natural de varios alimentos. El proceso biológico para su producción es particularmente interesante ya que puede recuperarse fácilmente del fermentador dada su alta volatilidad (p. eb. 21° C) atrapando el compuesto carbonílico con algún adsorbente (Chiang y col., 1991; Moya y col., 1999; Lin y col., 1999). Las enzimas etanol dehidrogenasa o alcohol oxidasa que se localizan en las levaduras podrían ser utilizadas para producir acetaldehído "grado alimenticio" que lo hace más fácilmente vendible a los consumidores. Se han patentado técnicas enzimáticas para oxidar etanol a acetaldehído inmovilizando la enzima etanol deshidrogenasa. Este método implica el uso de cofactores de alto costo. Un método más efectivo es utilizar células completas para conseguir una oxidación continua con la regeneración del cofactor (Gatfield, 1988).

Otro de los intermediarios en la síntesis de acetato de etilo es el ácido acético, de gran valor en la elaboración de alimentos en soluciones diluidas (vinagre). Este ácido se forma como un mecanismo de protección celular, como el acetato pasa mas lentamente por la membrana puede acumularse dentro de las células y serles tóxico, por ello es que se excreta en forma de acetato y se protona en el medio para producir ácido acético, o bien puede combinarse con el alcohol del medio y formar un éster (Gancedo y Serrano, 1989).

Basándose en la información presentada previamente, es posible realizar un modelo hipotético de las rutas metabólicas que se siguen para el catabolismo del etanol por levaduras (v. fig. 1.2).

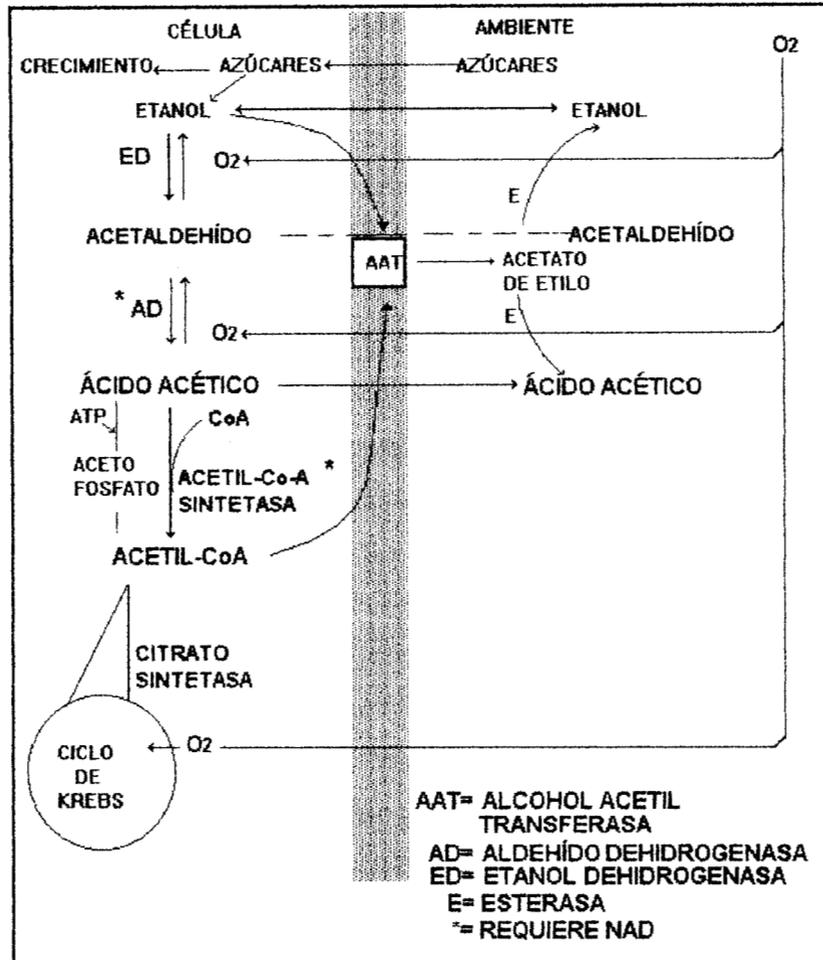


Figura 1.2. Modelo hipotético de las vías de consumo de etanol por levaduras. Tomado y modificado de Armstrong (1988), Bol (1987), Kallel-Mhiri y Miclo (1993).

Atendiendo a esta figura, puede esperarse que la concentración tanto de etanol como de acetato influyan en los equilibrios de la vía metabólica esquematizada, por lo que parece razonable mantener el nivel de etanol adecuadamente y así regular la producción del éster. Es importante también reducir la actividad de la esterasa, esto se consigue manteniendo un pH ligeramente bajo (5-6) (Kallel-Mhiri y col., 1993). Más adelante se

presentarán las formas de manipular el cultivo de *Candida utilis* para conseguir buenos rendimientos de acetato de etilo.

1.2.2. Influencia del nivel de etanol en el medio para la producción de acetato de etilo y otros metabolitos

Es importante tomar en cuenta el nivel de etanol en el medio de cultivo de levaduras para dirigir su transformación a la producción de distintos metabolitos. Watteeuw y col. (1979) encontraron que *Candida utilis* crece sobre etanol para producir proteína unicelular y como uno de los subproductos aparece acetato de etilo, el cual no se ve aumentado al elevar la concentración de alcohol. En el estudio de la producción de acetato de etilo por *Kluyveromyces fragilis* previamente crecida sobre lactosa como fuente de carbono para la producción de alcohol se encontró que si la concentración de éste en el medio es superior a los 35 g/L da inicio la producción de acetaldehído por saturación de las vías metabólicas involucradas en la síntesis de acetato de etilo, a concentraciones menores de alcohol se obtiene un rendimiento máximo del éster ($Y_{AE/E}$ 0.75 g/g) (Kallel-Mhiri y col., 1993). Otros estudios dieron resultados similares para otras levaduras, específicamente para *C. utilis*, si la concentración de alcohol rebasa los 50 g/L se promueve la producción de acetaldehído (Murray y col., 1988). Bol y col. (1987) también investigaron el efecto de la concentración de etanol sobre la síntesis de acetato de etilo por *Hansenula anomala* en cultivos continuos manejando una tasa de dilución de 0.1 h^{-1} y aumentando la concentración del alcohol hasta no más de 46 g/L para mejorar los rendimientos del éster. En los estudios con *C. utilis* realizados por Christen y col. (1999) y Domenech y col. (1999), no es tan claro el que una elevada concentración de alcohol en el medio de cultivo brinde los mejores rendimientos de acetato de etilo (0.69 y 0.76 g/g, para concentraciones de etanol de 16 y 32 g/L, respectivamente). Por otro lado, el uso de 9.9 g/L de células de *Pichia pastoris* en un reactor por lote alimentado con una disolución de etanol (4g/L) y aireado continuamente permite la producción de acetaldehído con rendimientos de 0.15 g/g cel/ h, alcanzando una productividad volumétrica de 1.5 g/L/h de acetaldehído. Los estudios de Armstrong y col. (1984 a, 1984, b, 1988) con cultivos por lote de *Candida utilis* en soluciones diluidas de alcohol plantean que un aumento en el nivel de etanol en el medio de cultivo de 10 a 35 g/L

aumenta sensiblemente la conversión del alcohol a acetato de etilo, y a concentraciones superiores se promueve la producción de acetaldehído, sin que el alcohol supere los 60 g/L. Sin embargo, Páca y Votruba (1994) sugieren que si los niveles de etanol en un cultivo por lote para *Candida utilis* llegan a los 30 g/L comienza a haber inhibición del metabolismo celular por supresión de la respiración endógena a nivel de las enzimas del ciclo de Krebs y del ciclo del glioxalato.

1.2.3. Efecto de la concentración relativa de oxígeno disuelto sobre la transformación de etanol a biomasa y distintos metabolitos

El oxígeno disuelto (OD) en un cultivo microbiano es un sustrato importante en las fermentaciones aerobias y puede ser limitante si no es bien asperjado en el medio. Sobre todo, a elevadas concentraciones de células, la velocidad de consumo puede exceder la velocidad de abastecimiento ocasionando limitaciones de oxígeno. La concentración crítica de oxígeno disuelto (cuando la tasa de crecimiento específica depende de la concentración relativa del gas) para los cultivos de levadura varía de 5 a 10% de saturación (Shuler y Kargi, 1992). La aireación provee a los cultivos de oxígeno, el cual se requiere para el crecimiento celular, aún en condiciones de fermentación, pues es indispensable para la síntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol que constituyen las membranas celulares. El oxígeno también se emplea en la respiración y producción de ATP e incrementa la masa celular (Kuriyama y Kobayashi, 1993). La síntesis de acetato de etilo por diferentes cepas de levadura tales como *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum*, se afecta fuertemente por el nivel de oxígeno en el medio de cultivo (Armstrong y col., 1984b; Yoshioka y Hashimoto, 1984 b). Kallel-Mhiri y col. (1993) realizaron estudios sobre la optimización de la producción de acetato de etilo por *Kluyveromyces fragilis*, hallaron, después de probar concentraciones desde 2 hasta 100% de saturación, que una concentración relativa del 40% mejora el rendimiento de acetato de etilo y disminuye el nivel de etanol en el medio. Armstrong y col. (1984 b) sugieren lo mismo; de igual manera Corzo y col. (1994) hallaron que cuando el nivel relativo de oxígeno disuelto es menor a 3% en un cultivo de *C. utilis* por lote alimentado con etanol en fase gaseosa se observan rendimientos de éster y acetaldehído, respecto al etanol, de 0.123 y 0.004, respectivamente; y a niveles de entre 5 y 15 % estos

cambian a 0.19 y 0.24. Bol y col (1987) sugieren que elevadas tasas de aereación (0.2VVM) permiten dirigir el metabolismo de las levaduras a la producción de células y dióxido de carbono, reduciendo la formación de acetato de etilo. Kuriyama y Kobayashi (1993) al estudiar el efecto del abastecimiento de oxígeno sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en una fermentación continua, notaron que si la aereación es alta y la tasa de consumo de oxígeno es de 1.79 mol/gcel-h, el etanol presente en el medio se ve disminuido y se presentan otros compuestos tales como acetaldehído, ácido acético, acetoina ó 2,3-butanediol. Todos estos resultados difieren de los obtenidos por Yoshioka y Hashimoto (1984 b) y los de Malcorps y col. (1991), quienes observaron una disminución en el nivel del éster por un aumento en la concentración de ácidos grasos no saturados en las membranas celulares, debido a una buena disponibilidad de oxígeno, los cuales inhiben a la AAT. Estas diferencias presentan una opción de estudio del metabolismo de etanol por levaduras, sin embargo, aparentemente una concentración elevada de oxígeno es adecuada para la producción de acetaldehído.

1.2.4. Efecto de la presencia de azúcar y el tipo de cultivo en la formación de ésteres de acetato y acetaldehído por levaduras

El control de la formación de ésteres de acetato durante la fermentación alcohólica es determinado por el nivel de azúcar en el medio de cultivo y se asocia al crecimiento de las células de levadura. En los estudios realizados por Shindo y col. (1992) con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en geles de alginato se encontró que la formación de ésteres se inhibe fuertemente en presencia de maltosa y en menor medida cuando hay glucosa en el medio. Christen y col. (1999) trabajaron en cultivos sólidos de *Candida utilis* crecida sobre un soporte inerte (amberlita IRA-900) impregnado con glucosa y medio mineral; al terminarse la glucosa se alimentó el cultivo con etanol y no se presentó evidencia de producción de acetato de etilo o acetaldehído. Esto concuerda con los resultados de Kallel-Mhiri y col. (1993), quienes confirman que se requiere de la presencia de azúcar (a un nivel mínimo de 3 g/l) para mejorar la producción de acetato de etilo. En la tabla 1.II se sintetizan distintos procesos con levaduras para la producción de acetato de etilo y acetaldehído. De su revisión se hace interesante probar diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo para levaduras, pues no es evidente si la

presencia de azúcar es indispensable para la producción de ésteres y aldehídos a partir de etanol. Otro aspecto importante es el manejo del cultivo, si es por lote, lote alimentado o continuo.

Tabla 1.II. Cultivos para producción de acetato de etilo y acetaldehído por levaduras

Cultivo por lote				
Fuente de carbono	Microorganismo	Rendimientos productividades y	Observaciones	Referencia
Etanol (60 g/L)	<i>Pichia pastoris</i>	$r_{PA}=0.005$ g/l/h si hay glucosa en el medio $r_{PA}=0.175$ sin glucosa en el medio	No hay problema en la producción de acetaldehído si hay oxígeno disponible, atrapan el aldehído en una trampa química con sulfito	Murray y col., 1988
Etanol (50-75 g/l)	<i>P. pastoris</i> a una concentración de 2.5 g/l	$Y_{X/E}=0.093$ g/g		
Glucosa y etanol acumulado en el medio	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	No reportan consumo de glucosa o etanol, sólo que se alcanzó una concentración de acetato de etilo de 0.03 g/l	Las células estuvieron inmovilizadas. La formación de ésteres de acetato está asociada al crecimiento de las levaduras.	Shindo y col., 1992
Lactosa	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	$Y_{AE/E}=0.07$ g/g $Y_{X/E}=1/3$ g/g	Confirman que se requiere de la presencia de azúcar para mejorar la producción de acetato de etilo	Kallel-Mhiri y col., 1993
Etanol (10 g/l)	<i>Candida utilis</i>	$Y_{AE/E}=0.11$ g/g $Y_{A/E}=0.05$ g/g	Se sugiere que la alimentación continua de etanol es una buena alternativa y que el acetaldehído debe recuperarse a la salida del reactor	Armstrong y col., 1984 a y b; Armstrong, 1988
Etanol (35 g/l)		$Y_{AE/E}=0.24$ g/g $Y_{A/E}=0.014$ g/g		
Etanol (40g/L)		$Y_{AE/E}=0$ $Y_{A/E}=1$ g/g		
Etanol (16g/l)	<i>Candida utilis</i> (varias cepas)	$Y_{A/E}=0.069$ g/g	Proponen el uso potencial de este microorganismo para la eliminación de alcohol	Christen y col., 1999
Etanol (32 g/L)		$Y_{A/E}=0.076$ g/g		
Lote alimentado				
Glucosa al inicio, pulsos de alcohol (debajo de 35 g/l)	<i>Candida utilis</i> , células en estado estacionario a una concentración de 55 g/l	$Y_{AE/E}=0.75$ g/g $Y_{A/E}=0.568$ g/g	Manejo de una trampa para recuperación de volátiles	Williams y col., 1988
Glucosa	<i>Pichia pastoris</i>	$r_{PA}=0.001$ g/l/h $r_{PA}=0.035$ sin glucosa en el medio $Y_{A/E}=1/6$ g/g	Proponen mejorar la producción en cultivo continuo	Murray y col., 1988
Etanol (50-75 g/l)				
Glucosa Etanol	<i>Candida utilis</i> . Cultivo sólido	No se observa producción de acetato o acetaldehído	Puede haber inhibición por sustrato	Christen y col., 1999
Etanol	<i>Pichia pastoris</i>	$Y_{A/E}=0.12$ g/g	Evitan la inhibición por producto	Chiang y col., 1991

Tabla 1.H. Continuación...

Etanol en fase gaseosa	<i>Candida utilis</i>	Para concentración relativa de oxígeno (OD) menor al 3% de saturación $Y_{A/E}=0.004$ g/g $Y_{AE/E}=0.123$ g/g Para $5\% < OD < 15\%$ $Y_{AE/E}=0.194$ g/g $Y_{A/E}=0.240$ g/g	Un aumento en la concentración relativa de oxígeno promueve la producción de acetaldehído	Corzo y col, 1994
Cultivo continuo				
Etanol (4 g/l en la corriente de alimentación)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	$r_{AE} = 0.7$ g/l/h y baja producción de acetaldehído	Sólo aparece el acetaldehído en cultivo continuo	Kallel-Mhiri y Miclo, 1993
Etanol	<i>Candida utilis</i>	$r_{PA}=0.035$ g/l/h	Proponen utilizar un lote alimentado	Bol y col, 1987

1.3. Empleo de vinazas en la producción de acetaldehído y acetato de etilo

La producción de alcoholes empleando azúcares genera grandes volúmenes de aguas residuales (vinazas) con un contenido variable de compuestos (alcohol, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos grasos, polialcoholes), dependiendo de las materias primas utilizadas (Cysewsky y Wilke, 1978). Se ha reportado que el etanol puede presentarse en forma de gas y ocasionar problemas de contaminación. Las vinazas pueden producirse por fermentación de cualquier material rico en azúcares. Después de la fermentación, la mezcla líquida que contiene el alcohol debe destilarse. Varios procesos para la recuperación y/o eliminación de etanol en los medios donde se produce, en los residuos de la destilación o en corrientes gaseosas se han adecuado a consideraciones técnicas: uso de adsorbentes durante la producción, técnicas de membrana y vacío son algunas de ellas (Lencki y col., 1983; Minier y Goma, 1982; Matsumura y Markl, 1986; Matsumura y Kataoka 1987; Frank y Sirkar, 1985; Matsumura y col., 1988; Nakao y col., 1987; Kiani y col., 1984). Sin embargo, tienen limitaciones técnicas. Dependiendo de la tecnología utilizada, algunos subproductos (incluyendo ésteres, alcoholes superiores y aldehídos) de la fermentación permanecen en el destilado principal, se remueven como corrientes separadas o se incluyen en los desechos. Los residuos de la destilación deben ser tratados para evitar daños ecológicos. Entre las diferentes soluciones están la destilación simple, tratamiento químico o reuso de ingredientes (Friedrich y Cimerman, 1992).

Respecto a esta última opción, debe considerarse el empleo de los destilados para la elaboración de productos comerciales valiosos como alimentos, como aditivos alimenticios o como fertilizantes (adicionando tartrato de sodio y potasio). También pueden hacerse tratamientos fisicoquímicos (evaporación, por ejemplo) u oxidación. Frecuentemente, las vinazas son utilizadas como sustrato carbonado para hongos filamentosos en la obtención de células, todo ésto obedece a una serie de consideraciones económicas (tipo de reactor, separación de la biomasa) que implican una inversión considerable. Además, en estos sistemas la degradación del alcohol no es completa porque se presenta un equilibrio entre la concentración de alcohol en el agua con el alcohol en fase gaseosa y se debe invertir en sistemas de esterilización y suministro de otros nutrientes (Hodge y Deviny, 1992). De entre los métodos, no es posible asegurar cuál es el mejor. El tratamiento a elegir es función de la situación económica de las destilerías y la legislación.

A mediados de los ochenta se sugirió una esterificación biológica de estas soluciones diluidas de etanol, con el fin no de degradación, sino de recuperarlo como algún otro compuesto de mayor interés comercial (Armstrong y col., 1984 a y b; Armstrong, 1988; Domenech y col., 1999). Después de esta esterificación, es posible una extracción por solventes del éster. Los coeficientes de distribución del acetato de etilo, por ejemplo, son órdenes de magnitud superiores que los del etanol en una gran cantidad de solventes, incluyendo la gasolina. (Data, 1981). Este compuesto es de gran importancia económica y de mayor valor agregado que el etanol (Tabla 1.III); puede servir para mejorar el octanaje de la gasolina y ha sido empleado como aditivo en la industria alimentaria y de bebidas alcohólicas. También se ha sugerido como alternativa de uso de las vinazas la producción de acetaldehído. Así pues, un microorganismo capaz de convertir eficientemente el etanol a acetato de etilo y acetaldehído sería utilizado para recuperar el etanol diluido y disminuir los efectos causados por la contaminación por alcohol.

TABLA 1.III. Comparación del precio de distintos solventes que pueden obtenerse por fermentación. Fuente: Aldrich, 1999.

Compuesto	Precio (USD/kg)
Acetato de etilo	31.7
Etanol	25.3
Acetaldehído	152.0

JUSTIFICACIÓN

La producción de aditivos alimenticios por vías biotecnológicas brinda seguridad en la calidad de los productos y buena aceptación de parte de los consumidores por tratarse de sustancias de origen natural; además, ofrece una amplia gama de posibilidades de uso de materiales alternativos. El acetato de etilo y acetaldehído son metabolitos de alto valor agregado empleados como aditivos en distintos alimentos; sin embargo, hasta ahora, los trabajos referidos en los antecedentes muestran que el producir únicamente alguno de los dos no es una tarea fácil. La síntesis de estos compuestos se da simultáneamente y se asocia frecuentemente a la formación de ácido acético.

Vale la pena destacar que la producción de estas sustancias requiere del empleo de medios de cultivo con concentraciones de alcohol no mayores a 50 g/l (tabla 1.11); por tal razón, es posible diseñar medios de cultivo que simulen el contenido de alcohol presente en las vinazas (menor al 10%) para estudiar su efecto en la síntesis de los productos concernientes a este trabajo. La disponibilidad de oxígeno en el cultivo seguramente será mayor en un medio sintético que en uno preparado con vinazas, pues estas contienen entre 31-119 g/l de sólidos disueltos (Friedrich y Cimerman, 1992), por tal razón es importante estudiar la influencia de este parámetro en este tipo de cultivos, así como el efecto que tiene la presencia de azúcar en la síntesis de acetato de etilo y acetaldehído. Por otro lado, el dar un uso a este residuo permite tecnologías más limpias para relacionarlo con la tasa de eliminación de alcohol.

Además de realizar pruebas con distintos medios de cultivo, se hace necesario probar distintas formas de manipulación del cultivo, como por ejemplo, es interesante tratar con cultivos por lote y por lote alimentado.

Por tales razones, es necesario realizar un estudio descriptivo de la producción de estos metabolitos que incluya el efecto de las condiciones del medio de fermentación y brindar información que permita predecir la manipulación de las condiciones de operación para la producción de acetato de etilo y/o los metabolitos que se asocian a su síntesis.

OBJETIVO GENERAL

Describir el proceso de producción de acetato de etilo y acetaldehído por *Candida utilis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener información sobre la capacidad de *C. utilis* para producir acetato de etilo en cultivos por lote utilizando dos fuentes de carbono distintas: glucosa y etanol.

Identificar si *C. utilis* tiene capacidad para producir otros ésteres

Estudiar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en un medio líquido sobre la producción de acetato de etilo y acetaldehído

Realizar estudios en un cultivo por lote alimentado sobre la producción de estos dos metabolitos

Establecer los balances de materia de este cultivo

Proponer un modelo de síntesis del éster por esta levadura empleando etanol como sustrato.

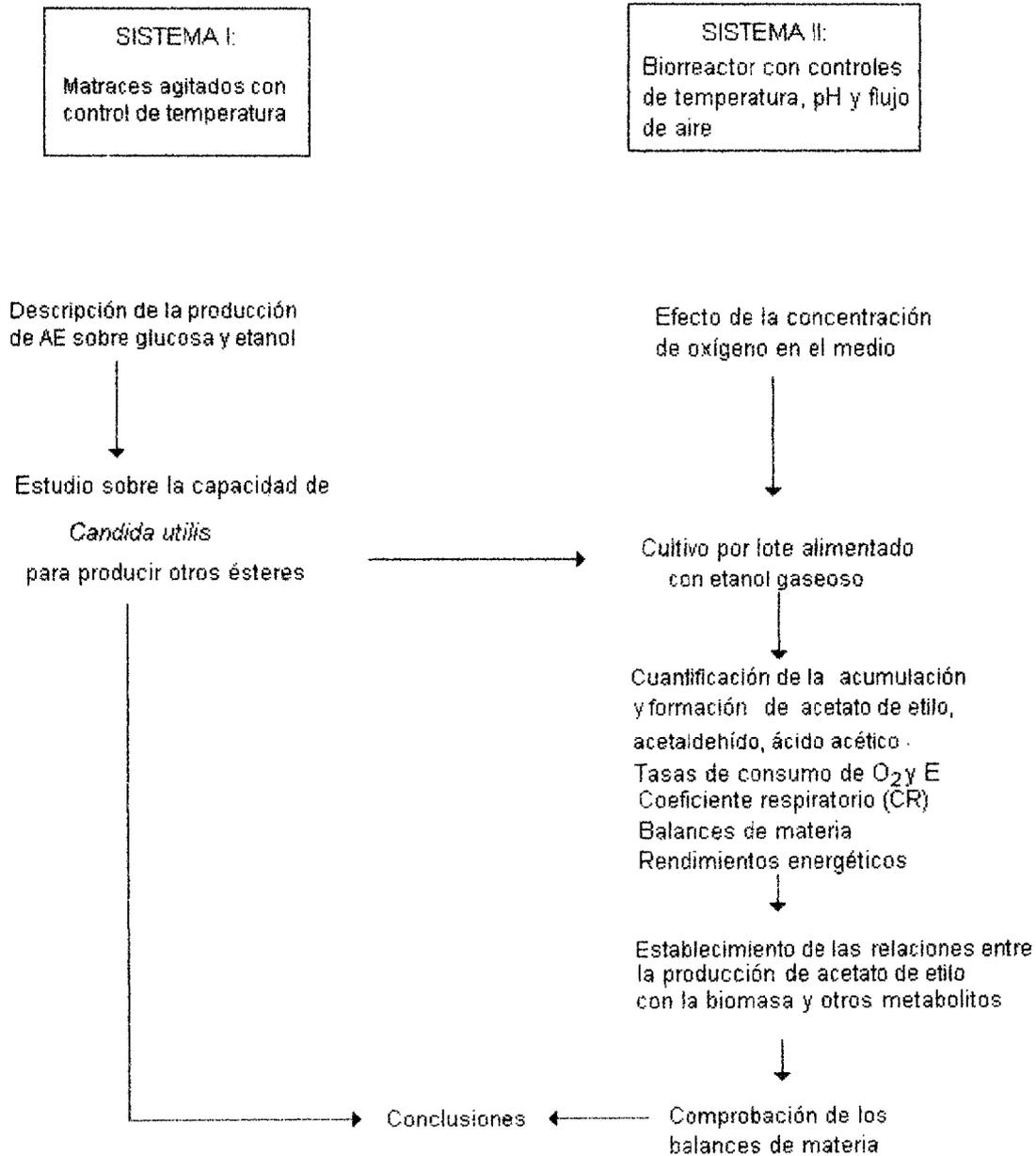
METAS

Aportar información relacionada a la producción de aditivos alimenticios de origen natural.

Contribuir al desarrollo de métodos biológicos de eliminación y recuperación de alcohol en disoluciones a baja concentración.

ESTRATEGIA METODOLÓGICA.

Para cumplir con los objetivos propuestos, el trabajo experimental se efectuó de acuerdo al siguiente diagrama



Capítulo 2:

Material y Métodos

2.1. Materiales y medio de cultivo.

Microorganismo. En todos los experimentos se trabajó con la levadura *Candida utilis* ATCC 9950 comprada al Cepario Nacional del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, preservada en placas de agar-papa-dextrosa a 4°C y resembrada cada cuatro meses.

Medio de cultivo En este estudio se utilizó el medio mineral limitado en Fe^{3+} propuesto por Thomas y Dawson (1978), pero se modificó respecto a la fuente de carbono (glucosa o etanol en concentraciones variables). La composición en minerales fue: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 18.9 mM; KH_2PO_4 , 18.4 mM; MgSO_4 , 2.0 mM; CaCl_2 , 0.4 mM; elementos traza: ZnSO_4 , 87.0 μM ; MnCl_2 , 20.0 μM ; CuSO_4 , 10.0 μM ; Na_2MoO_4 , 1.65 μM ; CoCl_2 , 1.68 μM ; H_3BO_3 , 24.0 μM ; KI , 1.80 μM . El valor de pH se mantuvo en 6.0 (excepto cuando se indique).

Estudio del consumo de glucosa. El medio para producir acetato de etilo contenía 24 g/l de glucosa y sales.

Incremento en la concentración de etanol al terminarse la glucosa. Con el fin de probar que una concentración elevada de etanol en el medio puede mejorar la producción de acetato de etilo, se realizó otro experimento adicionando etanol como segunda fuente de carbono, una vez que la levadura estuvo adaptada a la presencia de alcohol (acumulado durante la degradación del azúcar).

Efecto de la concentración relativa de oxígeno disuelto (%OD). Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con solución salina isotónica dos veces para inocularse en el reactor del sistema II (descrito en el siguiente apartado) con una concentración inicial de etanol de 15 g/l. Se manejaron distintas velocidades de agitación (200 y 500 rpm) con una aereación de 0.02 VVM para conseguir distintas concentraciones de oxígeno. El seguimiento de la fermentación se llevó hasta 65 horas de crecimiento de *C. utilis* sobre etanol.

Capacidad de Candida utilis para producir otros ésteres. En esta sección se estudió la capacidad *C. utilis* para formar otros ésteres en presencia de butanol, etanol, ácido acético y ácido butírico, todos en una concentración de 20 mM. Se realizaron experimentos en el sistema I, con células en fase estacionaria, adaptadas a utilizar etanol procedentes de las fermentaciones para producir acetato de etilo ("resting cells"), éstas fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en buffer de fosfatos 0.2 M pH 5.5.

Preparación de inóculo. Para realizar las fermentaciones se propagaron las células de levadura en un medio líquido con 20g/l de glucosa y 20 g/l de extracto de malta (Christen y col, 1999). Las células se incubaron a 30°C durante 36 horas. Se utilizó un inóculo del 10% con una concentración celular de 3×10^8 cel/ml en todas las fermentaciones.

2.2. Dispositivos experimentales.

Se trabajó con dos sistemas de fermentación de distintos volúmenes, empleando el medio mineral, en el primero se estudiaron los rendimientos de *Candida utilis* creciendo sobre glucosa y etanol, también en este sistema se hicieron los estudios respecto a la producción de otros ésteres. En el segundo, se obtuvieron resultados para consumo de etanol, en este sistema se vio el efecto del oxígeno en la producción de acetato de etilo y metabolitos asociados.

Sistema I. Este dispositivo consistió de matraces erlenmeyer de 125 ml, éstos estuvieron tapados con roscas de baquelita para limitar el intercambio gaseoso. El volumen de medio en cada uno fue de 50 ml (lo que da una relación espacio gaseoso/volumen de medio = 1.5). Los matraces se agitaron a 200 rpm en un baño de temperatura controlada (30°C, v. fig. 2.1).

Sistema II. Este sistema consistió en un tanque agitado con controles de pH y temperatura modelo BIOFLO III (New Brunswick) con un volumen de trabajo de 2-2.5 litros acoplado a un sistema de condensación de volátiles (de -8°C a -4°C). La temperatura se mantuvo a 30°C y el pH se mantuvo a un valor de 6.0. Se variaron las velocidades de agitación. En algunos casos, el sistema fue alimentado con una corriente gaseosa de etanol (v. fig. 2.2).

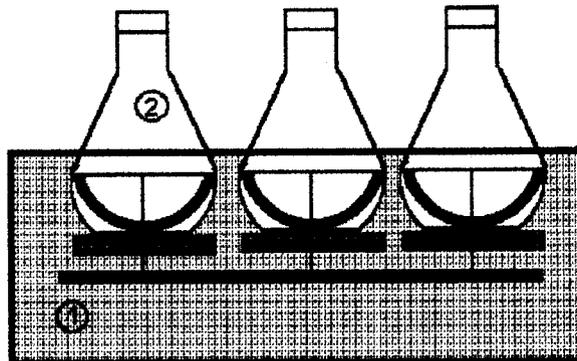


Fig. 2.1. Arreglo experimental del SISTEMA I. 1= baño de temperatura controlada, 2= matraces de 125 ml.

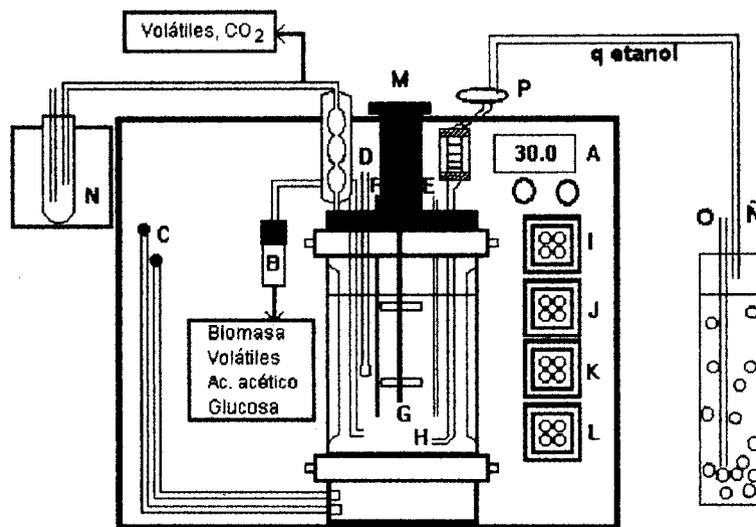


Fig. 2.2. Arreglo experimental del Sistema II. A = PÁNEL DE CONTROL. B= TOMA DE MUESTRA. C= CONTROL DE TEMPERATURA. D= SONDA DE pH. E= SONDA DE OXÍGENO. F= TERMOPAR. G= PROPELA. H= ENTRADA DE AIRE (O ETANOL/AIRE). I= BOMBA DE ADICIÓN DE NUTRIENTE. J= BOMBA DE ADICIÓN DE ANTIESPUMANTE. K=BOMBA DE ADICIÓN DE ÁCIDO. L = BOMBA DE ADICIÓN DE BASE. M =MOTOR. N =TRAMPA DE CONDENSACIÓN DE VOLÁTILES. Ñ= SUMINISTRO DE ETANOL. O= ENTRADA DE AIRE (PUEDE PASAR O NO POR EL ETANOL). P= FILTRO DE AIRE

2.3. Métodos analíticos

Las muestras líquidas se centrifugaron, al sobrenadante se le hizo medición de volátiles, ácido acético y azúcares reductores; a la biomasa empacada se le lavó con solución salina isotónica una vez y otra con agua destilada para luego determinarle peso seco en membranas de polisulfona con aberturas de 0.5 μ m. Otra pequeña parte de las muestras se utilizó para hacer conteo al microscopio y determinar la tasa de mortalidad.

Cuantificación de la biomasa. La biomasa se estimó por peso seco después de 24 horas a 70°C y cuenta al microscopio.

Determinación de la tasa de mortalidad. La tasa de mortalidad M (%) de las células de levadura es estimada por cuenta al microscopio después de una tinción con azul de metileno de acuerdo al método propuesto por Christen y col. (1999)

Medición de volátiles. El etanol, butanol, acetato de etilo y acetaldehído se midieron por cromatografía de gases (HP-5890.SERIE II) con un detector de ionización a la flama, empleando una columna PORAPAK Q para su separación. El flujo del gas acarreador (N₂) fue de 35 ml/min, la temperatura del horno, de 170°C. Para la fase líquida se utilizó isopropanol al 0.5% (v/v) como estándar interno. Se hicieron inyecciones de 0.5 μ l. La fase gaseosa requirió del empleo de ampollas ALTECH de 500 ml con un volumen de inyección de 50 μ l (v. apéndice B).

Respirometría. De las ampollas también se midió la concentración de dióxido de carbono y oxígeno a la salida del reactor en el Sistema II. Estos últimos gases se cuantificaron por cromatografía de gases con un equipo Gow-Mac (USA); este equipo cuenta con un detector de conductividad térmica y una columna doble tipo CTR-1 (Alltech, USA). Los cálculos se detallan en el apéndice B. El gas acarreador utilizado fue helio (flujo, 60ml/min). El coeficiente respiratorio (CR) se expresa como la tasa de producción de CO₂/tasa de consumo de oxígeno. El volumen de inyección fue de 100 μ l.

Cuantificación de glucosa. La glucosa se midió por el método del ácido 2,4-dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores propuesto por Miller (1959) empleando una solución patrón de 0-1 g/l de glucosa (v. apéndice B).

Cuantificación de ácido acético. El ácido acético se determinó por cromatografía de líquidos usando un cromatógrafo Hewlett Packard 1081, equipado con un detector UV ($\lambda = 210$ nm). La separación se realizó con una columna de Aminex HPX 87H (Bio-Rad, USA). La temperatura del horno fue de 65°C y una solución 6mM de ácido sulfúrico se utilizó como eluyente a un flujo de 0.8 ml/min, detalles en el apéndice B.

2.4. Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento, parámetro cinético que indica cambios metabólicos, se determinó de manera gráfica, tomando los resultados de crecimiento a distintos tiempos y calculándola con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

2.5. Cultivo por lote alimentado.

Esta sección incluye el estudio de la producción de acetato de etilo y acetaldehído en el sistema II alimentado continuamente con etanol en fase gaseosa a distintas concentraciones de sulfato de amonio para obtener distintas concentraciones celulares. La velocidad de alimentación de etanol varió, dependiendo de la concentración de alcohol en el medio (no superior a 25 g/L). Se realizaron mediciones de las concentraciones de volátiles a la entrada y salida del reactor, así como dentro de éste. La velocidad de agitación se mantuvo entre 300 y 500 rpm.

Caso 1. Se manejó el medio mineral con una concentración inicial de sulfato de amonio de 10 g/L para limitar la biomasa hasta un máximo de 26 g/L. La alimentación de alcohol

en fase gaseosa fue de 0.6 g etanol/h/litro de medio. Cuando el etanol se agotó en el medio fue necesaria la adición de pulsos de etanol (10 g/L). El volumen de medio de cultivo en el reactor se mantuvo en 2.3 litros.

Caso 2. La concentración inicial de sulfato de amonio en el medio mineral fue de 5 g/L para limitar la formación de biomasa hasta un máximo de 13 g/L. La alimentación de vapores de etanol manejada fue 0.63 g/h/litro de medio. El volumen de medio de cultivo en el reactor se mantuvo entre 2 y 2.1 litros.

Caso 3. El medio mineral se ajustó a 4 g/L de sulfato de amonio para limitar la formación de biomasa hasta 10 g/L. La alimentación de vapores de etanol manejada fue 2 g/h/litro de medio. El volumen de medio de cultivo en el reactor se mantuvo entre 2 y 2.1 litros.

Capítulo 3:

Cultivo por lote: resultados y análisis

3.1. Cultivo por lote para la producción de acetato de etilo: efecto de la presencia de glucosa y etanol.

En el capítulo de antecedentes, se puso de manifiesto que la producción de acetato de etilo por levaduras se presenta cuando hay 3g/L de azúcar en el medio de cultivo (Kallel-Mhiri y col., 1993), otros autores encuentran que el consumo de etanol para producir acetato de etilo ocurre en ausencia de azúcares (Williams y col., 1988; Murray y col., 1988) o bien que sólo es función del alcohol disponible en el medio (Armstrong y col., 1984 a y b; Armstrong, 1988). En este estudio con *C. utilis* se probaron estas dos observaciones mediante los dos experimentos siguientes.

Cultivo sobre glucosa. Con el objeto de estudiar la producción de acetato de etilo, *C. utilis* se inoculó en un cultivo por lote (sistema I) con glucosa como fuente de carbono a una concentración inicial de 24 g/l. En las primeras cinco horas se presentó la máxima velocidad específica de crecimiento sobre este sustrato (0.166 h^{-1}). El azúcar se agotó a las 25 horas, con una tasa de consumo de 0.96 g/l/h; hasta este punto, el rendimiento de biomasa respecto a glucosa fue de 0.208 g/g. A las 30 horas se detuvo el crecimiento y se midió la máxima concentración de etanol (8g/l), dando un rendimiento de 0.33 g etanol/g glucosa. Los trabajos de Laplace y col. (1991) para otras levaduras creciendo sobre este mismo sustrato dieron rendimientos distintos, para *Pichia stipitis*, ellos obtienen un rendimiento de biomasa sobre glucosa de 0.2 g/g y 0.4 g etanol/g glucosa; en sus experimentos con *Saccharomyces cerevisiae*, estos rendimientos son de 0.1 g/g para biomasa y 0.43 g/g para alcohol. Esta diferencia sugiere que la cantidad de biomasa formada depende en gran medida de la disponibilidad de oxígeno u otros parámetros no considerados. Comparativamente, *C. utilis* es un microorganismo con mayor capacidad de crecimiento sobre glucosa, pero con menor actividad fermentativa. En la figura 3.1 se muestra esta situación. En este gráfico, puede notarse que la producción de acetato de etilo se dio a partir de que se detuvo el crecimiento y en ausencia de glucosa. Como proponen los trabajos de Armstrong y col. (1984 a y b) y los de Bol y col. (1987), la enzima alcohol acetil transferasa (AAT) es responsable de la esterificación del alcohol, y aparentemente sólo actúa en ausencia de azúcar, cuando la única fuente de carbono para las levaduras es el etanol, este trabajo apoya tal propuesta. Sin embargo, la detención del crecimiento una vez que se alcanzó el nivel

máximo en la concentración de alcohol y dio inicio la síntesis del éster no concuerda con la propuesta de Yoshioka y Hashimoto (1984 b) y Kallel-Mhiri y col. (1993), quienes sugieren que esta enzima juega un papel importante en la regulación de la formación de células o en el crecimiento de las levaduras mediante el consumo de acetil-CoA para producir ácido cítrico como uno de los precursores de la gluconeogénesis (Lehninger, 1984). A partir de que se midió la concentración máxima de alcohol (30 horas) y hasta las 55 horas (tiempo en el cual se alcanzó la máxima concentración de acetato de etilo (0.9 g/l), la velocidad de consumo del primero llegó a 0.2 g/l/h, dando un rendimiento de 0.18 g acetato/g etanol. La baja concentración de éster puede explicarse porque el sistema de fermentación no fue hermético y pudieron darse pérdidas por evaporación, pero no se descarta que las levaduras requieran concentraciones mayores de etanol para producir el acetato de etilo.

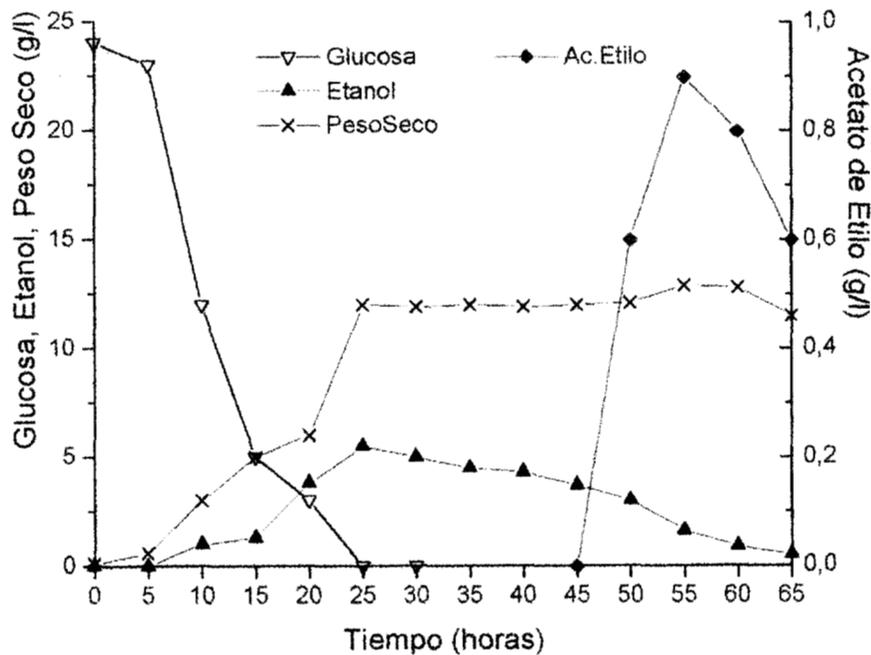


Fig. 3.1. Crecimiento, consumo de sustratos y formación de acetato de etilo para *Candida utilis* empleando glucosa como primera fuente de carbono en el Sistema I.

Cultivo sobre glucosa con alimentación de alcohol. La levadura se cultivó por lote bajo las mismas condiciones del apartado anterior. La velocidad de consumo de glucosa fue la misma y el rendimiento de etanol similar (0.29 g/g). La máxima velocidad específica de

crecimiento sobre el azúcar fue la misma (0.166 h^{-1}) a las diez horas. Pero, al agotarse la glucosa, se adicionó un pulso de etanol (aproximadamente se aumentó el nivel en 10 g/l) para mejorar los rendimientos del éster. La figura 3.2 muestra la producción de acetato de etilo y biomasa bajo estas condiciones. Se dio un aumento en la producción de acetato de etilo, la máxima concentración medida a las 45 horas (5 g/l) fue casi seis veces mayor que en el caso anterior, dando un rendimiento de 0.5 g acetato de etilo/ g etanol.

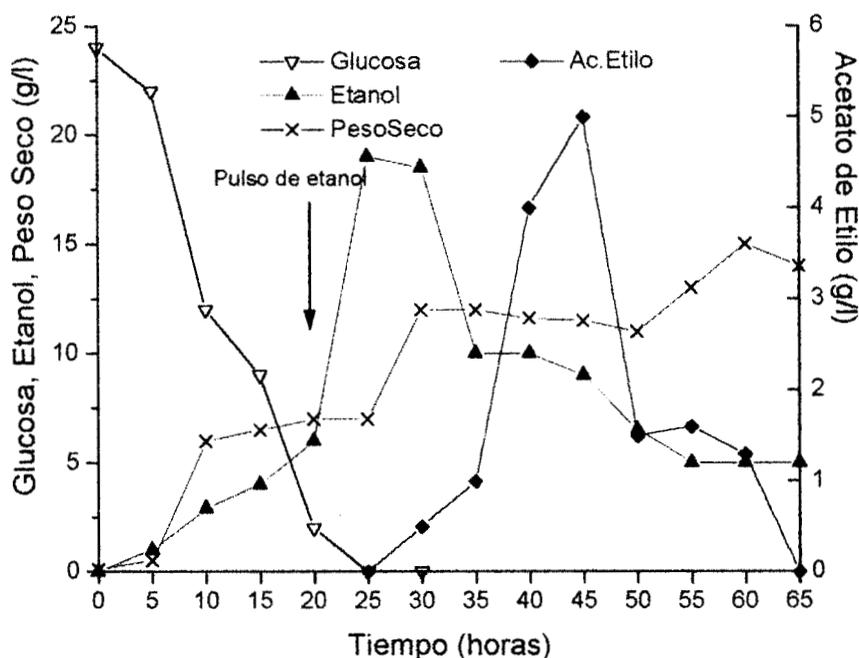


Figura 3.2. Crecimiento, consumo de sustratos y formación de productos para *Candida utilis* empleando glucosa como primera fuente de carbono. La flecha indica la adición de etanol al terminarse la glucosa en el Sistema I.

Aunque la concentración de alcohol hasta que se agotó el azúcar fue prácticamente similar (9 g/l), este nivel no es suficiente para acelerar la producción de éster; los resultados de Armstrong y col. (1984 a y b) y de Armstrong (1988) concuerdan con este estudio, ellos sugieren que un cambio en el nivel de etanol desde 10 hasta 35 g/l mejora sensiblemente la producción de acetato con un aumento en el rendimiento de 0.11 a 0.24 g/g , respectivamente. Williams y col. (1988) reportan un rendimiento de éster mayor

(0.75) pero para un cultivo por lote alimentado continuamente. El consumo de etanol de las 25 a las 65 horas fue de 0.35 g/l/h y el rendimiento de biomasa respecto al alcohol de 0.25 g/g. En la figura 3.2 puede observarse una diauxia en el crecimiento, es decir, la concentración celular comienza a aumentar después de una segunda etapa de adaptación, en este momento, las células de levadura emplean el etanol para formar material celular. Al final del proceso, después de las 40 horas se presentó una caída en las concentraciones de etanol y acetato de etilo, esto puede explicarse por un ligero aumento en el crecimiento (se ve un aumento en la concentración de biomasa, aunque ésta baja después, probablemente por envejecimiento del cultivo). Al comparar el cultivo con glucosa y el cultivo con glucosa y etanol, la adición de alcohol al terminarse el azúcar aumenta los rendimientos de acetato de etilo en aproximadamente 180%. Esto indica que es recomendable manejar altas concentraciones de alcohol para que la levadura produzca el éster; sin embargo, debe cuidarse que su acumulación no rebase niveles de 35 g/l con el fin de evitar su toxicidad para las células (Prokop y col., 1978). La tabla 3.1 resume los resultados para la producción de acetato de etilo y etanol en diferentes estudios.

Con la información de esta sección es posible inferir que la adición de etanol al medio de cultivo mejora los rendimientos de acetato de etilo de 0.18 a 0.5 y que la síntesis de acetato de etilo ocurre cuando no hay glucosa. Aparentemente, de acuerdo a la figura 3.2, la síntesis del acetato parece asociada a la proliferación de *Candida utilis* sobre etanol.

Como en las figuras 3.1 y 3.2 se ve una disminución de la concentración de acetato de etilo en el medio de cultivo, surgió la idea de que este metabolito puede ser utilizado como fuente de carbono por la levadura de nuestro interés. Además, se conoce la presencia de una esterasa en las levaduras capaz de descomponer el acetato de etilo (Davies, 1951; Yoshioka y Hashimoto; 1981; Yoshioka y Hashimoto, 1984), por tal razón, se realizó una prueba de su consumo y se verificó si en *C. utilis* esta enzima presenta una actividad considerable a valores de pH entre ligeramente ácidos y neutros (5-7), para este estudio se probó que no se presenta consumo del éster por la levadura.

Tabla 3.1. Rendimientos de algunos productos formados durante el crecimiento de levaduras

Levadura	Sustrato	Rendimientos (g/g)				μ (h^{-1})	Referencia
		$Y_{X/azúcar}$	$Y_{E/azúcar}$	$Y_{X/E}$	$Y_{AE/E}$		
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactosa	0.19	0.3	0.3	0.0	-	Kallel-Mhiri y col., 1993
	Lactosa y etanol				0.07	-	
<i>Pichia stipitis</i>	Glucosa	0.2	0.4				Laplace y col. (1991)
		0.1	0.43				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa						
<i>Candida utilis</i>	Etanol	-	-	-	0.24	-	Armstrong y col. (1988)
<i>Candida utilis</i>	Etanol				0.13 y 0.19	-	Corzo y col., 1994
<i>Candida utilis</i>	Etanol				0.75	-	Williams y col., 1988
<i>Candida utilis</i>	Etanol			0.23	0.076	-	Christen y col., 1999 Domenech y col., 1999
<i>Candida utilis</i>	Glucosa	0.208	0.333	0.00	0.18	0.166	Este estudio
<i>Candida utilis</i>	Glucosa y etanol	0.25	0.29	0.25	0.52	0.03 *	Este estudio

X= peso seco, E= etanol, AE= acetato de etilo, * se refiere a la velocidad para crecimiento sobre etanol.

3.2. Estudios sobre la capacidad de *Candida utilis* para producir otros ésteres.

La producción natural de ésteres por levaduras puede seguir dos vías principalmente: por medio de células en suspensión o inmovilizadas y por vía enzimática (Gatfield, 1988; Williams y col., 1988; Welsh y Williams, 1990). Se han realizado estudios en levaduras de metabolismo fermentativo (*Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae*, *Hansenula*

anomala) donde se reconoce que la biosíntesis de acetoésteres tales como el acetato de isoamilo y acetato de etilo ocurre por la esterificación de alcoholes con acetil-CoA y un extracto enzimático de AAT (Yoshioka y Hashimoto, 1984 a). En este trabajo se estudió la posible capacidad de esterificación de células de *C utilis* provenientes del sistema II, en presencia de dos alcoholes (etanol o butanol) y dos ácidos (acético y butírico). La tabla 3.II concentra las condiciones a las que se realizaron estos experimentos y sus resultados. También se observó el efecto del medio de cultivo donde creció el microorganismo, después de su separación (sobrenadante), el efecto del medio salino empleado (sin sulfato de amonio) en todos estos estudios, así como el efecto del empleo de etanol o ácido acético como únicas fuentes de carbono. La conversión representada en este cuadro se basa en el rendimiento teórico global según la reacción general: $2C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3CO_2C_2H_5OH + H_2O$ para la producción de acetato de etilo (Armstrong y col., 1984 a).

Tabla 3.II. Diseño experimental para el estudio de esterificación de *Candida utilis*

No. experimento	E	AA	X	S	N ₂	Sales	% conversión (1)	Δ PS (2)	% de conversión específico (1)/(2)
1(24 h)*	+	+	+	-	+	+	8.5	3.5	2.4
2(24 h)*	+	-	+	-	+	+	1.3	0.8	1.6
3(24 h)*	-	+	+	-	+	+	1.6	0.8	2.0
4(18 h)**	+	+	+	-	-	+	0.0	0.5	0.0
5(48 h)**	+	+	+	-	-	+	0.0	0.7	0.0
6(48 h)**	+	+	+	-	+	+	1.9	0.7	2.7
7(48 h)**	+	+	+	-	-	-	0.0	0.4	0.0
8(48 h)	+	+	-	+	-	+	7.7	Nd	nd

E= etanol (20mM), AA=ácido acético (20mM), X=biomasa, S=sobrenadante, ΔPS= Xfinal-X inicial (g/l). (*) biomasa inicial: 14.53 g/l. (**) biomasa inicial: 5.5 g/l. pH inicial: 5.5. Todas las corridas se compararon contra controles sin biomasa. Nd= no determinado

Los resultados indican que la capacidad de esterificación de *C. utilis* parece limitada sólo al acetato de etilo, pues los resultados para butanol y ácido butírico fueron negativos (datos no incluidos en la tabla). Probablemente la enzima AAT responsable de la producción de acetato de etilo por *C. utilis* sea más específica para acetato que la producida por las levaduras de metabolismo esencialmente fermentativo estudiadas por otros investigadores. Por otro lado, en el experimento 1 se presentó un aumento

considerable en la concentración celular (3.5 g/l) y éste coincide con la mayor conversión (8.5 %), en el caso del experimento 8 (en el cual no se emplearon células sino únicamente el sobrenadante) también se midió una conversión considerable (7.7 %). Esto sugiere que la AAT es excretada al medio de cultivo durante el crecimiento de *Candida utilis* sobre etanol y requiere de la presencia de acetato para la esterificación. En contraste, para los casos en que no se presentó un crecimiento considerable (experimentos 2-7), la conversión a acetato de etilo fue mínima.

3.3. Efecto de la concentración relativa de oxígeno (%OD) en la síntesis de acetato de etilo

La síntesis del acetato de etilo por diferentes cepas de levadura tales como *C. utilis*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum* y *K. fragilis* es afectada en gran medida por el nivel relativo de oxígeno disuelto (%OD) (Armstrong y col., 1984 b; Yoshioka y Hashimoto, 1984 b; Kallel-Mhiri y col., 1993). En esta sección del trabajo se presentan los resultados de la realización del estudio de la influencia del %OD en la producción de acetato de etilo, con este fin se experimentó en el sistema II manejando dos velocidades de agitación (200 y 500 rpm), un volumen de 2 litros y un gasto de aire de 24 l/h (0.2 VVM) a fin de asegurar distintos niveles de OD. Cabe señalar que el nivel relativo de oxígeno en el medio debe mantenerse arriba del 0.7% (0.05 mg/L) para evitar un cambio en la composición de la membrana celular de *C. utilis* que pueda ocasionar daño a las células (Brown y Rose, 1969). Con la agitación baja, a partir de las 30 horas el oxígeno disuelto en el medio se mantuvo alrededor de 10%, en el caso de agitación elevada, la disolución de oxígeno estuvo arriba de 90% la mayor parte del proceso. El seguimiento se llevó hasta 65 horas de crecimiento de *C. utilis* sobre etanol. En la figura 3.3 se presentan el consumo de alcohol, crecimiento y producción de acetato de etilo.

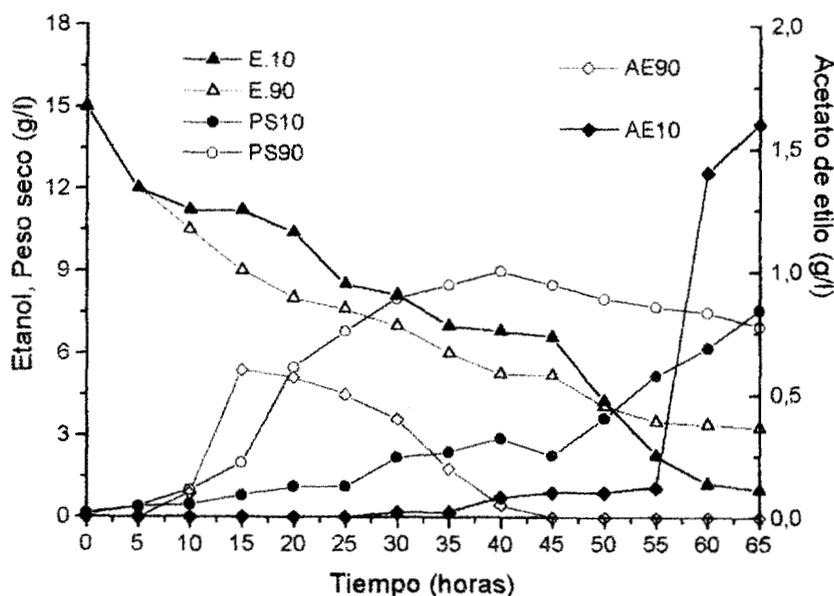


Figura 3.3. Consumo de etanol, crecimiento y producción de acetato de etilo a distintos niveles de oxígeno disuelto. Aireación = 0.2 VVM. Sistema II. Los símbolos sólidos se refieren a un nivel relativo de oxígeno de 10% y los huecos a un nivel de 90%.

Respecto al crecimiento, en las primeras 40 horas, prácticamente se consiguió el doble de biomasa para el experimento con 90% de oxígeno y la velocidad específica de crecimiento calculada tuvo un valor constante de 0.12 h^{-1} las primeras 20 horas, a diferencia del otro caso en que este parámetro mantuvo sus valores más altos entre 0.06 y 0.08 h^{-1} . No obstante esta diferencia en las velocidades de crecimiento, a las 65 horas la concentración de biomasa fue muy parecida, ya que la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo en ambos casos fue la misma. Los rendimientos de biomasa para los dos procesos tuvieron valores arriba de 0.5 g de células/g alcohol y fueron casi dos veces mayores que en el proceso con glucosa y etanol del apartado 3.1 (0.25 g células/g etanol). Pese a ser elevados, estos valores son inferiores a los reportados por Bailey y Ollis (1986) para esta levadura creciendo sobre etanol bajo condiciones aeróbicas ($Y_{X/E} = 0.68$).

Atendiendo el comportamiento del acetato de etilo para la concentración relativa de oxígeno del 90% (aproximadamente 7.2 mg/L), se alcanzó un máximo de 0.6 g/L cuando la pendiente de la curva de crecimiento fue más pronunciada - de las 15 a las 20 horas -,

representando un rendimiento bajo (0.33 g/g). Cuando el oxígeno disuelto se mantuvo apenas arriba de 10% (0.8 mg/L) la mayor parte del tiempo, se dio la transformación del alcohol al éster hasta alcanzar 1.6 g/l. Sin embargo, esta concentración representa un rendimiento aún más bajo (0.11 g/g).

La tendencia en el consumo de etanol no es la misma para ambos casos. Al principio es mayor la disminución de alcohol para un nivel relativo de oxígeno de 90%, sin embargo, la velocidad de consumo global fue mayor en el experimento con un nivel de oxígeno del 10% (0.215 g/l/h, v. tabla 3.III).

Tabla 3.III. Rendimientos y velocidad de consumo de alcohol para *Candida utilis* creciendo en etanol a dos niveles de oxígeno en el medio.* Hasta 15 horas, tiempo en que se alcanzó la máxima concentración de acetato. ** Hasta las 65 horas

Oxígeno Disuelto, %	Agitación, rpm	$Y_{AE/E}$, g/g	$Y_{X/E}$, g/g	q_E , g/l/h
10**	200	0.11	0.53	0.215
80*	500	0.1	0.33	0.400
90**	500	0	0.58	0.114

$Y_{AE/E}$ se refiere al rendimiento de acetato de etilo respecto al etanol consumido, $Y_{X/E}$ es el rendimiento de biomasa respecto del etanol y q_E es la tasa de consumo de alcohol.

Al parecer, a concentraciones de oxígeno cercanas al 90%, el consumo de etanol se da, independientemente de si éste es utilizado para crecimiento o síntesis del éster; pero analizando que los rendimientos para la formación de biomasa a las 65 horas (tabla 3.III) son prácticamente iguales en los dos casos, puede esperarse que el carbono del etanol se haya orientado a la producción de acetaldehído o acetoína, como lo proponen Kuriyama y Kobayashi (1993) por el aumento en la concentración de oxígeno. En el siguiente capítulo se plantean las bases para realizar los balances de carbono que permitan inferir la fórmula molecular de otros metabolitos no medidos en el proceso. Los niveles superiores de acetato de etilo se obtienen arriba de 10% de OD y debajo de 80%. Estos resultados indican que el nivel de oxígeno disuelto influencia la síntesis de acetato de etilo por *Candida utilis* y concuerdan con los obtenidos por Bol y col. (1987), quienes reduciendo la tasa de aireación incrementan la productividad del éster por *Hansenula anomala*, pero no la de biomasa, e incrementando la tasa de aireación por arriba de 0.2 VVM tienen un aumento en el crecimiento y una baja en la acumulación de acetato en el medio.

El análisis de los resultados para los estudios realizados en cultivos por lote permite hacer, hasta el momento, las siguientes conclusiones:

- no es necesaria la presencia de azúcar en el medio de cultivo para que se de la producción de acetato de etilo por *C. utilis*;
- también queda claro que es básico mantener la concentración de etanol a un nivel superior a 10 g/L en el medio de cultivo para que se den mejores rendimientos de éster;
- con el fin de que la concentración del éster no se vea disminuida, deberá implementarse un sistema para condensación de volátiles y de esa forma recuperar el acetato de etilo evaporado del reactor; y finalmente

C. utilis no presenta capacidad para producir otros ésteres distintos al acetato de etilo.

Tomando en cuenta la información presentada en este capítulo, se realizaron experimentos en un cultivo por lote alimentado, con el propósito de mejorar la producción del éster y los metabolitos que se asocian de manera inherente a la misma. La información a este respecto se presenta en el siguiente capítulo.

Capítulo 4:
Cultivo por lote alimentado: resultados y
análisis

4. Sistema alimentado continuamente con etanol

Esta sección incluye el estudio de la producción de acetato de etilo y acetaldehído en el sistema II alimentado continuamente con etanol en fase gaseosa a distintas concentraciones de sulfato de amonio para obtener distintas concentraciones celulares. El análisis de estos resultados se divide en distintas partes para facilitar la comprensión global de los fenómenos ocurridos. Primero se presenta la descripción del crecimiento, producción de metabolitos y acumulación de alcohol en el reactor para cada uno de los casos separadamente y después se comparan las velocidades de consumo de sustratos (etanol y oxígeno) para inferir alguna interacción o tendencia entre ambos, y que pueda ser útil en el manejo del sistema; comparándolo como un filtro para eliminación de alcohol. En esta sección se analiza también el coeficiente respiratorio.

4.1. Descripción de la acumulación de productos y consumo de sustratos por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado

Caso 1 (alimentación de alcohol = 0.6 g/L/h)

Se alcanzaron concentraciones de acetato de etilo hasta de 13 g/L con una biomasa de 18 g/L (fig. 4.1), se puede observar que un aumento en la concentración de alcohol (pulsos) junto a una elevación en el nivel de oxígeno disuelto (fig. 4.2) en el medio de cultivo aumenta el rendimiento del éster. En estos dos gráficos puede apreciarse que la densidad celular mantuvo durante las primeras horas la misma tendencia que el peso seco. El nivel relativo de oxígeno disuelto estuvo abajo de 10%. La producción de acetato de etilo siguió los patrones de formación de biomasa y de ácido acético (segundo intermediario del catabolismo del etanol), por lo que se puede suponer que la síntesis del acetato de etilo está fuertemente asociada al crecimiento de *Candida utilis* sobre etanol. Aunque la concentración de acetaldehído en el medio fue baja (menos de 1 g/L), después que se detiene el crecimiento de la levadura, se da un aumento en las concentraciones de éste y el ácido acético en el medio, lo que indica que este intermediario de la oxidación de etanol es consumido en cuanto aparece y puede

acumularse una vez que termina el crecimiento, esto explica a su vez las bajas concentraciones de oxígeno en algunos puntos de la fermentación, indicando que el gas se consume y no que el sistema está limitado, pues al aumentar la formación de aldehído, se da un pequeño aumento en la concentración de oxígeno. Esto no es sorprendente ya que el carbono en los aldehídos presenta un menor número de oxidación que en los ácidos carboxílicos y sus derivados.

Prácticamente no hubo pérdidas de volátiles a la salida del condensador (-8°C). La tasa de mortalidad se mantuvo alrededor de 10% las primeras 25 horas después subió hasta un 40%.

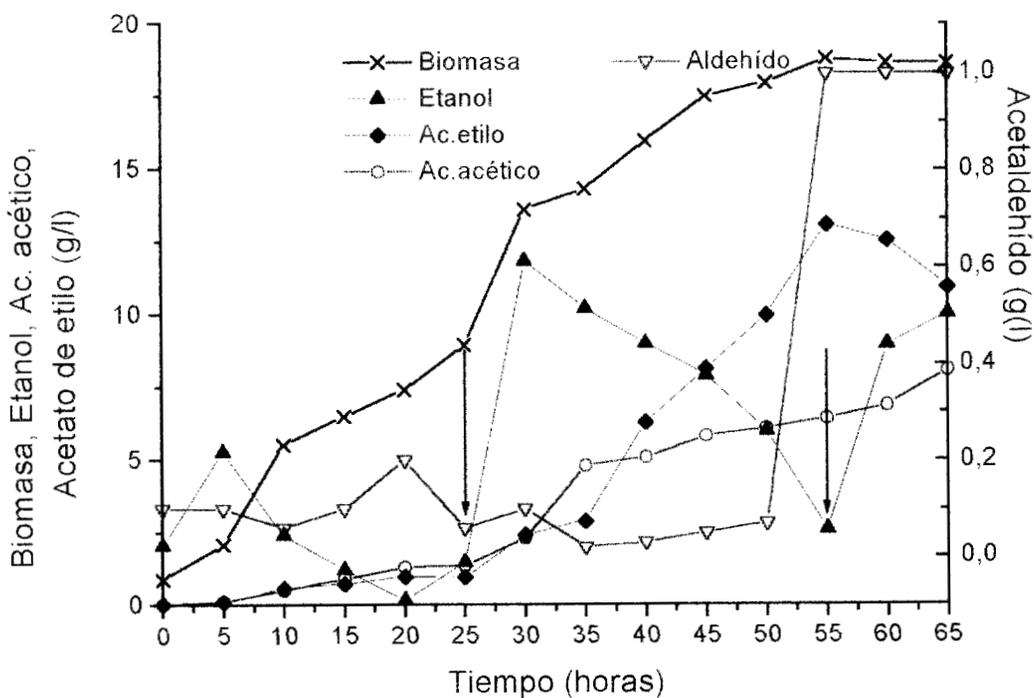


Fig. 4.1. Concentración de biomasa, alcohol y metabolitos en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado. Caso 1. Las flechas indican adición de alcohol (10 g/L) a las 20 y 55 horas.

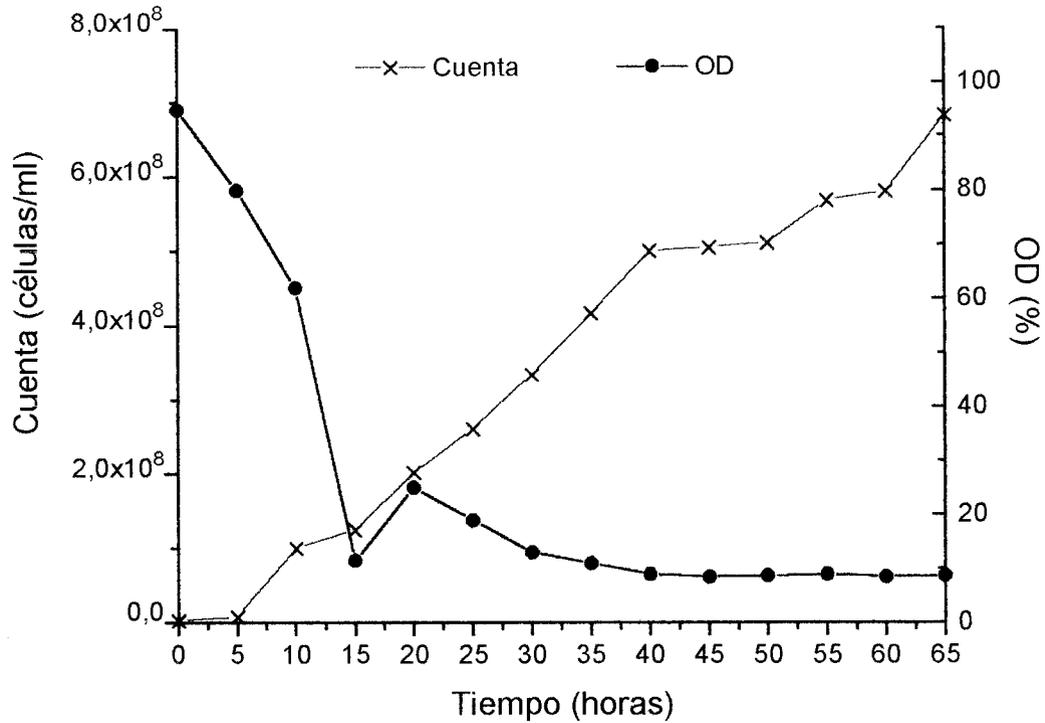


Fig. 4.2. Densidad celular y nivel relativo de oxígeno en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado. Caso 1.

Caso 2 (alimentación de alcohol = 0.63 g/L/h)

En este experimento la biomasa llegó al valor máximo teórico de alrededor de 13 g/L, en este caso se obtuvo más de la mitad de la biomasa que en el experimento anterior, que coincide con la máxima concentración de acetato de etilo en el reactor (3.6 g/L, fig. 4.3). Se mejoró la disolución de oxígeno (el nivel relativo se mantuvo entre 20 y 80%, fig. 4.4); es notable que el comportamiento de la densidad celular y el peso seco no fueron iguales. Sin embargo, la producción de acetaldehído mejoró y su concentración en el medio aumenta al terminar el crecimiento celular, lo mismo que la acumulación de ácido acético; la tendencia de estas dos mediciones es la misma una vez que se detuvo el

crecimiento y aumentó la disolución de oxígeno, esto hace pensar que este sustrato estuvo disponible la mayor parte del tiempo y por ello el acetaldehído condensado pudo ser oxidado hasta ácido acético. La tasa de mortalidad se mantuvo abajo del 5% durante toda la fermentación. Es notable que en ningún momento se vio disminuida la concentración de alcohol en el medio.

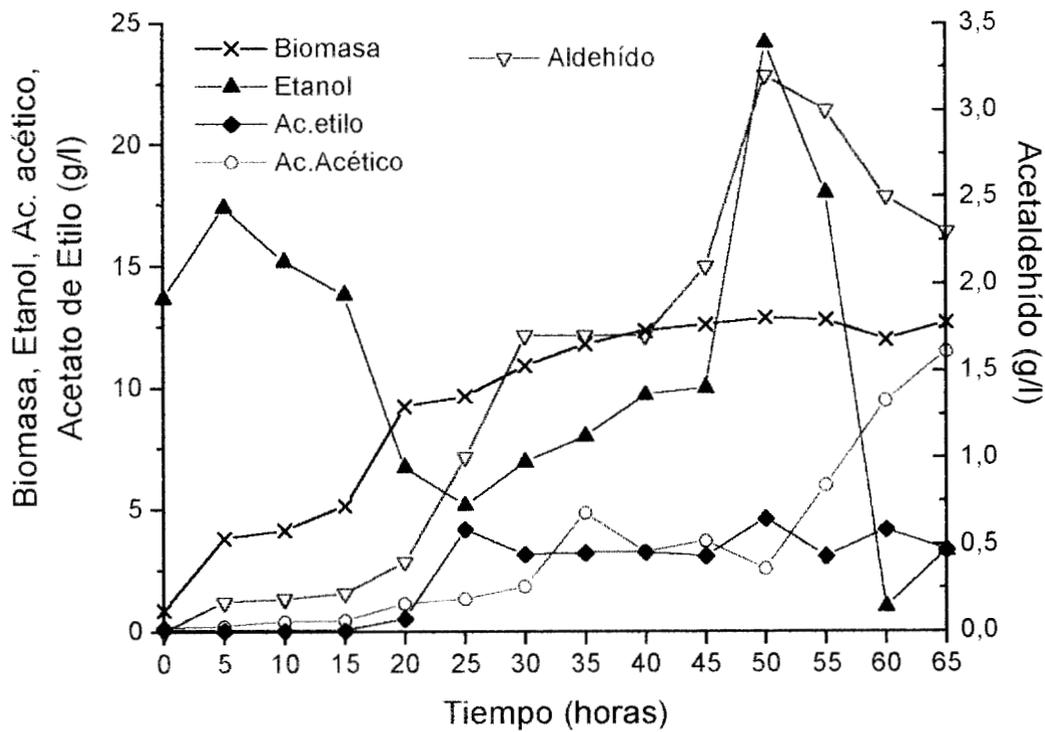


Fig. 4.3. Concentración de biomasa, alcohol y metabolitos en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado. Caso 2.

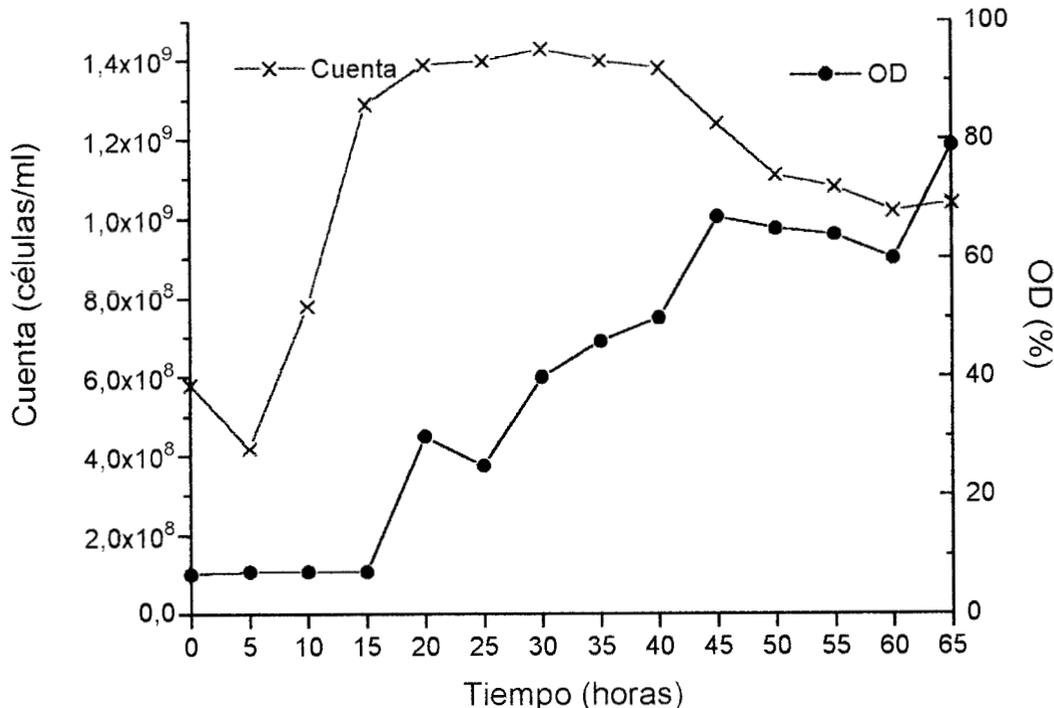


Fig. 4.4. Densidad celular y nivel relativo de oxígeno en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado. Caso 2.

Caso 3. (alimentación de alcohol = 2.0 g/L/h)

En esta corrida, donde la formación de biomasa también fue limitada (la máxima concentración en el medio fue de 10.5 g/L, fig. 4.5), la producción de acetato de etilo alcanzó una concentración en el medio de 6.7 g/L hasta que termina el crecimiento, pero su síntesis no se ve detenida, este metabolito se pudo medir a la salida del condensador y se alcanzaron a producir hasta 7 gramos más. El nivel relativo de oxígeno se mantuvo entre 8 y 15 % (fig.4.6). Las tendencias en la densidad celular y peso seco son prácticamente las mismas.

Durante las primeras 35 horas de la fermentación, la formación de biomasa, acetato de etilo y acetaldehído presentaron el mismo comportamiento. La tasa de mortalidad se mantuvo abajo de 30% hasta las 30 horas, después aumentó hasta un valor promedio de

70% como respuesta a un incremento en la velocidad de agitación. Sorprendentemente, la concentración de acetaldehído en el medio llegó hasta valores de 22 g/l, a estas concentraciones el aldehído ya es inhibidor del crecimiento para las levaduras (Stanley y col., 1997). Puede pensarse que una vez que se detiene la proliferación celular, *Candida utilis* es capaz de transformar el etanol a acetaldehído a concentraciones de etanol cercanas a los 20 g/L; cuando no está limitada la formación de biomasa, el etanol es transformado a los volátiles y ácido acético, ésto coincide con un aumento en la concentración de oxígeno en el medio.

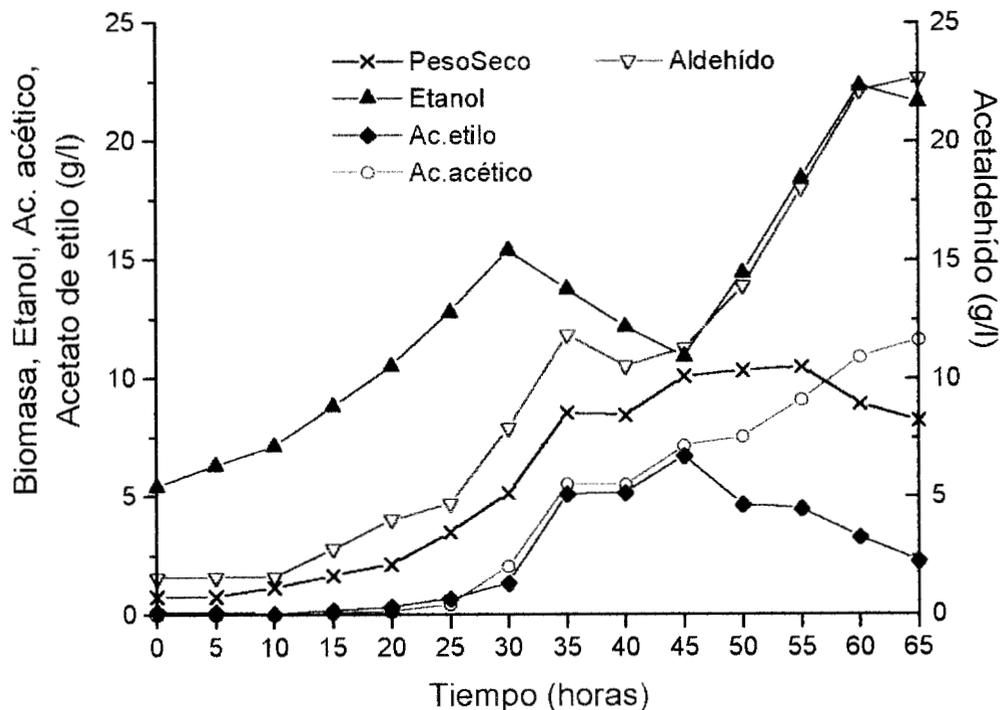


Fig. 4.5. Concentración de biomasa, alcohol y metabolitos en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado. Caso 3.

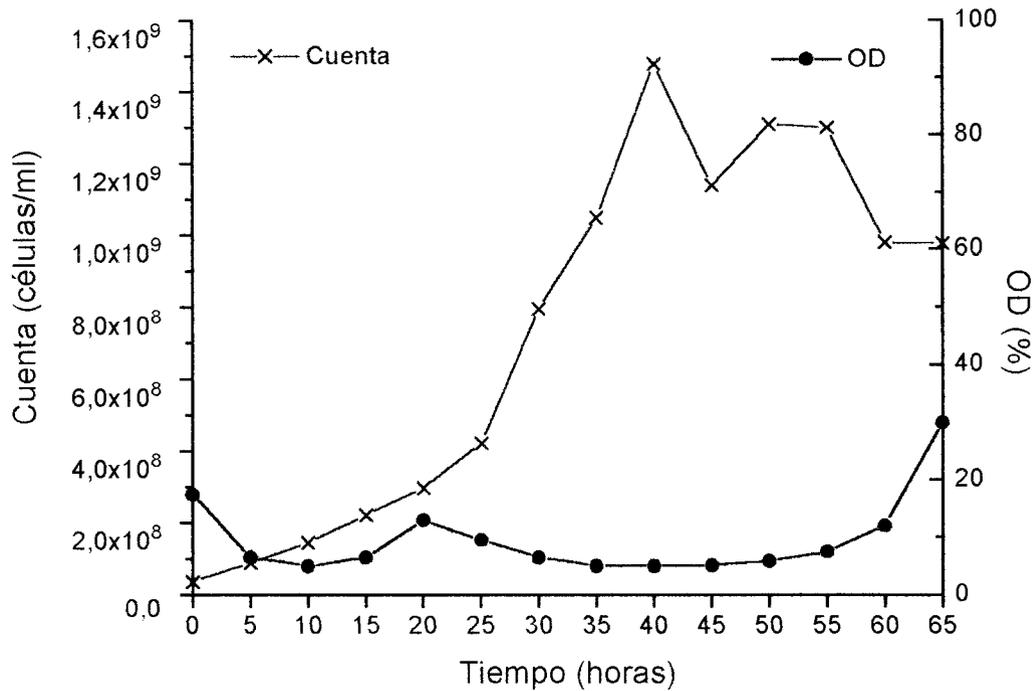


Fig. 4.6. Densidad celular y nivel relativo de oxígeno en el reactor durante la transformación de etanol a acetato de etilo por *Candida utilis* en el cultivo por lote alimentado. Caso 3.

4.2. Análisis comparativo de la acumulación de productos en los tres cultivos por lote alimentado

Análisis del crecimiento. Únicamente en el primer experimento no se alcanzó la biomasa esperada, esto puede explicarse porque el nivel de oxígeno en el medio estuvo abajo de 10%. En la figura 4.7 se presentan los cambios que sufrió la velocidad específica de crecimiento; puede notarse que durante las primeras 10 horas, se mantiene un valor arriba de 0.06 h^{-1} ; sin embargo, después de este tiempo, la velocidad disminuye sensiblemente para los tres experimentos. Aparentemente, la velocidad de alimentación de alcohol no afecta el valor de esta variable, pues los valores máximos se observan

cuando la alimentación de sustrato es de 0.6 g/L/h, le siguen los valores para una alimentación de 2 g/L/h y finalmente, los valores calculados para la velocidad de crecimiento corresponden a un flujo de alimentación de 0.63 g/L/h.

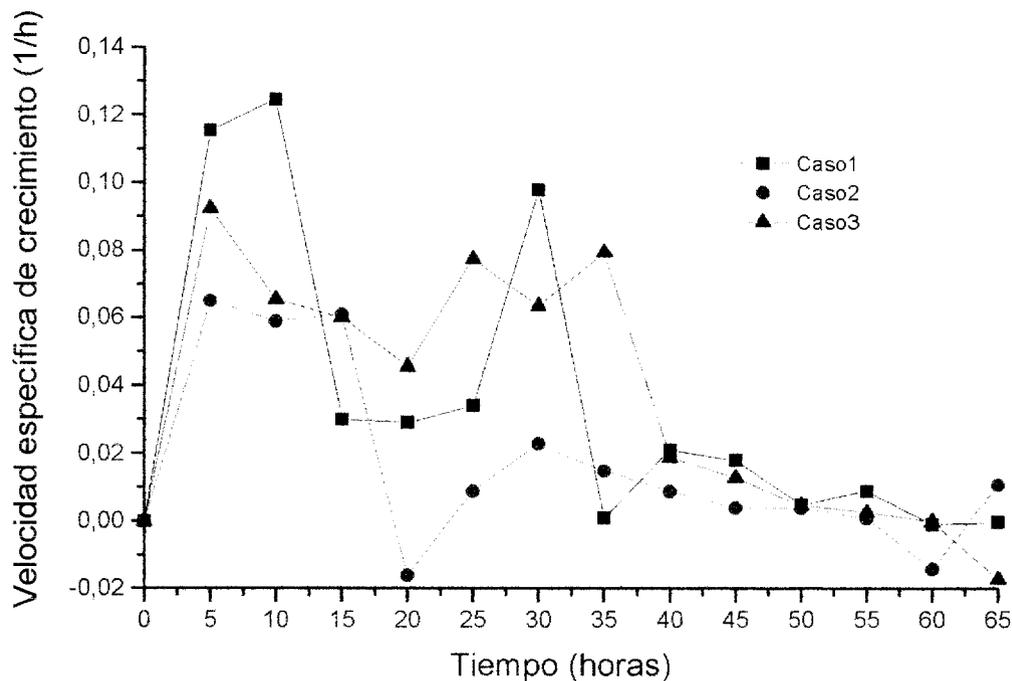


Fig. 4.7. Comparación de la velocidad específica de crecimiento (μ) de *Candida utilis* en tres cultivos por lote alimentado.

Acumulación de acetato de etilo. En el caso 1 (para mayor formación de biomasa), se alcanzaron concentraciones de acetato de etilo hasta de 13 g/L acetato de etilo con una biomasa de 18 g/l (fig. 4.8). La producción de acetato de etilo sigue los patrones de formación de biomasa, confirmando que la síntesis del acetato de etilo está fuertemente asociada al crecimiento de *C. utilis*. Puesto que en el caso 2 se trató de mejorar la disolución de oxígeno, la biomasa llegó al valor máximo de 13 g/L para el que fue diseñado el medio de cultivo; la máxima concentración de células coincide con la máxima concentración de acetato de etilo en el reactor de 3.6 g/L. Finalmente, en el tercer caso, donde la formación de biomasa también fue limitada, pero hubo una mayor velocidad de

alimentación de alcohol, se alcanzó el máximo esperado de 10.5 g/L. La producción de acetato de etilo fue un poco mayor que en el caso 2. Hasta que termina el crecimiento se alcanzan 6.7 g/L del éster en el medio, pero su síntesis no se ve detenida, éste se siguió perdiendo a la salida del condensador como ya se indicó anteriormente. En los tres casos, durante las primeras 35 horas de la fermentación, las tendencias en la formación de biomasa y acetato de etilo son las mismas.

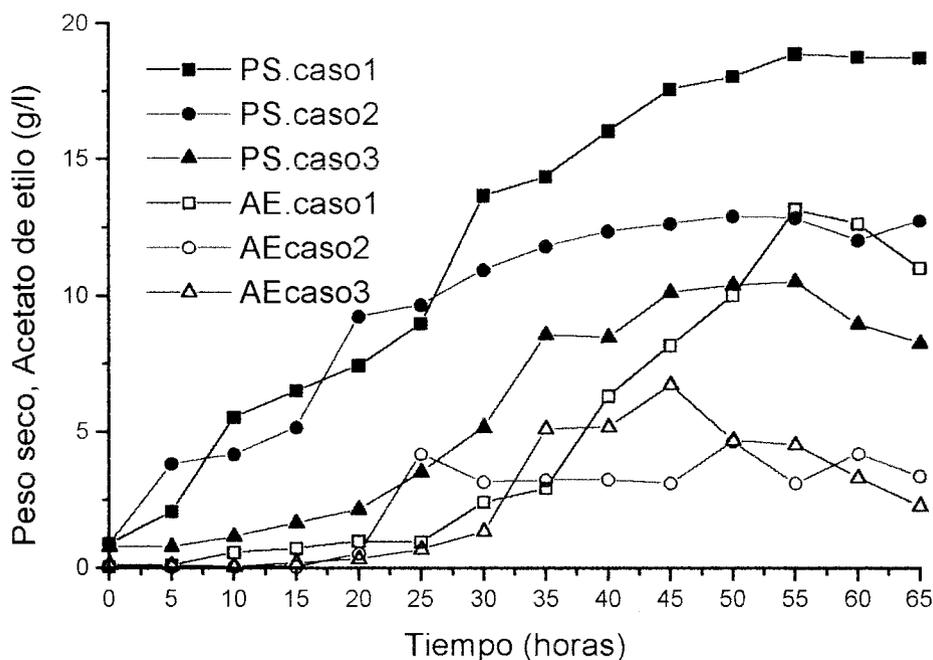


Fig. 4.8. Comparación del crecimiento de *Candida utilis* y acumulación de acetato de etilo en tres cultivos por lote alimentado.

En contraste a estos resultados, los trabajos de Bol y col. (1987) que a concentraciones de etanol cercanas a 1 M mejoran la producción de acetato de etilo con *Hansenula anomala* y los trabajos de Armstrong y col. (1984 b) en los que la conversión de etanol a acetato de etilo aumenta con un incremento en la concentración de etanol desde 10 hasta 35 g/L.

Acetaldehído y ácido acético. En cuanto a las tendencias en las concentraciones de acetaldehído y ácido acético dentro del reactor, la concentración de acetaldehído en el medio fue baja en el caso 1; no obstante, después que se detiene el crecimiento de la levadura, se da un aumento en las concentraciones de este producto, así como en las de ácido acético (fig. 4.9). Stanley y col. (1993) sugieren que si el acetaldehído se acumula a concentraciones superiores a los 0.03 g/l se inhibe el crecimiento de las levaduras a elevadas concentraciones de oxígeno y aunado a bajas concentraciones de etanol se desactiva la replicación celular, de cualquier forma para comprobar esta aseveración se debieran realizar pruebas para medir el acetaldehído intracelular.

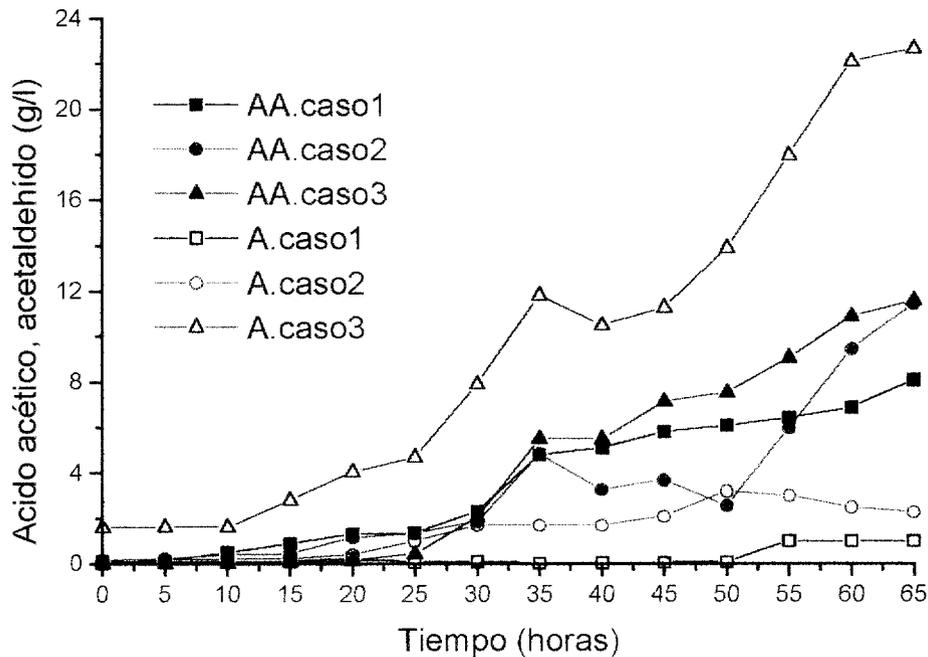


Fig. 4.9. Comparación de la acumulación de ácido acético y acetaldehído en el reactor para los tres cultivos por lote alimentado de *Candida utilis*

El aumento en la concentración de acetaldehído parece indicar que este intermediario de la oxidación de etanol es consumido en cuanto aparece y sólo puede acumularse una vez que termina el crecimiento, como ya se analizó anteriormente, esto explica las bajas concentraciones de oxígeno en algunos puntos de la fermentación, indicando que todo el

tiempo hay un empleo de oxígeno para oxidar el alcohol y producir células, aunque también esta baja disolución de oxígeno puede sugerir que el sistema está limitado por la transferencia de masa, pues no se alcanzó la biomasa máxima esperada en el primer caso y pudo haber habido algún tipo de inhibición por producto. En el segundo caso, la producción de ácido acético (segundo intermediario del catabolismo del etanol) sigue los patrones de acetato de etilo. Sin embargo, la producción de acetaldehído mejoró y aumenta al terminar el crecimiento celular, lo mismo que la acumulación de ácido acético. Por otro lado, la relación entre estos dos compuestos en el medio lleva la misma tendencia una vez que se detuvo el crecimiento y aumentó la disolución de oxígeno; como hubo disponibilidad de oxígeno, el acetaldehído condensado pudo ser oxidado hasta ácido acético. El aumento en la concentración de acetaldehído en el medio hasta valores de 22 g/L en el tercer caso concuerda con los resultados de Kallel-Mhiri y col. (1993) para *Kluyveromyces fragilis*, que aumentando el nivel de etanol ven favorecida la producción de acetaldehído, quizá por saturación de las vías metabólicas para la síntesis del éster. Otros estudios reportaron resultados similares con *Candida utilis* (Murray y col., 1988), aumentando la concentración de alcohol a 35 g/L dirigen el metabolismo a la producción de acetaldehído. Comparando este estudio con otros anteriores, los resultados obtenidos apoyan los de Chiang y col. (1991) y los obtenidos por Kim y Rhee (1992), quienes minimizan la inhibición por acetaldehído removiéndolo continuamente y alimentando etanol en forma continua hasta tener un 10%; algo similar ocurrió en el caso 3, que cuando se detuvo el crecimiento, las levaduras transformaron el etanol alimentado en los productos de interés como un mecanismo para evitar la inhibición por sustrato, además que la inhibición por productos se disminuyó por su salida continua del reactor al sistema de condensación de volátiles.

Concentración de sustratos en el reactor. En el primer caso fue necesario adicionar pulsos de etanol (10 g/L); para el segundo, es notable que en ningún momento se vio disminuida la concentración de alcohol en el medio, éste se mantuvo entre 5 y 23 g/L; para el experimento con una mayor alimentación de alcohol, éste se mantuvo entre 10 y 20 g/L (fig. 4.10).

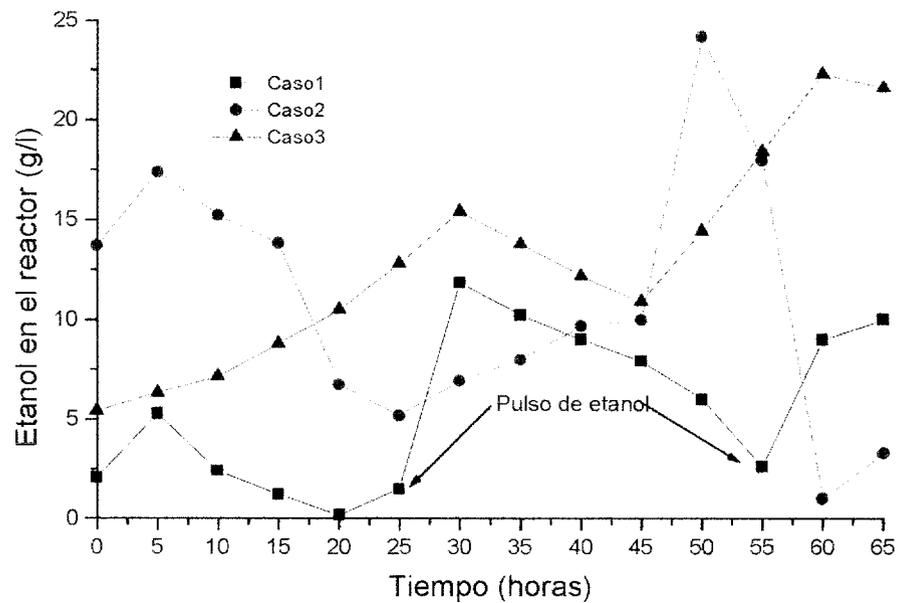


Fig. 4.10. Comparación de la acumulación de alcohol en el reactor para los tres cultivos por lote alimentado de *Candida utilis*, las flechas indican adición de pulsos de 10 g/L de etanol en el caso 1.

En la figura 4.11 se compara la concentración relativa de oxígeno en las tres corridas. En la tabla 4.1 se concentran los resultados de la comparación de estos tres experimentos.

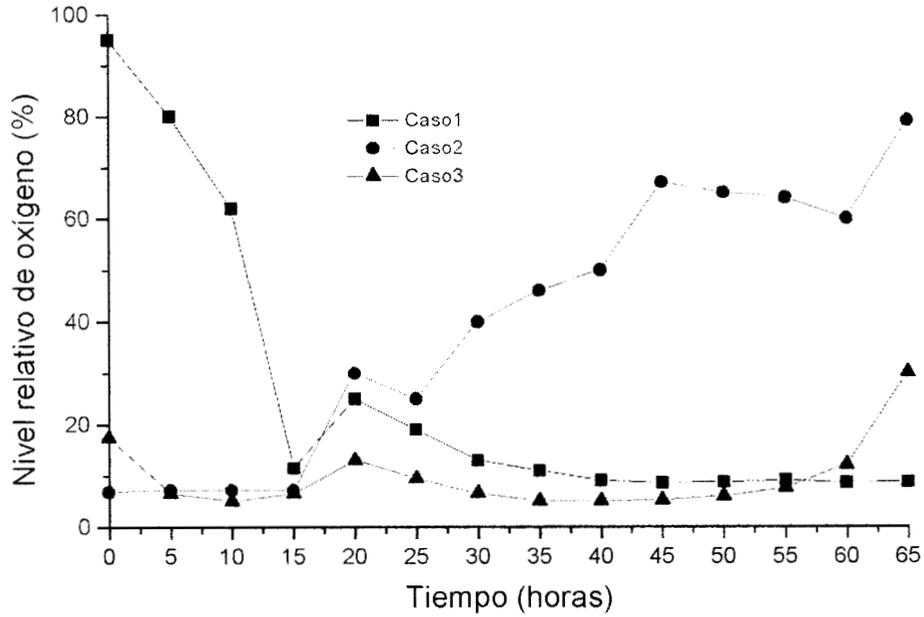


Fig. 4.11 Comparación del nivel relativo de oxígeno en el reactor para los tres cultivos por lote alimentado de *Candida utilis*

Tabla 4.1. Comparación de la acumulación de productos y crecimiento en tres cultivos por lote alimentado de *Candida utilis* creciendo sobre etanol.

Caso	1*	2	3
Condiciones de operación			
Tasa de aireación (VVM)	0.15	0.19	0.21
Alimentación de etanol (g/h/litro)	0.60	0.63	2.00
Concentración relativa de oxígeno en el medio durante el proceso (%)	15-20	20-80	8-15
Flujo de gas a la salida del reactor (l/h)	20.9	24	25.71
Concentración de alcohol en el medio (g/L)	2.5-12	5-23	5-20
Tiempo en que se alcanza Xmax (horas)	40-45	40-45	40-45

Tabla 4.1... continuación

Tasa de mortalidad	10% antes de aumentar la agitación, después subió hasta 40%	Abajo de 5% todo el tiempo	Menor a 30%, cuando se aumentó la agitación e inició la síntesis de acetaldehído, aumentó hasta 70%
Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1})	0.125 a las 10 horas	0.263 a las 50 horas	0.09 a las 5 horas

* En este caso la alimentación de etanol fue insuficiente para satisfacer el consumo y se adicionaron dos pulsos de etanol para elevar su concentración hasta 11 g/L.

4.3. Consumo de sustratos.

En principio, en este apartado se analiza el consumo de sustratos de manera específica, es decir, en función de la cantidad de células presentes en el reactor. Después, el consumo de etanol se presenta como si el reactor fuese un filtro para eliminación de alcohol.

Para establecer el consumo de alcohol y oxígeno se tomó en cuenta la ecuación de balance de materia (Felder y Rousseau, 1981):

$$\text{Entrada} + \text{Generación} - \text{Salida} - \text{Consumo} = \text{Acumulación} \quad \text{ec. 4.1}$$

Considerando que no hay generación de etanol u oxígeno, y despejando el consumo, esta ecuación queda de la siguiente manera:

$$\text{Consumo} = \text{Entrada} - \text{Salida} - \text{Acumulación} \quad \text{ec. 4.2}$$

El consumo específico se obtuvo dividiendo el consumo entre la biomasa presente en cada toma de muestra.

La ecuación para calcular la tasa específica de consumo de alcohol (q_E , g/gcel-h) quedó de esta forma:

$$q_E = \left[(E_a - E_s) \frac{F}{V_R} - \frac{\Delta E_R}{\Delta t} \right] \frac{1}{X} \quad \text{ec. 4.3}$$

donde

E_a , concentración de etanol en la corriente gaseosa de entrada al reactor, g/L

E_s , concentración de etanol en la corriente gaseosa de salida del reactor, g/L

F , flujo volumétrico de gas, L/h

V_R , volumen del reactor, L

$\frac{\Delta E_R}{\Delta t}$, pendiente puntual del gráfico de acumulación de alcohol (fig. 4.10), g/L/h

X , concentración de células a cada tiempo de muestreo, g/L

Si se observa la figura 4.12, se nota que q_E tiende a estabilizarse después de las 40 horas, tiempo en que se alcanza X_{max} para los casos en que la formación de biomasa fue limitada (2 y 3), en el caso donde se empleó mayor cantidad de fuente de nitrógeno el consumo se estabiliza 10 horas antes en un valor de alrededor 0.05 g etanol/g células/h. Como se aclaró en el apartado anterior, el aumento en las concentraciones de los intermediarios de la vía de síntesis de acetato de etilo cuando la biomasa es limitada, parece una respuesta a la acumulación de etanol. Esto se confirma porque cuando éste se alimentó a mayor velocidad (2 g/L h) su consumo fue más alto y cuando se detuvo el crecimiento, se continuó con la producción de acetaldehído (acumulación y evaporación) y ácido acético en el reactor.

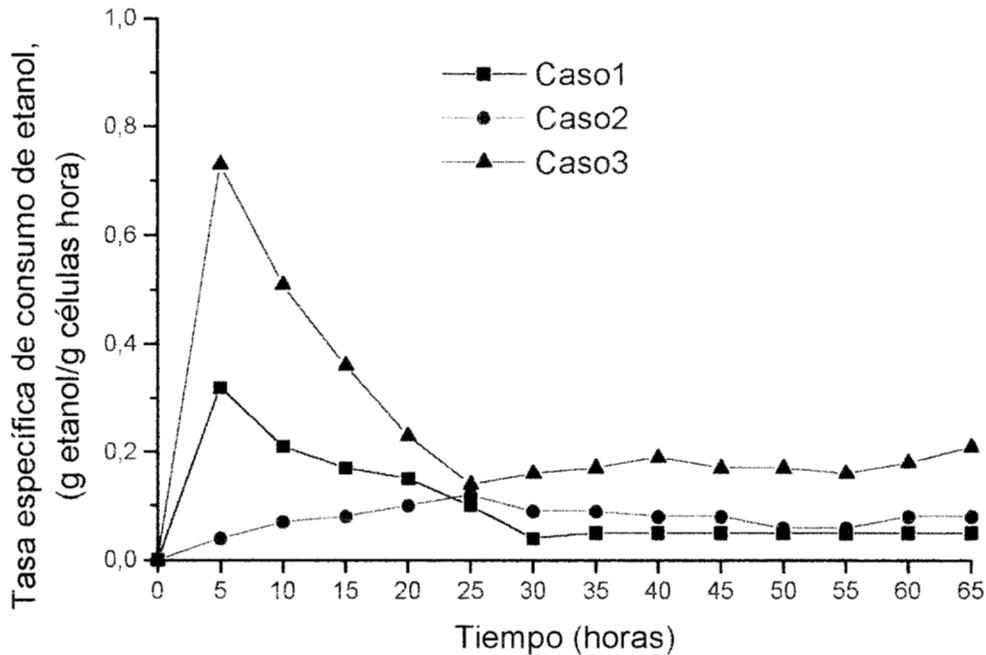


Fig. 4.12. Evolución de la tasa específica de consumo de etanol para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

El empleo de la ecuación 4.2 para el cálculo de la tasa específica de consumo de oxígeno (q_o , g/gcel-h) llevó a la siguiente expresión:

$$q_o = \left[(C_e - C_s) \frac{F}{V_R} \rho_{\text{gas}} \right] \frac{1}{X} \quad \text{ec. 4.4}$$

donde

C_e , concentración de oxígeno en la corriente gaseosa de entrada al reactor, % peso

C_s , concentración de oxígeno en la corriente gaseosa de salida del reactor, % peso

ρ_{gas} , densidad promedio de las corrientes gaseosas de entrada y salida, g/L

En la fig. 4.13 se representa la evolución del consumo de oxígeno en los tres casos. Puede verse que el consumo de oxígeno es alto casi todo el tiempo para la velocidad de alimentación de oxígeno más alta (caso 3, tasa de aireación de 0.21 VVM). Se aprecia que la tasa de consumo de oxígeno disminuye a las 20 horas, esto coincide con la disminución de la velocidad de crecimiento (fig. 4.7), esto se debe a que las células sin crecer deben mantener una respiración menor si el ambiente no les es favorable (Páca y Marek, 1996 b).

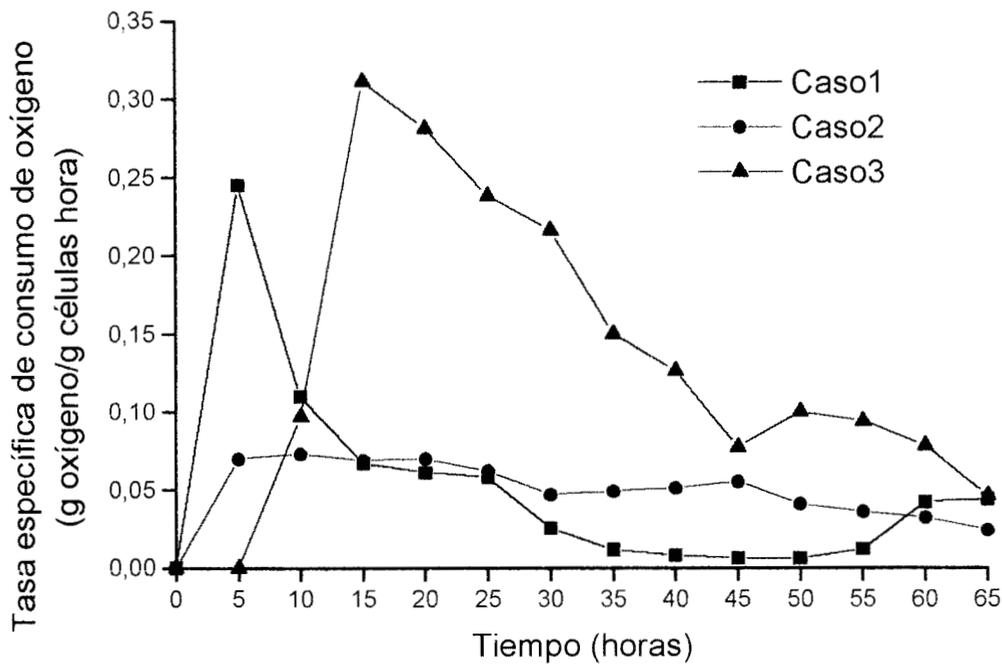


Fig. 4.13. Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

En la tabla 4.11 aparecen las velocidades específicas de consumo de sustratos para los tres procesos. En este estudio, una vez que se alcanza X_{max} se presenta una relación de q_E/q_O de 2 aproximadamente, esto puede esperarse en un cultivo continuo. Sin embargo, se presenta una marcada diferencia con las tasas de consumo para estos sustratos por *Saccharomyces cerevisiae* cuando el metabolismo está orientado casi

exclusivamente a formación de biomasa: $q_{O_2} = 0.2496$ g/g-h y $q_E = 0.221$ g/g-h (Gancedo y Serrano, 1989), la causa de esta diferencia se debe, además de tratarse de otra levadura, a que se da la formación de distintos productos. Otros estudios realizados por Corzo y col. (1994) en un lote de *C. utilis* alimentado con una corriente gaseosa de etanol dan tasas específicas de consumo de oxígeno de 0.08 g/g-h ($X=8$ g/L) y de 0.2 g/g-h ($X=1$ g/L). Kuriyama y Kobayashi (1993) muestran un consumo de oxígeno de 0.013 g/ g-h para *S. cerevisiae* creciendo sobre glucosa.

Tabla 4.II. Consumo de sustratos y velocidad de eliminación de alcohol en el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa

Caso	1*	2	3
Condiciones de operación			
Alimentación de etanol (g/h/litro)	0.60	0.63	2.00
q_E cuando termina el crecimiento (g/g-h)	0.05	0.08	0.18
q_{O_2} cuando termina el crecimiento (g/g-h)	0.02	0.04	0.09
Tasa máxima de eliminación de alcohol (g/L/h)	1.15 (a las 10 horas)	1.15 (a las 25 horas)	1.78 (a las 40 horas)

* En este caso la alimentación de etanol fue insuficiente para satisfacer el consumo y se adicionaron dos pulsos de etanol para elevar su concentración hasta 11 g/L.

4.4. Eliminación de alcohol.

Como una alternativa del empleo de este tipo de cultivos en la eliminación de alcohol, puede transformarse la tasa específica de consumo de alcohol a una tasa de eliminación utilizando la ecuación

$$C_E = q_E X \quad \text{ec. 4.5}$$

Los resultados presentados en la figura 4.14 permiten ver que cuando el gasto de alimentación del etanol al reactor es más alto, se consigue una mejor eliminación del mismo. Un aumento en esta velocidad se presenta al mismo tiempo que se detiene el crecimiento y aumenta en la formación de acetaldehído.

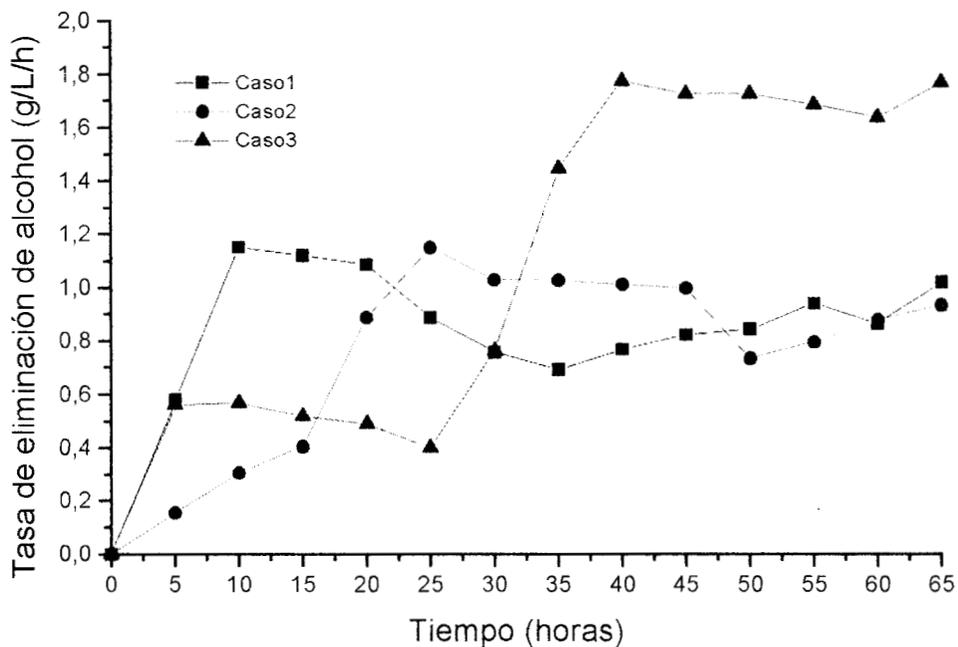


Fig. 4.14. Tasa de eliminación de alcohol para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

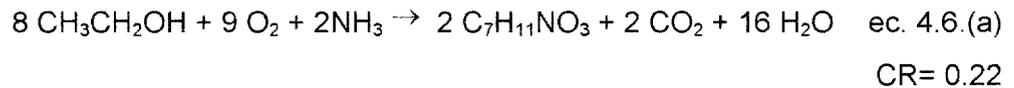
Las tasas máximas de eliminación de alcohol van desde 1.15 g/L/h para los dos primeros casos hasta 1.78g/L/h para el tercero, sugiriendo que a una mayor tasa de aireación (0.21 VVM), es posible una mejor eliminación de alcohol, estos valores son superiores a los reportados por Christen y col. (1999), quienes en cultivos por lote con distintas cepas de esta levadura y manejando concentraciones de etanol de 32 g/L consiguen una

velocidad de eliminación de alcohol hasta de 0.162 g/L/h. En la tabla 4.II se presentan los valores máximos alcanzados en los tres procesos. Con esta información, es posible pensar en alimentar corrientes gaseosas que contengan vapores de etanol a un medio de cultivo líquido para eliminar este tóxico.

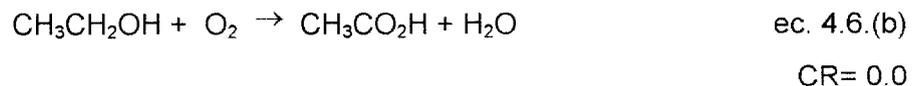
4.5. Coeficiente respiratorio.

Las relaciones entre el coeficiente respiratorio (CR= mmol CO₂ producido/mmol O₂ consumido) y la vía metabólica que sigue la levadura pueden predecirse por balances estequiométricos de masa. Wattew y col. (1979) realizaron un estudio para la producción de proteína unicelular con *C. utilis* y proponen el siguiente grupo de ecuaciones teóricas para el cálculo del coeficiente respiratorio, en cada una de éstas el consumo de los sustratos supone únicamente la formación de los productos indicados.

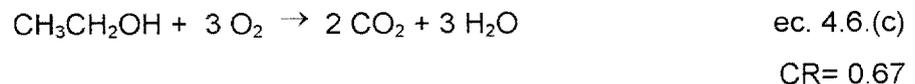
Crecimiento en etanol



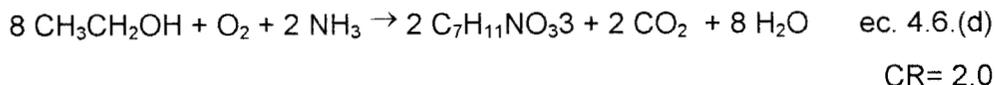
Producción de acetato



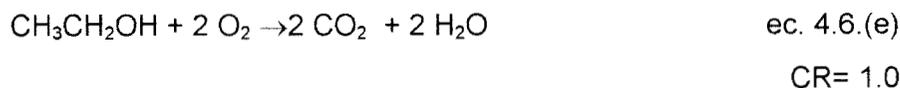
Mantenimiento en etanol



Crecimiento en acetato



Mantenimiento en acetato



En el presente estudio, los coeficientes respiratorios se calcularon considerando las velocidades puntuales de consumo de oxígeno y de producción de dióxido de carbono (CR= mol CO₂ producido/mol O₂ consumido) durante la fermentación. Tomando en cuenta estos valores teóricos es posible especular sobre las vías biosintéticas que se siguieron. En el caso 1, durante las primeras 40 horas el promedio de CR está en 0.29 mol/mol, este valor es más cercano al teórico para crecimiento sobre etanol y producción de acetato (0.22 y 0.0, respectivamente) que al teórico para mantenimiento sobre etanol (0.67). En el caso 2, donde el valor de CR las primeras 40 horas tiene un promedio de 0.35 mol/mol, las diferencias con el CR teórico indican que la producción de dióxido de carbono se debe principalmente al crecimiento y mantenimiento de la levadura sobre etanol. En el caso 3, donde la alimentación de etanol fue superior, se compara con los valores de CR teórico y se ve que la producción de CO₂ se debe al crecimiento principalmente, después a la producción de acetato. En la figura 4.15 se expresa la evolución del coeficiente respiratorio (CR) para los tres casos. En general, se mantuvieron valores entre 0.2 y 0.4 mol/mol, esto concuerda con los resultados de Corzo y col. (1994), quienes obtienen coeficientes de 0.15-0.4. El aumento en éste una vez que las células detienen el crecimiento puede explicarse porque se da una descarboxilación de los compuestos carbonados cuando se alcanza X_{max}.

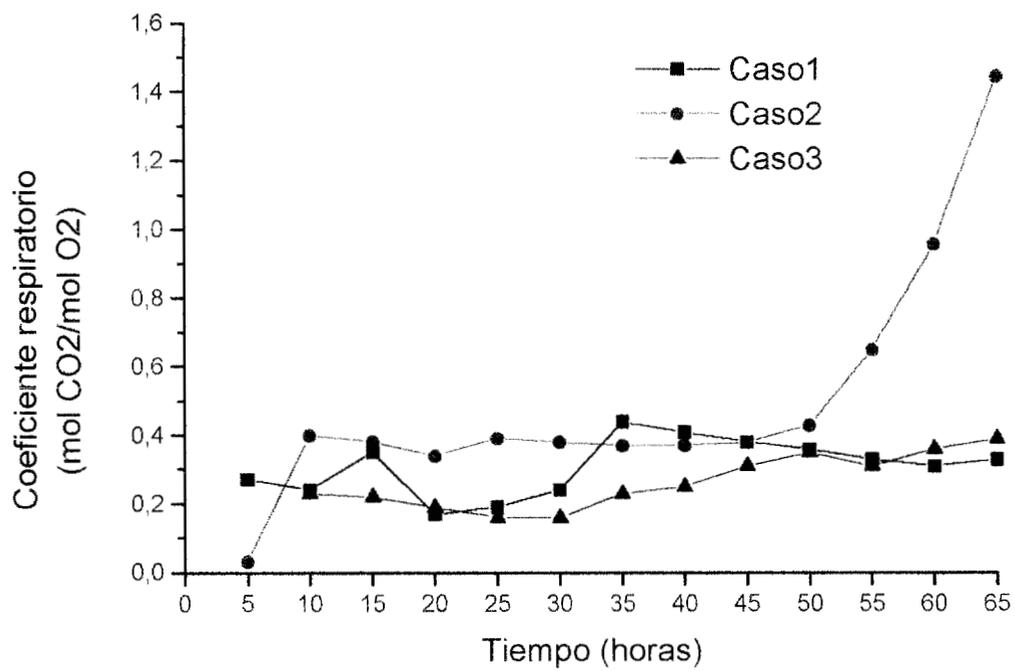


Fig. 4.15. Coeficiente respiratorio para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

4.6. Producción de metabolitos.

Existen dos formas de analizar la producción de los metabolitos, estas son desde el punto de vista de las productividades y la otra desde los rendimientos. Se presenta un análisis por separado de cada uno. Los gráficos que se presentan en las siguientes secciones son el resultado del manejo de las mediciones de los productos dentro del reactor y a la salida de éste. Los detalles de los cálculos se establecen en el apéndice C.

Acetato de etilo. Respecto a las productividades volumétricas, se hace una comparación entre los tres experimentos, la evolución de esta variable se presenta en la figura 4.16. Alrededor de las 35 horas, se alcanza en los tres casos la máxima productividad volumétrica, siendo más alta, en general, para el caso en que se alimentó un mayor gasto de alcohol (caso 3).

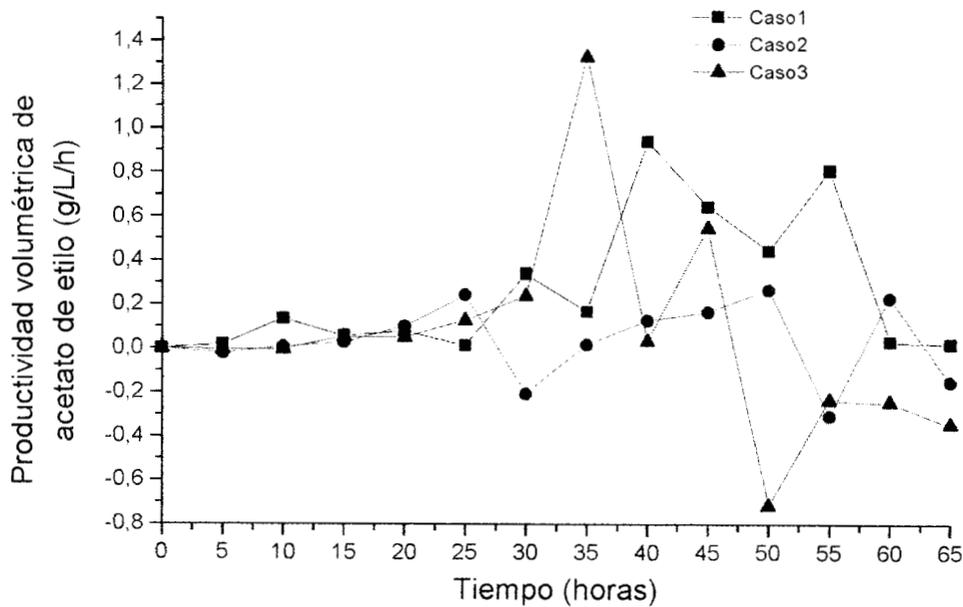


Fig. 4.16. Comparación de la productividad volumétrica de acetato de etilo para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

También se comparan las productividades específicas en la figura 4.17; durante las primeras 25 horas, las tendencias son las mismas, se alcanzan valores menores a 0.025 g/g-cel/h; sin embargo, después aumentan, coincide este incremento con una disminución en la velocidad específica de crecimiento, sugiriendo que este metabolito está parcialmente asociado al crecimiento de *Candida utilis* sobre etanol.

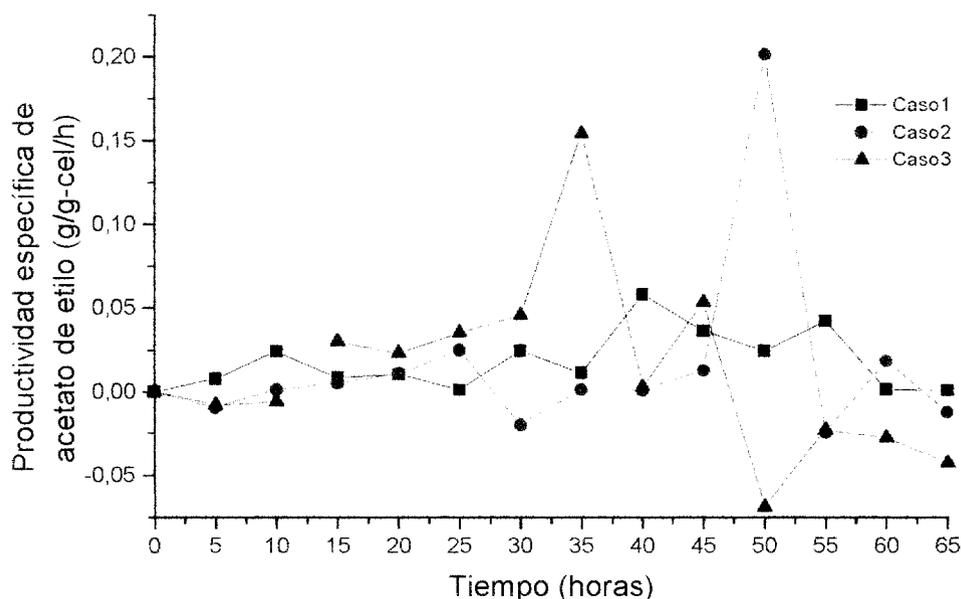


Fig. 4.17. Comparación de la productividad específica de acetato de etilo para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

En apoyo a la suposición de que la síntesis de este metabolito está parcialmente asociada al crecimiento, se presenta un aumento de los rendimientos de este metabolito respecto al etanol consumido después de las 35 horas (fig. 4.18). En los experimentos 1 y 3 se presentaron los valores más altos (0.58 y 0.41, respectivamente) en comparación con el valor de 0.52 que se obtuvo en el cultivo por lotes. Respecto a los rendimientos sobre el sustrato carbonado, en el caso 1, donde el OD se mantuvo alrededor de 9% y el etanol estuvo entre 2.5 y 12 g/L la mayor parte del tiempo, el rendimiento mayor fue el de acetato de etilo. Y al final, éste y el rendimiento de biomasa fueron casi iguales. En el caso 2, el OD estuvo arriba de 69% y el etanol entre 5-23 g/l, se vieron mejorados los

rendimientos para ácido acético. En el caso 3, el OD se mantuvo alrededor de 12% y el etanol en el medio entre 5 y 20 g/L, se mejoraron los rendimientos de acetaldehído notablemente. Esto último no concuerda con los resultados de Armstrong y col. (1984 a), que mejoran la síntesis de acetaldehído a concentraciones de OD cercanas al 100% de saturación.

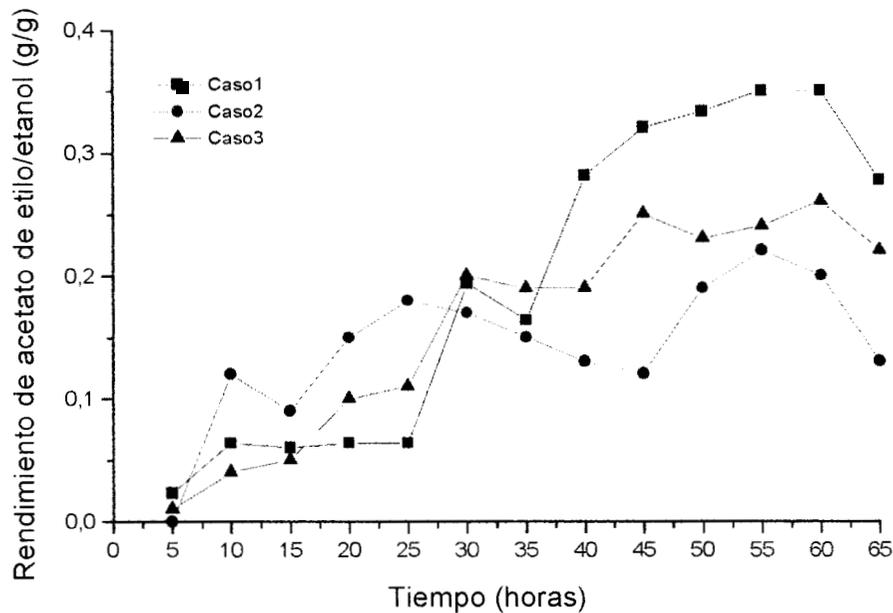


Fig. 4.18. Comparación de los rendimientos de acetato de etilo para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

Acetaldehído. Para las productividades volumétricas, se comparan nuevamente los tres experimentos, los cambios que sufrió esta variable se presentan en la figura 4.19. Las primeras 10 horas y las últimas 20 (cuando el crecimiento es menor o incluso hay muerte celular), se presentan los valores más altos de esta variable. Sin embargo, el valor de la productividad específica es más elevado durante la etapa de crecimiento (fig. 4.20), tomando los valores más altos de alrededor de 0.15 g/g-cel/h para una mayor alimentación de alcohol. Los máximos rendimientos se obtuvieron también en este caso, con valores de entre 0.2-0.4 g/g (fig.4.21).

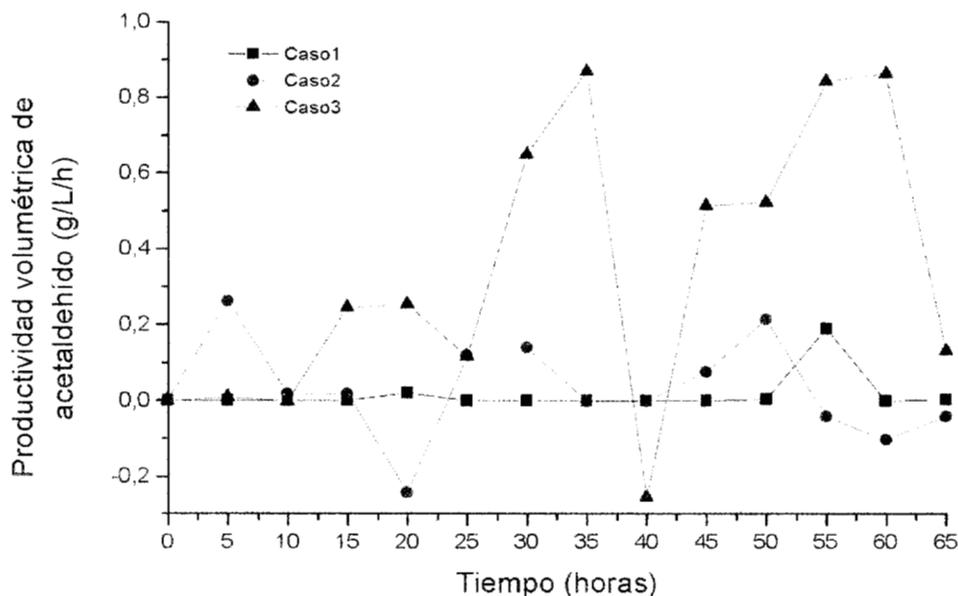


Fig. 4.19. Comparación de la productividad volumétrica de acetaldehído para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

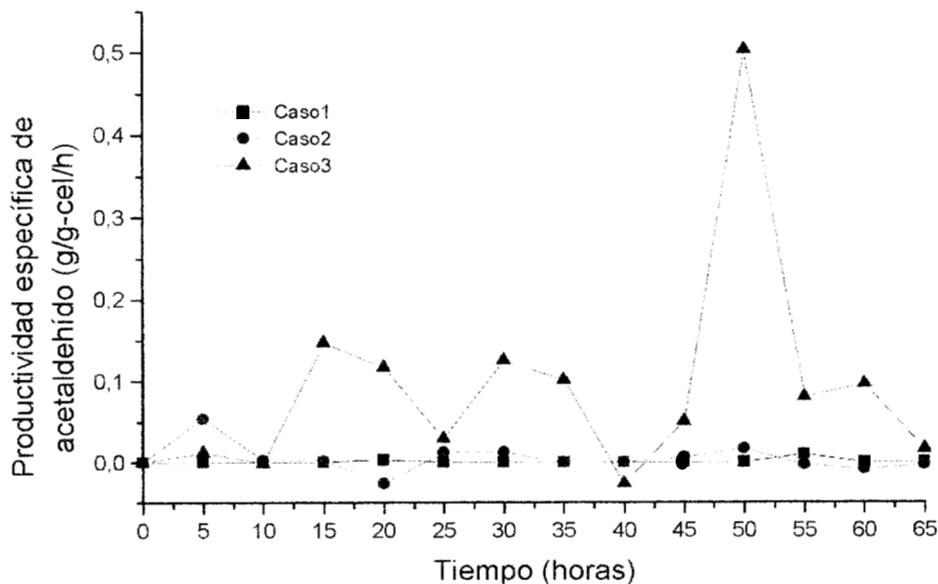


Fig. 4.20. Comparación de la productividad específica de acetaldehído para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

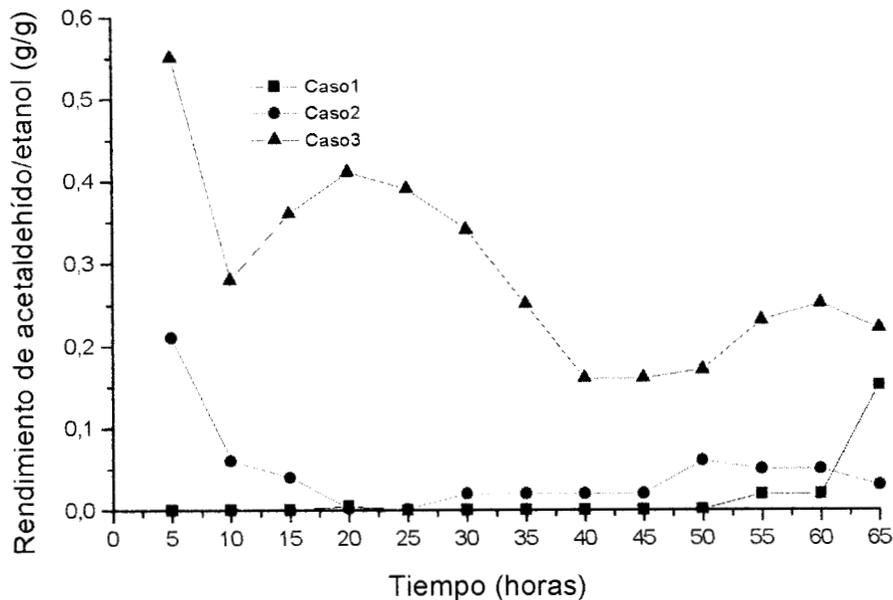


Fig. 4.21. Comparación de los rendimientos de acetaldehído para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa.

Acido acético. En la fig. 4.22, 4.23 y 4.24 se hace una comparación entre los tres experimentos para las productividades volumétricas de ácido acético, productividades específicas y rendimientos, respectivamente. La tendencia en los tres casos para las dos productividades es la misma durante las primeras 35 horas, estas aumentan después que se detiene el crecimiento. Se obtienen los valores máximos (aproximadamente 0.7 g/L/h) para una mayor alimentación de alcohol (caso 3) y mínimos (0.5 g/L/h) cuando la entrada de alcohol es menor (caso 1), inclusive, no debe olvidarse que este último requirió de la adición de pulsos de alcohol porque éste se agotó en el medio.

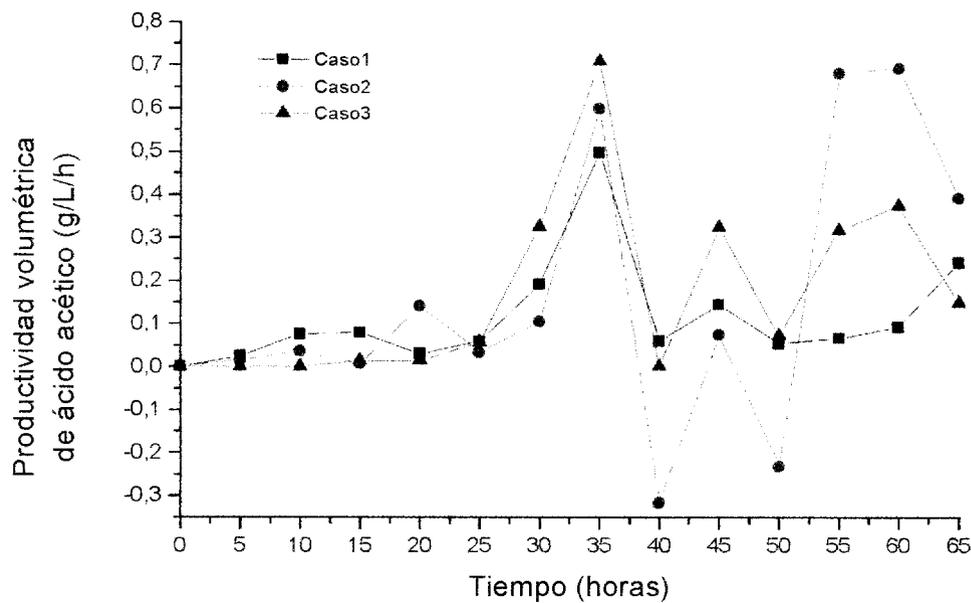


Fig. 4.22. Comparación de la productividad volumétrica de ácido acético para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa

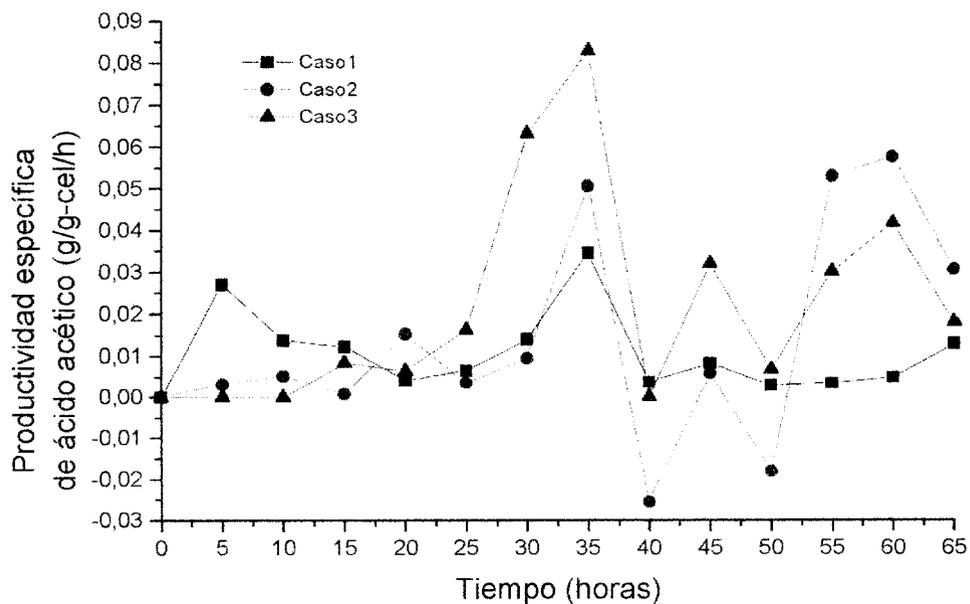


Fig. 4.23. Comparación de la productividad específica de ácido acético para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa

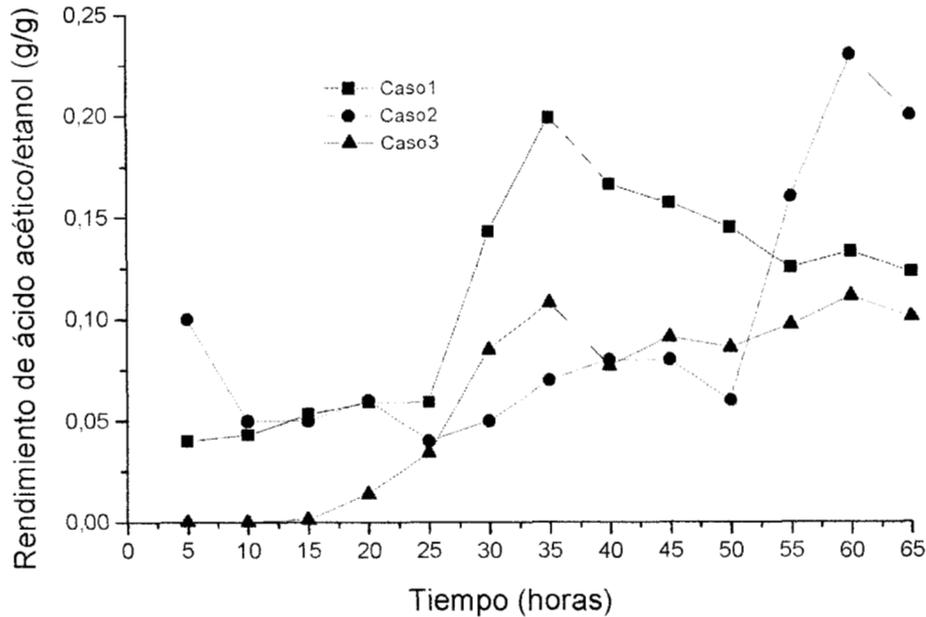


Fig. 4.24. Comparación los rendimientos de ácido acético para el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa

Aparentemente, la producción de ácido acético es dependiente de la presencia de alcohol, de acuerdo a las investigaciones de Páca y Votruba (1994) y Páca y Marek (1996 a y b), la producción de ácidos orgánicos como productos intermedios de la desasimilación de alcohol se inducen por la acidificación del medio debida a la adición de sustrato. Esta acidificación puede entenderse como una función fisiológica influenciada por el potencial catabólico de las células sin crecer. Después que se detiene el crecimiento se aumentan ligeramente los rendimientos (en un 15-30 %). En la tabla 4.III se presenta la síntesis de los resultados del análisis de la producción de estos metabolitos y la biomasa en los tres cultivos.

Tabla 4.III. Producción de metabolitos en el sistema II con alimentación continua de etanol en fase gaseosa

Caso	1*	2	3
Alimentación de etanol (g/h/litro)	0.60	0.63	2.00
Máximas productividades volumétricas (g/L/h)			
Acetato de etilo	0.935	0.263	1.32
Acetaldehído	0.190	0.262	0.87
Acido acético	0.498	0.695	0.71
Máximas productividades específicas (g/g cel-h)			
Acetato de etilo	0.058	0.025	0.0154
Acetaldehído	0.010	0.053	0.150
Acido acético	0.035	0.058	0.083
Rendimientos máximos (g producto /g etanol)			
Biomasa	0.58	0.32	0.25
Acetato de etilo	0.35	0.22	0.26
Acetaldehído	0.15	0.21	0.41
Acido acético	0.20	0.23	0.11

* en este caso la alimentación de etanol fue insuficiente para satisfacer el consumo y se adicionaron dos pulsos de etanol para elevar su concentración hasta 11 g/L.

4.7. Balances de carbono.

Para tener un mejor entendimiento de los procesos bioquímicos ocurridos durante los tres experimentos realizados en el cultivo por lote con distintas velocidades de alimentación de alcohol, se hace necesario el manejo de balances de materia en fermentación, con el fin de encontrar una relación entre la dirección del metabolismo de *Candida utilis* y las condiciones de operación trabajadas. Si es posible, se pretende dar una política del manejo del lote para mejorar la producción de acetato de etilo y acetaldehído. El resultado de los balances de carbono se presenta en la tabla 4-IV en forma de fracciones, es decir, se consideró todo el carbono alimentado en forma de alcohol y la fracción de este elemento presente en los productos medidos. En general,

puede observarse que el 40% del carbono suministrado al sistema no se midió, esto sugiere la presencia de otros metabolitos no cuantificados, de igual forma el hecho de que menos de un 20% del carbono se orientó hacia respiración. Sin embargo, en el caso 1, la mayor cantidad de carbono (40 % aproximadamente) se dirigió a la síntesis de los metabolitos de nuestro interés; este es el único caso que concuerda parcialmente con lo reportado por Gancedo y Serrano (1989), que con *Saccharomyces cerevisiae* creciendo sobre etanol el 40% del carbono se dirige a biosíntesis, el 55% a respiración y el resto es para mantenimiento o formación de otros productos. De cualquier manera, se hizo necesario realizar un estimado de la composición de estos otros metabolitos para cerrar los balances de materia, los resultados se presentan al final del apartado.

Tabla 4.IV. Resultados del balance de carbono para los tres experimentos por lote alimentado.

Alimentación de etanol= 0.6g/L/h							
Fracción del carbono transformada en productos							
t, horas	Biomasa	Acetato de etilo	Acetaldehído	Acido acético	CO ₂	Suma de las fracciones	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5	0.33	0.02	0.001	0.03	0.17	0.55	
10	0.37	0.07	0.000	0.03	0.09	0.56	
15	0.30	0.06	0.000	0.04	0.09	0.49	
20	0.28	0.07	0.005	0.04	0.08	0.47	
25	0.33	0.07	0.000	0.04	0.10	0.54	
30	0.51	0.20	0.000	0.11	0.11	0.93	
35	0.53	0.17	0.000	0.15	0.11	0.96	
40	0.45	0.29	0.000	0.13	0.19	1.00	
45	0.41	0.33	0.000	0.12	0.19	1.00	
50	0.38	0.35	0.001	0.11	0.08	0.92	
55	0.32	0.36	0.020	0.09	0.07	0.86	
60	0.31	0.36	0.020	0.10	0.08	0.87	
65	0.25	0.29	0.160	0.09	0.08	0.87	

Tabla 4.IV. Continuación...

Alimentación de etanol= 0.63g/L/h							
Fracción del carbono transformada en productos							
t, horas	Biomasa	Acetato de etilo	Acetaldehído	Acido acético	CO ₂	Suma de las fracciones	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	0.61	0.00	0.220	0.08	0.04	0.95	
10	0.26	0.12	0.070	0.04	0.23	0.73	
15	0.28	0.09	0.041	0.04	0.19	0.65	
20	0.29	0.16	0.002	0.05	0.09	0.59	
25	0.19	0.19	0.001	0.03	0.08	0.49	
30	0.22	0.18	0.021	0.04	0.10	0.56	
35	0.09	0.16	0.021	0.05	0.11	0.43	
40	0.20	0.13	0.021	0.06	0.12	0.53	
45	0.18	0.12	0.021	0.06	0.13	0.51	
50	0.22	0.20	0.063	0.05	0.18	0.71	
55	0.08	0.23	0.052	0.12	0.17	0.65	
60	0.06	0.21	0.052	0.18	0.17	0.67	
65	0.13	0.14	0.031	0.15	0.17	0.62	

Alimentación de etanol= 2.0g/L/h							
Fracción del carbono transformada en productos							
t, horas	Biomasa	Acetato de etilo	Acetaldehído	Acido acético	CO ₂	Suma de las fracciones	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	0.11	0.01	0.58	0.000	0.001	0.70	
10	0.09	0.04	0.29	0.000	0.017	0.44	
15	0.12	0.05	0.38	0.001	0.057	0.61	
20	0.16	0.10	0.43	0.011	0.087	0.91	
25	0.23	0.11	0.41	0.026	0.111	0.89	
30	0.17	0.21	0.36	0.065	0.084	0.89	
35	0.15	0.20	0.26	0.083	0.058	0.75	
40	0.12	0.20	0.17	0.060	0.057	0.61	
45	0.11	0.26	0.17	0.070	0.063	0.67	
50	0.10	0.24	0.18	0.066	0.071	0.66	
55	0.10	0.25	0.24	0.074	0.079	0.74	
60	0.08	0.27	0.26	0.085	0.083	0.78	
65	0.06	0.23	0.23	0.077	0.076	0.67	

Cálculo de la composición de otros productos. Aunque prácticamente todo el etanol sirvió principalmente para la síntesis de acetato de etilo, acetaldehído, ácido acético, biomasa y dióxido de carbono; la diferencia entre la suma de las fracciones de carbono (última columna de la tabla 4.IV) y la unidad indica que hay una parte del carbono no medida, por tal razón se realizó un balance de materia por elementos a las 65 horas para los tres procesos con el fin de estimar la fórmula molecular promedio de los productos no medidos. Se supuso que no quedó sulfato de amonio libre en el medio. Aunque los trabajos de Bailey y Ollis (1986) y de Shuler y Kargi (1992) establecen que los balances de materia en fermentaciones deben realizarse para 1 mol de sustrato, en este estudio se hizo el balance considerando todo el etanol consumido (v. detalles en el apéndice C).

La ecuación empleada para el balance de materia por elementos fue la siguiente:



ec. 4.7

donde:

α , coeficiente estequiométrico del etanol

β , coeficiente estequiométrico del amonio

χ , coeficiente estequiométrico del oxígeno

δ , coeficiente estequiométrico de la biomasa

ε , coeficiente estequiométrico del acetato de etilo

ϕ , coeficiente estequiométrico para el acetaldehído

γ , coeficiente estequiométrico para el ácido acético

η , coeficiente estequiométrico del dióxido de carbono

ω , coeficiente estequiométrico del agua

P, coeficiente estequiométrico para los productos no medidos

Después de realizar el balance de materia en el caso 1, se estima que la fórmula molecular promedio de los otros productos no medidos es $\text{C}_{1.869} \text{O}_{63.7} \text{N}_{0.065}$; estos

pueden ser algunos aminoácidos, ácido cítrico o ácidos grasos volátiles. Para el caso 2, se resolvió la ecuación 4.7 dando $C_{2.0} H_{3.4} O_{1.2} N_{0.03}$ como composición de P. Dado el bajo contenido en nitrógeno, se descarta la posibilidad de que los productos formados sean aminoácidos. La resolución de la ecuación 4.7 para el tercer caso, permitió estimar que la fórmula molecular de los otros productos no medidos es: $C_{2.9} H_{4.3} N_{0.02}$. Una vez más, es posible descartar la producción de aminoácidos. Es posible especular respecto a estos compuestos no cuantificados, éstos pueden ser ácidos orgánicos del TCA, acetoína o alcoholes de 3 y cuatro carbonos (Kuriyama y Kobayashi, 1993). En la tabla 4.V se presentan todos los coeficientes estequiométricos calculados en los tres experimentos, así como la fórmula molecular de los productos no medidos.

Tabla 4.V. Balance global de materia (65 horas) para el cultivo por lote alimentado de *Candida utilis*.

Caso	1	2	3
Alimentación de etanol (g/h/L)	0.60	0.63	2.00
Coeficiente			
α	3.006	2.765	5.24
β	0.30	0.152	0.12
χ	41.995	0.980	1.02
δ	0.238	0.116	0.11
ε	0.436	0.160	0.60
ϕ	0.047	0.063	1.21
γ	0.284	0.378	0.41
η	0.900	1.190	1.19
ω	21	4.630	6.89
Fórmula empírica de P	$C_{1.869} O_{63.7} N_{0.065}$	$C_{2.0} H_{3.4} O_{1.2} N_{0.03}$	$C_{2.9} H_{4.3} N_{0.02}$

Al hacer una comparación entre los tres experimentos se establece lo siguiente:

Las mayores concentraciones de acetato de etilo se obtienen cuando hay una mayor concentración de células en el medio, 13 g/L para una biomasa de alrededor de 18 g/L.

Correspondientes a un $Y_{X/Ec} = 0.35$ g/g y un $Y_{AE/X}=1$. Para velocidades de alimentación de alcohol de 1.3 g/h.

Al considerar el análisis de las productividades y los rendimientos, es posible obtener un rendimiento de acetato de etilo para concentraciones de biomasa superiores a 15 g/L; sin embargo, la productividad volumétrica y específica disminuyen cuando se detiene el crecimiento de la levadura sobre etanol (después de las 35 horas) y a partir de este tiempo consiguen los mejores rendimientos de éster (0.2-0.4) hasta las 50-55 horas del cultivo, por tal razón es deseable tratar de establecer un modelo de producción parcialmente asociada al crecimiento del éster. Esta síntesis se ve afectada también por la concentración de oxígeno en el medio y el nivel de alcohol en el medio (la conversión aumenta con la concentración de etanol desde 10-35 g/L). En general, la producción de acetaldehído y ácido acético se ve favorecida cuando las células de *Candida utilis* dejan de reproducirse en el medio y las concentraciones de oxígeno disuelto son superiores a 30. Es posible decir que en un medio sintético, resulta difícil dirigir exclusivamente la producción a un solo metabolito.

Capítulo 5:

Conclusiones

Del estudio del crecimiento de *Candida utilis* sobre etanol y/o glucosa en cultivos por lote es posible concluir:

- No es necesaria la presencia de azúcar en el medio de cultivo para que se de la producción de acetato de etilo por *C. utilis*; y esta producción mejora con la adición de etanol.
- Es básico mantener la concentración de etanol a un nivel mayor a 10 g/L en el medio de cultivo para que se den mejores rendimientos de acetato de etilo. Se presenta un valor umbral de ácido acético alrededor de 1 g/L para que inicie la síntesis del éster.
- La levadura empleada en este estudio presenta capacidad para producir otros ésteres distintos al acetato de etilo.

Respecto a los cultivos por lote alimentado de *C. utilis* creciendo sobre etanol como única fuente de carbono puede concluirse que:

- Las concentraciones más altas de acetato de etilo se obtienen cuando hay una mayor concentración de células en el medio a una velocidad de alimentación de alcohol de 0.6 g//L/h. La síntesis de acetato de etilo se ve afectada por la concentración de oxígeno, los niveles superiores se obtienen arriba de 10% de OD y debajo de 80%; sin embargo, si se desea evitar la producción de ácido acético debe cuidarse que el nivel relativo de oxígeno en el medio se mantenga por debajo del 70%. La síntesis de este éster también es afectada por el nivel de alcohol en el medio (la conversión aumenta con la concentración de etanol desde 10-35 g/L).
- En general, la producción de acetaldehído y ácido acético se ve favorecida cuando las células de *Candida utilis* dejan de reproducirse.
- El acetaldehído se acumula a concentraciones de etanol mayores a 15 g/L y su producción se ve favorecida cuando las células de *C. utilis* dejan de reproducirse y

cuando en el medio las concentraciones de oxígeno disuelto son superiores a 30%. Si la alimentación de alcohol es mayor (2/g/L/h) se aumenta la síntesis de aldehído

- Una vez que se alcanza X_{max} en un cultivo alimentado continuamente con vapores de etanol, se presenta una relación de qE/qO constante.
- Al haber un aumento en la velocidad de alimentación de alcohol aumentan el consumo de sustrato y mejoran las productividades de ácido acético y acetaldehído, como un mecanismo de evitar la inhibición por sustrato, además, se presentan mayores pérdidas por evaporación que impiden la inhibición por productos.
- Comparando la composición de los posibles productos, es evidente que en el caso alimentación continua de etanol 1 se obtuvieron los mejores rendimientos del éster, por lo que se confirma que es un metabolito cuya producción está ligada al crecimiento y el carbono se dirigió menos a la formación de otros productos. Sin embargo, se formaron compuestos nitrogenados, probablemente por las altas concentraciones de sulfato de amonio.

Dado que el cultivo sumergido de *Candida utilis* con alimentación continua de vapores de alcohol como única fuente de carbono es útil para producir acetato de etilo y acetaldehído y que la fisiología de *C. utilis* en estas condiciones es interesante para aplicaciones potenciales (por ejemplo, eliminación de etanol en corrientes gaseosas industriales); se propone para estudios posteriores tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

Incluso en un medio sintético resulta difícil dirigir exclusivamente la producción a un solo metabolito. Si se utilizan vinazas en este tipo de bioconversiones, sería conveniente hacer crecer a las células de levadura sobre este residuo previamente tratado y después alimentar etanol continuamente para producir acetato de etilo y/o acetaldehído manejando las condiciones de operación (directamente relacionadas con el nivel de alcohol en el medio) con el fin de aprovechar las células que ya crecieron.

Si se limita la producción de biomasa a 10 g/L, y se mantiene una alimentación de etanol alta (2g/L/h) se podrán alcanzar máximas eficiencias en la biosíntesis. Por otro lado, a tasas de aireación de 0.21 VVM, se limita la inhibición por sustrato y se presentan mayores pérdidas por evaporación que impiden la inhibición por productos. Esto debe tomarse en cuenta cuando se desee remover estos metabolitos continuamente, siendo fácilmente separables por destilación a presión reducida.

El sistema para producir acetato de etilo y acetaldehído con *C. utilis* es muy sensible a las condiciones de operación. El monitoreo continuo del coeficiente respiratorio permite ubicar las vías biosintéticas que sigue *C. utilis*, pudiendo manipular sensiblemente las condiciones de operación para la producción de acetato de etilo y acetaldehído. El valor de CR para estos procesos es cercano a 0.5. Tomando en cuenta las productividades y los rendimientos, los mejores rendimientos de acetato de etilo se consiguen para concentraciones de biomasa superiores a 15 g/L; y las productividades volumétrica y específica disminuyen cuando se detiene el crecimiento de la levadura sobre etanol, por tal razón es deseable tratar de establecer un modelo para la síntesis de este éster, tomando en cuenta que es un metabolito cuya producción se asocia parcialmente al crecimiento.

Bibliografía

Aldrich-Sigma Catálogo. 1999. U.S.A. Chem. Co. Biochemicals organic compounds for Research and Diagnostic Reagents.

Armstrong, D.W. 1988. Selective production of ethyl acetate by *Candida utilis* en Biogeneration of aromas. T. Parliment y R. Croteau Eds. ACS publishers. pp 254-265.

Armstrong, D.W.; Martin, S.M. y H. Yamazaki. 1984a. Production of acetaldehyde from ethanol by *Candida utilis*. **Biotech. Letters**. 6(3): 183-188.

Armstrong, D.W.; Martin, S.M. y H. Yamazaki. 1984b. Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*. **Biotechnol. Bioeng.** 26:1038-1041.

Bailey, J.E. y D.F. Ollis. 1986. Biochemical engineering fundamentals. 2a. ed. Ed. McGraw-Hill International. 984 p.

Bol, J.; Knol, W. y T. Brink. 1987. Optimization of the production of ethyl acetate from ethanol by *Hansenula anomala*. **Dechema Monographs**. 105: 235-236.

Brown, C.M. y Rose, A.H. 1969. Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. **J. of Bacteriol.**, 99(2): 371-378.

Cheetham, P.S.J., 1993. The use of biotransformations for the production of flavors and fragrances. **TIB Technol.** 11: 478-488.

Cheetham, P.S.J., 1994. The flavour and fragrance industry. En Biotechnology, the Science and the Business. Capítulo 26.

Chiang, H.K.; Foutch, G.L. y W.W. Fish. 1991. Biological production of acetaldehyde from ethanol using non-growing *Pichia pastoris* whole cells. **Applied Biochem. and Biotech.** 28/29: 513-525.

- Christen, P.; Domenech, F.; Páca, J. Y Revah, S. 1999. Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. **Bioresource Technology**. 68:193-195.
- Corzo, G.; Revah, S. y Christen, P. 1994. Effect of oxygen on the ethyl acetate production from continuous ethanol stream by *Candida utilis* in submerged cultures. In Ed. G. Charalombous, Food flavors: generation, analysis and process influence. Elsevier, Amsterdam, pp 1141-1154.
- Cysewsky G.R. y C.R. Wilke. 1978. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnol. Bioeng.** 20: 1421-1445.
- Data R. 1981. Production of organic esters from biomass novel processes and concepts. **Bioetchnol. Bioeng. Symp.** 11: 521-532.
- Davies, R.; Falkiner, E.A.; Wilkinson, J.F. y J.L. Peel. 1951. Ethyl acetate formation by *Hansenula* species. **Biochem. J.** 48: 58-61.
- Domenech, F.; Christen, P.; Páca, J. Y Revah, S. 1999 Ethanol utilization for metabolite production by *Candida utilis* strains in liquid medium. **Acta Biotechnol.** 19(1): 27-36.
- Felder, R. M. y Rousseau, R.W. 1981. Principios básicos de los procesos químicos. Editorial El Manual Moderno, México. Pp 87.
- Frank, G.T. y K.K: Sirkar. 1985. Alcohol production by yeast fermentation and membrane extraction. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** No. 15: 621-631.
- Friedrich, J. y A. Cimerman. 1992. Use of fungi for bioconversion of distillery waste. En Handbook of Applied Mycology, Fungal Biotechnology. Vol 4. D.K. Arora; R.P. Elandin e Iseji. Eds. pp 963-992.
- Gancedo C. y R. Serrano. 1989. Energy yielding metabolism en The yeast Vol. 3. Ed. A.M. Rose y J.S. Harrison. Pub. Acad. Press. London. pp 205-260.

- García, G.M. y R.R. Quintero. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial LIMUSA. México. pp 223-247.
- Gatfield, I.L. 1988. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. **Food Technol.** 10: 110-120.
- Hodge, D.S. y J. S. Devanny. 1992. Biofilter treatment of ethanol vapors. **Environ.l Progress.** 2: 15-32.
- Janssens, L.; Pooter, H.L.; Schamp, N.M. y Vandamme, E.J. 1992. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochem.** 27: 195-215.
- Kallel-Mhiri, .H.; Engasser, J.M. y A. Miclo. 1993. Continuous ethyl acetate production by *Kluyveromyces fragilis* on whey permeate. **App. Microbiol. and Biotech.** 40: 201-205.
- Kallel-Mhiri, H. y A. Miclo. 1993. Mechanism of ethyl acetate synthesis by *Kluyveromyces fragilis*. **FEMS Microbiol. Letters.** 11: 207-212.
- Kiani, A.; Bhave, RR. y K.K. Sirkar. 1984. Solvent extraction with immobilized interfaces in a microporous hydrophobic membrane. **J. of membrane Sci.** 20: 125-145.
- Kim, C.H. y S.K. Rhee. 1992. Enzymatic conversion of ethanol into acetaldehyde in a gas-solid bioreactor. **Biotech. Letters.** 14 (11): 1059-1064.
- Kuriyama, H. y H. Kobayashi. 1993. Effects of oxygen supply on yeast growth and metabolism in continuous fermentation. **J. of Fermentation and Bioeng.** 75 (5): 364-367.
- Lanza, E. y J.K. Palmer. 1977. Biosynthesis of monoterpenes by *Ceratocystis moniliformis*. **Phytochem.** 16: 1555-1560.
- Laplace, J.M.; Delgenes, J.P.; Moletta, R. y J.M. Navarro. 1991. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* and

Zymomonas mobilis: oxygen requirement as a key factor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 158-162.

Latrasse, A.; Alabouvette, C. y J. Sarris. 1986. Novel Aromas of fungal origin. **Symbiosis.** 2: 235-245

Lehninger, A. 1984. "Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular". 2a. ed. Ed. Omega. España. 1117 p.

Lencki, R.W.; Robinson, C.W. y M. Moo-Young. 1983. On line extraction of ethanol from fermentation broths using hydrophobic adsorbents. **Biotechnol. Bioeng. Sym . No. 13.**: 617-628.

Lin, T.B.; Chung, D.L.; Chang, J.R. 1999. Ethyl acetate production from water containing ethanol catalyzed by supported Pd catalyst: advantages and disadvantages of hydrophobic supports. **Industrial and Eng. Chem. Research.** 38 (4): 1217-6 (abstract).

Maga, J. A. 1976. The potential of certain fungi as sources for natural flavor compounds. **Chemical senses flavor.** 2: 255-262.

Malcorps, P.; Cheval, J.M.; Jamil, S.; Dufour, J.P. 1991. A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** 49:47-53.

Matsumura M. y H. Kataoka. 1987. Separation of dilute aqueous butanol and acetone solutions by pervaporation through liquid membranes. **Biotechnol. Bioeng.** 30 : 887-895.

Matsumura M. y H. Markl. 1986. Elimination of ethanol inhibition by perstraction. **Biotechnol. Bioeng.** 28 : 534-541

Matsumura M.; Kataoka H; Sucki K y A. Yokohama. 1988. Energy saving affect of pervaporation in using aloyl alcohol liquid membrane in butanol purification. **Bioprocess Eng.** 3 : 93-100.

Mc Closkey, L.P. 1981. An enzymatic assay for acetaldehyde in grape juice and wine. **American J. of Enology and Viticulture**. 32 (2): 159-162.

Meza, J.C.; Christen, P.; Revah, S. 1998. Effect of added aminoacids on the production of a fruity aroma by *Ceratocystis fimbriata*. *Sciences des-aliments*. 18(6): 627-636. (abstract).

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** 31 (3), 426-428.

Minier M. y G.Goma. 1982. Ethanol production by extractive fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 24 : 1565-1579.

Moya, J.; Howard Reed, C.; Corsi, R.L. 1999. Volatilization of chemicals from tap water indoor air from contaminated water for showering. **Environ. Sci. And Technol.** 33 (14): 2321-7 (abstract).

Murray, W.D.; Duff, S.J.B.; Lanthier, P.H.; Armstrong, D.W.; Welsh, F.W. y R.E. Williams. 1988. Development of biotechnological processes for the production of natural flavors and fragrances en Frontiers of Flavor. G. Charalombous Ed. Elsevier Science Publishers. pp: 1-18.

Nakao SI; Saitoh F; Asakura T; Toda K y S. Kimura. 1987. Continuous ethanol extraction by pervaporation from a membrane bioreactor. **J. of membrane Sci.** 30: 273-287.

Páca, J. y J. Votruba. 1994. External conditions influencing ethanol oxidation by resting cells of *Candida utilis*. **Folia Microbiol.** 39 (1): 65-70.

Páca, J. y Marek, J. 1996 a. Catabolic activity of *Candida utilis* under increased ionic strength. **SMYTE.** 42: 270.

Páca, J. y Marek, J. 1996 b. Catabolic activity, energy state and transport of organic acids in *Candida utilis* at different osmotic pressures. **SMYTE.** 41: 118-119

Perry. 1973. Manual del ingeniero químico, 5a. ed. Capítulo 3.

Prokop A, Votruba J; Sabotka M y J. Panos. 1978. Yeast SCP from ethanol: measurements, modelling and parameter estimation in a batch system. **Biotechnol. Bioeng.** 20: 1523-1540.

Shindo, S.; Murakami, J. y S. Koshino. 1992. Control of acetate esters formation during alcohol fermentation with immobilized yeast. **J. Ferment. Bioeng.** 73(5): 370-374.

Shuler, M.L. y Kargi, F. 1992. "Bioprocess Engineering". Prentice Hall. Cap. 6.

Stanley, G.A.; Douglas, N.G.; Every, E.J.; Tzanatos, T. y Pamment, N.1993. Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. **Biotech. Letters.** 15 (12): 1199-1204.

Stanley, G.A.; Hobley, T.J. y Pamment, N.B. 1997. Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zimomonas mobilis* subjected to environmental shocks. **Biotech Bioeng.** 53: 71-78.

Tabachnick, J. y M.A. Joslyn. 1953. Formation esters by yeast. **J. Bacteriol.** 65: 1-9.

Thomas, K.C. y P.S.S. Dawson. 1978. Relationship between iron-limited growth and energy limitation during phased cultivation of *Candida utilis*. **Can. J. Microbiol.** 24: 440-447.

Uhl, S. 1996. Ingredientes: The Building Blocks for Developing "New" Ethnic Foods. *Food Technology*. July: 79-84.

Votruba, J. y Páca, J. 1992. Phenomenological theory of substrate-induced acidification with application to *Candida utilis* dissimilating ethanol. **Folia Microbiol.** 37 (2): 133-139.

Watteeuw, C.M.; Armiger, W.B.; Ristroph, D.L. y A.E. Humphrey. 1979. Production of single cell protein from ethanol by fed batch process. **Biotech. Bioeng.** 21: 1221-1237.

Welsh, F.W. y R.E. Williams., 1990. Lipase mediated production of ethyl butyrate and butyl butyrate in nonaqueous systems. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 743-746.

Willems, A. 1989. Ester formation from ethanol by *Candida pseudotropicalis* . **Anton van Leeuwenhoek.** 55: 175-180.

Williams, R.E.; Armstrong, D.W.; Murray, W.D. y F.W. Welsh. 1988. Enzyme and whole cell production of flavor and fragrances compounds en.Flavor and fragrance compounds. **Ann. New York Acad Sci.** pp 406-412.

Yong, F.M. y G. Lim. 1986. Effect of carbon source on aroma production by *Trichoderma viride*. **MIRCEN J.** 2:483-488.

Yoshioka, K. y N. Hashimoto. 1981. Ester formation by alcohol-acetyltransferase from brewers' yeast. **Agr. Biol. Chem.** 45 (10): 2138-2190.

Yoshioka, K. y N. Hashimoto. 1984a. Acetyl-CoA of brewers' yeast and formation of acetate esters. **Agr. Biol. Chem.** 48 (1): 207-209.

Yoshioka, K. y N. Hashimoto. 1984b. Ester formation by brewers' yeast during sugar fermentation. **Agr. Biol. Chem.** 48 (2): 333-340.

PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS EMPLEADOS

	PUNTO DE EBULLICIÓN °C	PUNTO DE FUSIÓN, ° C	SOLUBILIDAD EN 100 PARTES DE AGUA	PRESIÓN DE VAPOR A 30 °C	PESO ESPECÍFICO	PESO MOLECULAR
ACETALDEHÍDO	20.2	-123.5	∞	769 mm Hg	0.783	44
ETANOL	78.4	-112	∞	77.98	0.79	46
ÁCIDO ACÉTICO	118.1	-16.7	∞	20	1.049	60
BUTANOL	117.1	-90	9.5	10	0.81	74.12
ÁCIDO BUTÍRICO	154.5	-47		1.74	0.949	88.1
ACETATO DE ETILO	77.1	-82.4	8.5	120	0.901	88
ACETATO DE BUTILO	125	-76.3	0.7	26.57	0.882	116.2
BUTIRATO DE BUTILO	165				0.872	144.2
ISOPROPANOL	82.5	-85.8	∞	60	0.789	60.09

Fuente: Perry, 1973; Aldrich, 1999.

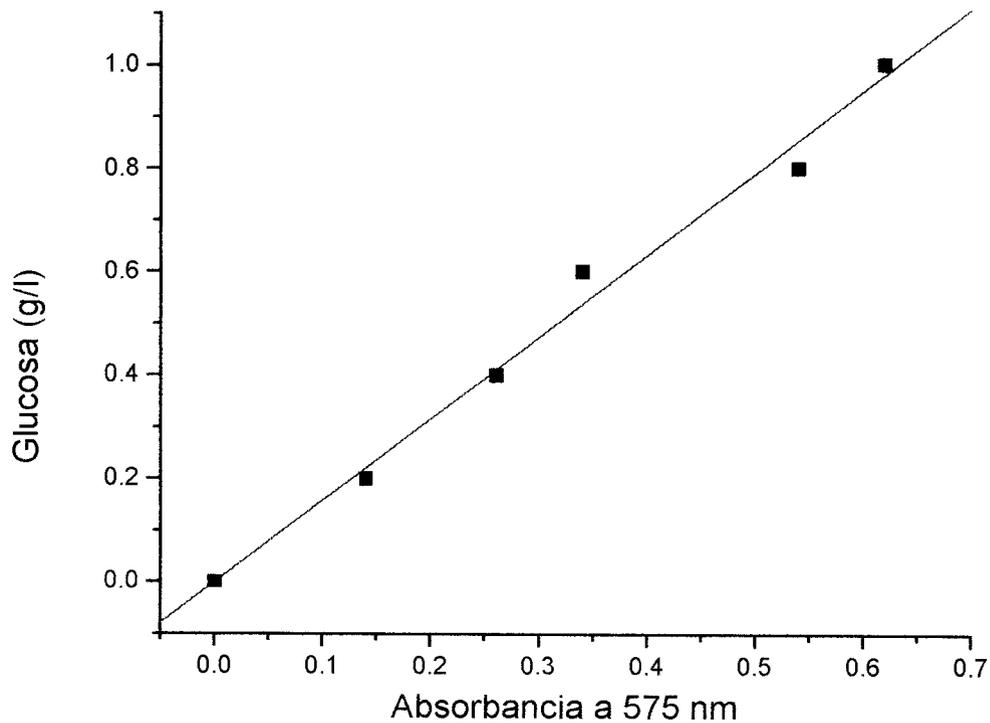
Determinación de glucosa.

La cuantificación de azúcares reductores se hace de acuerdo al método de Miller (1959) del ácido dinitrosalicílico (DNS) con una solución patrón de 0-1 g/l de glucosa. El reactivo de DNS tiene la siguiente composición:

NaOH	1.4%
DNS	1 g/l
Tartrato de potasio y sodio	2.16%
Fenol	0.54 %
Metabisulfito de sodio	0.59%

Tomar 1 ml de muestra y mezclar con 1 ml de reactivo, poner a ebullición durante 5 minutos. Adicionar 8 ml de agua destilada y agitar.

Leer absorbancia a 575 nm.



$$C_{\text{glucosa}} \text{ (g/l)} = -0.00048 + 1.58047 \cdot A_{575} \quad , R=0.99444$$

Medición de volátiles.

El etanol, acetato de etilo y acetaldehído se midieron por cromatografía de gases (HP-5890.SERIE II) con un detector de ionización a la flama, empleando una columna empacada PORAPAK Q para su separación. El flujo del gas acarreador (N₂) fue de 35 ml/min, la temperatura del horno, de 170°C. Para la fase líquida se utilizó isopropanol al 0.5% (v/v) como estándar interno. Se hicieron inyecciones de 0.5 µl. La fase gaseosa requirió del empleo de ampollas ALTECH de 500 ml con un volumen de inyección de 50 µl.

Fase líquida

Att 3 Rng 2

T horno 170°C

T inyector y detector 210 °C

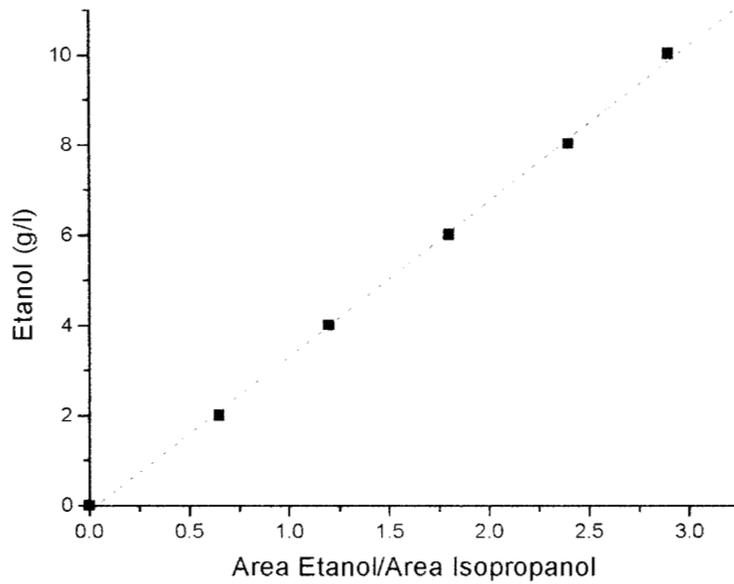
PN₂= 110 KPa

Area isopropanol: 20-25 millones

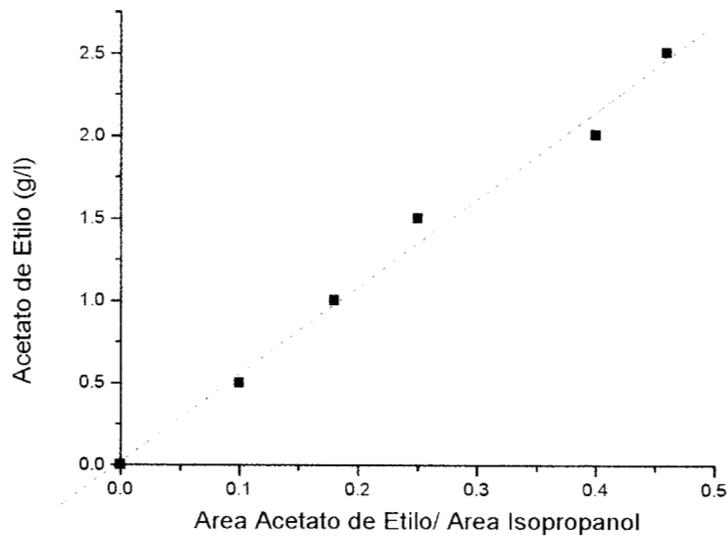
Tiempos de retención (min)

etanol: 2.2, acetaldehído: 1.26, isopropanol: 3.01, acetato ,de etilo 3.01

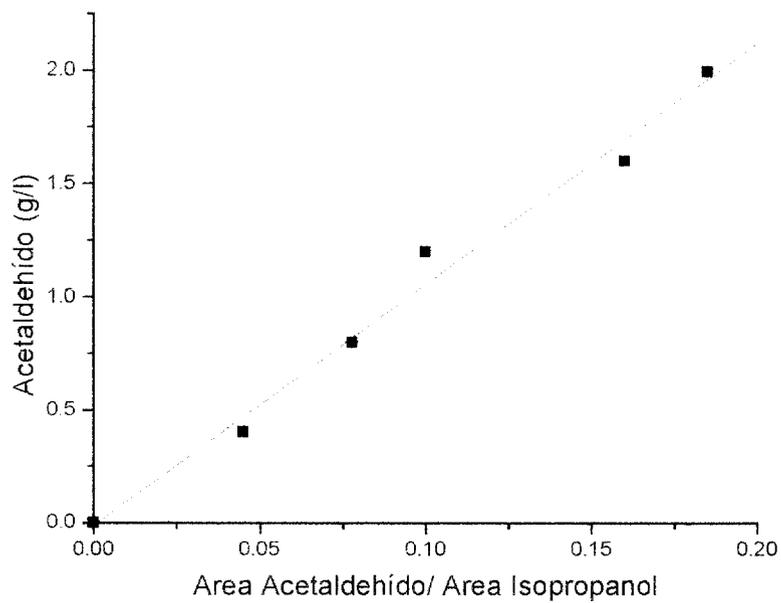
Fase acuosa



$$\text{Etanol (g/l)} = -0.1258 + 3.43629 \cdot \text{AE/AI}, R=0.99949$$

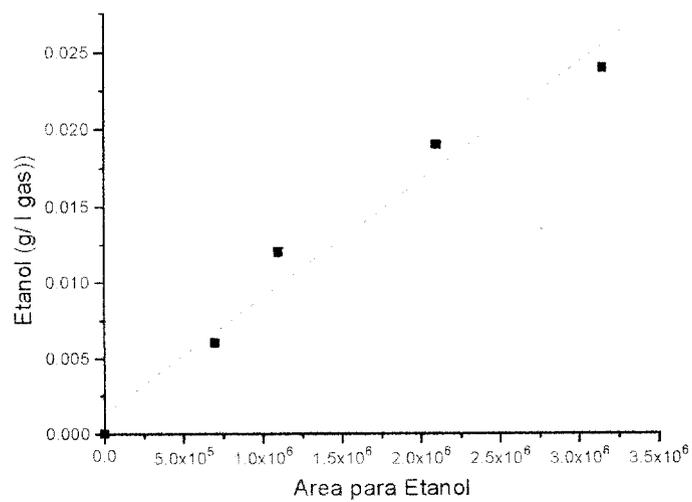


$$\text{Ac de Etilo (g/l)} = 0.2409 + 5.29183 \cdot \text{AAE/AI}, R= 0.99439$$

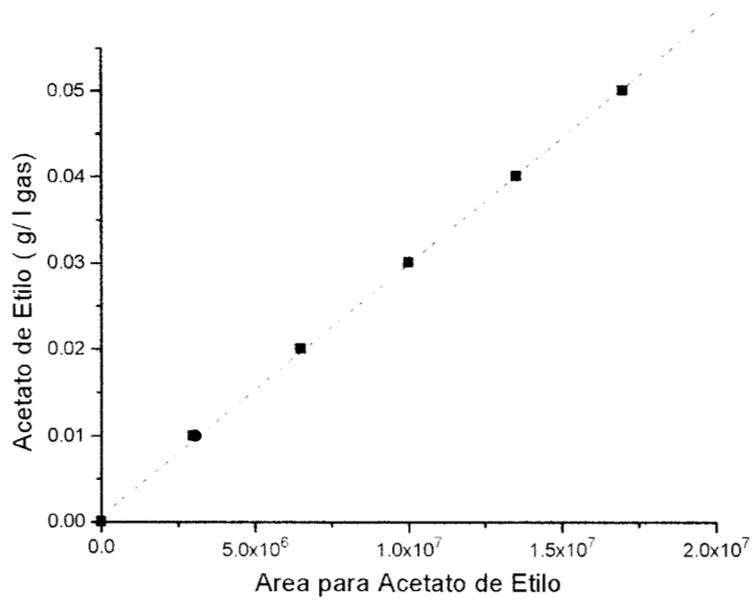


$$\text{Acetaldehído (g/l)} = -0.01235 + 10.69389 \cdot \text{AA/AI}, R = 0.99342$$

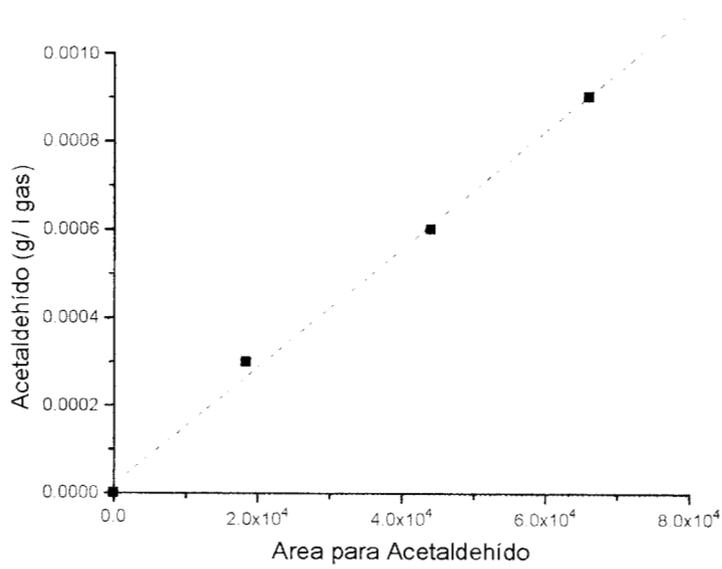
Fase gaseosa



$$E \text{ (g/l gas)} = 0.00135 + 7.697e-9 \cdot \text{Area}, R = 0.98393$$



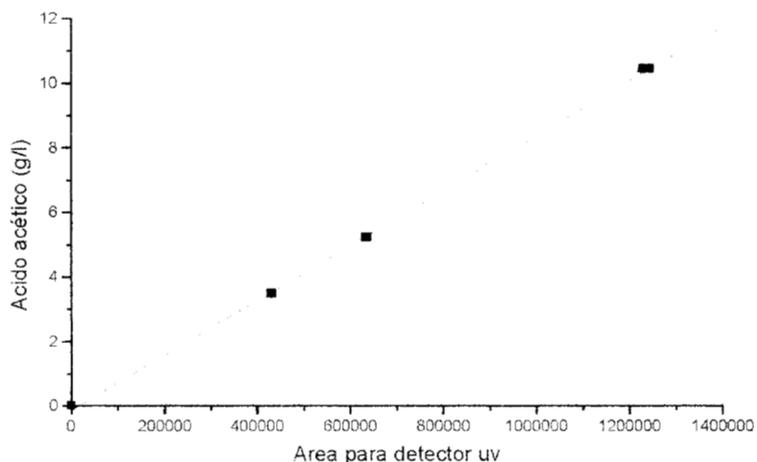
$$AE \text{ (g/l gas)} = 0.00071 + 2.915e-9 \cdot \text{Area}, R = 0.99971$$



$$A \text{ (g/l gas)} = 0.00002 + 1.3368e-8 \cdot \text{Area}, R = 0.99819$$

Cuantificación de ácido acético.

El ácido acético se determinó por cromatografía de líquidos usando un cromatógrafo Hewlett Packard 1081, equipado con un detector UV ($\lambda = 210$ nm). La separación fue realizada con una columna de Aminex HPX 87H (Bio-Rad, USA). La temperatura del horno fue de 65°C y se utilizó una solución 6mM de ácido sulfúrico como eluyente a un flujo de 0.8 ml/min.



$$\text{Ac. acético (g/ l)} = -0.1299 + 8.5225e-6 * \text{Area}, R = 0.99975$$

Cuantificación de O₂ y CO₂

Las determinaciones de las concentraciones de oxígeno y nitrógeno se realizaron simultáneamente, empleando la misma muestra, por cromatografía de gases con un equipo Gow-Mac (USA); este equipo cuenta con un detector de conductividad térmica y una columna doble tipo CTR-1 (Alltech, USA). El volumen de inyección fue de 100 μ l, se utilizó helio como gas acarreador (flujo, 60ml/min).

Cálculos realizados:

$$\%O_2 = \%N_2\text{aire} * \left(\frac{AO_2}{AN_2} \right) * \left[\frac{1}{K_{O_2/N_2}} \right]$$

$$\%CO_2 = \%N_2\text{aire} * \left[\frac{1}{K_{CO_2/N_2}} \right] \left(\frac{ACO_2}{AN_2} \right) \left(\frac{AO_2 + AN_2}{A\text{aire}} \right)$$

donde

$$K_{O_2/N_2} = 0.9953, K_{CO_2/N_2} = 1.1238$$

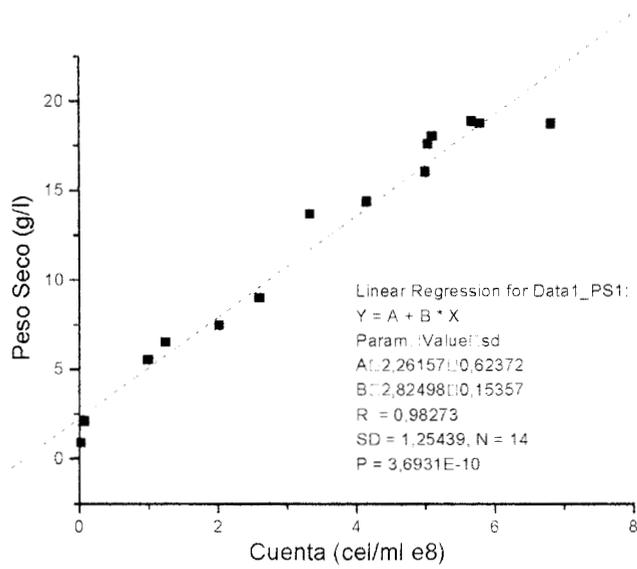
$$\text{Concentración de } O_2 = \frac{50.1 \text{ ml } O_2 / \text{laire}}{6.48 \%} * \% O_2 \text{ calculado} * pO_2$$

$$\text{Concentración de } CO_2 = \frac{149.7 \text{ ml } O_2 / \text{laire}}{14.97 \%} * \% CO_2 \text{ calculado} * pCO_2$$

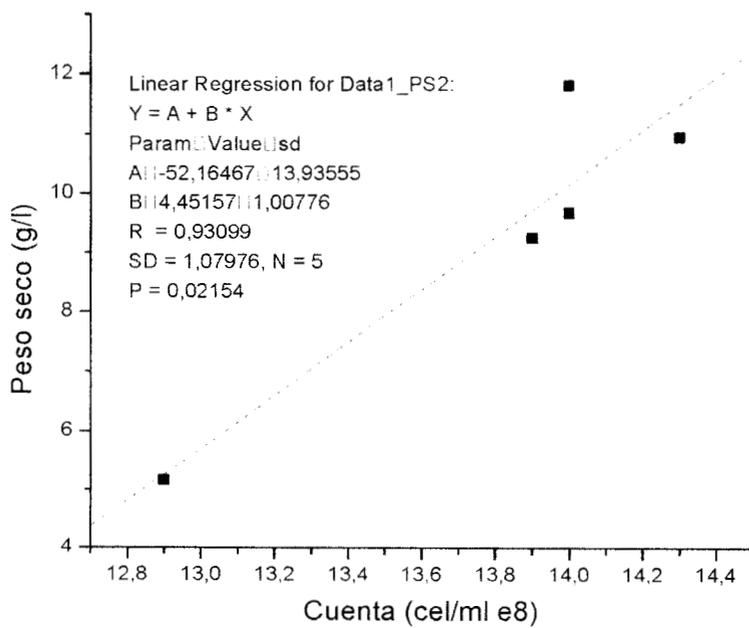
Los valores 6.48% y 14.97% provienen de la realización de una curva de una mezcla de gases que contenía CO (6.97%v/v), CO₂ (14.97%v/v), O₂ (5.01%v/v) y N₂ (73.05%v/v).

Correlación entre el Peso seco y la concentración celular para el cultivo por lote alimentado de *Candida utilis* creciendo sobre etanol

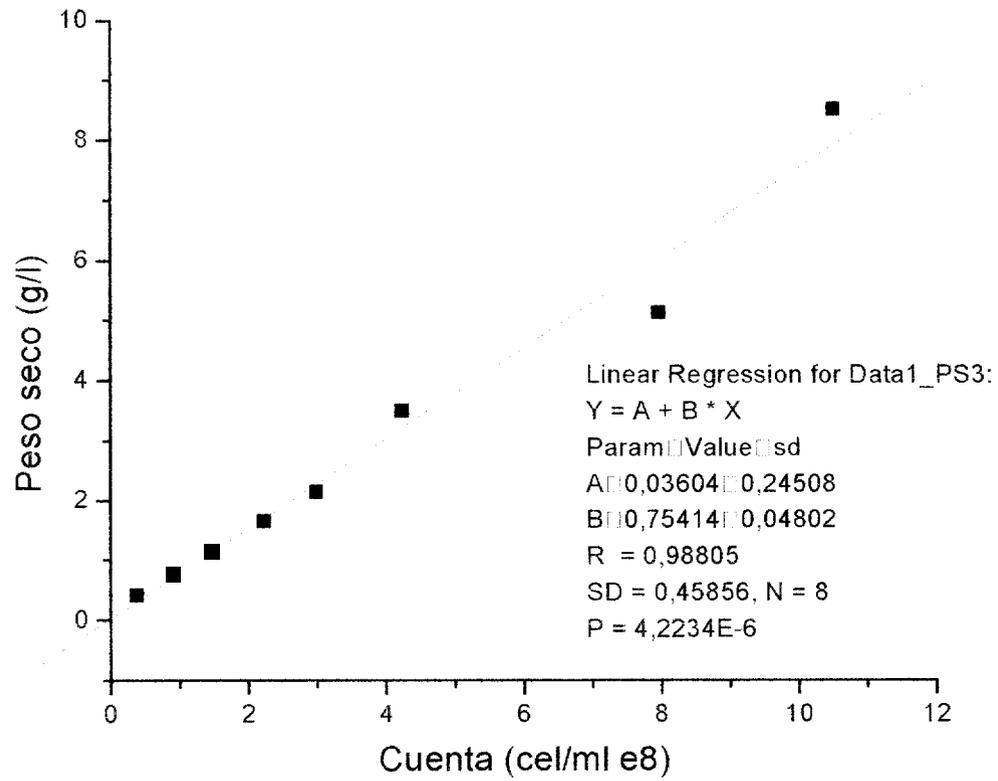
Caso 1



Caso 2



Caso 3



CASO 1

Mediciones en el reactor (g/l) y volátiles a la salida del reactor (g/l)

Tiempo (horas)	X	E	A	AE	AA	%OD	A	E	AE
0	0.88	2.06	0.10	0.03	0.00	75.0	0.00000	0.0000	0.0000
5	2.08	5.27	0.10	0.09	0.12	62.6	0.00004	0.0085	0.0004
10	5.52	2.40	0.06	0.57	0.50	46.9	0.00004	0.0064	0.0070
15	6.50	1.20	0.10	0.72	0.90	35.0	0.00000	0.0133	0.0053
20	7.43	0.16	0.20	0.98	1.29	21.0	0.00000	0.020	0.0025
25	8.97	1.47	0.65	0.95	1.35	5.0	0.00000	0.0050	0.0020
30	13.64	11.86	0.10	2.42	2.31	3.0	0.00009	0.0050	0.0054
35	14.35	10.24	0.02	2.91	4.80	3.0	0.00000	0.0030	0.0050
40	16.00	9.01	0.03	6.30	5.10	4.0	0.00004	0.0120	0.0065
45	17.54	7.93	0.05	8.16	5.83	4.6	0.00009	0.021	0.0080
50	18.00	6.00	0.07	10.0	6.10	3.0	0.00040	0.0170	0.0104
55	18.83	2.62	1.00	14.11	6.44	5.0	0.00141	0.0000	0.0529
60	18.70	9.00	1.00	12.60	6.90	4.7	0.00000	0.0000	0.0142
65	18.68	10.04	1.02	10.98	8.12	5.0	0.00000	0.0000	0.0097

RESPIRACIÓN.

Tiempo (h)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	qO ₂ (g/L/h)	Vel salida CO ₂ (g/h)	Tasa de eliminación de alcohol (g/m ³ h)
0	0.00	20.00	0.3127	0	0
5	1.54	15.9	0.875	0.4	580
10	3.40	9.55	1.7458	0.42	1151.9
15	2.40	15.04	0.9929	0.44	1120.9
20	1.30	14.70	1.0395	0.23	1086.4
25	1.31	15.00	0.9984	0.29	886.9
30	0.81	17.54	0.6500	0.24	757.3
35	0.65	18.91	0.4622	0.21	690.5
40	0.56	19.02	0.4471	0.16	767.7
45	0.43	19.18	0.4251	0.12	821.2
50	0.40	19.20	0.4223	0.11	842.5
55	2.70	13.98	1.1383	0.22	937.9
60	2.57	14.10	1.1218	0.71	863.6
65	2.25	15.05	0.9915	0.78	1015.7

BALANCE DE ETANOL Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS (g)

Tiempo (h)	Σ entrada (g)	Σ salida (g)	Σ medio (g)	Σ consumido (g)	Productos formados (g)			
					X	A	AE	AA
0	0.00	0	4.33	0.00	0.00	0.000	0.000	0.00
5	13.79	0.956	11.07	6.09	2.52	0.004	0.164	0.25
10	26.20	1.295	5.04	24.19	9.74	0.000	1.563	1.05
15	35.86	2.359	2.52	35.31	11.80	0.007	2.138	1.89
20	45.52	3.919	0.34	45.63	13.75	0.218	2.944	2.21
25	50.80	4.394	3.09	46.56	16.99	0.000	3.071	2.83
30	59.31	5.036	24.91	47.71	26.70	0.014	6.608	4.85
35	74.8	5.456	21.50	50.75	28.29	0.000	8.337	10.08
40	86.89	6.952	18.92	64.49	31.75	0.000	18.156	10.71
45	100.69	9.472	16.65	77.66	34.99	0.000	24.862	12.24
50	108.6	11.512	12.60	88.46	35.95	0.055	29.476	12.81
55	121.38	11.512	5.50	108.33	37.69	2.048	37.899	13.52
60	135.26	11.512	18.90	108.82	37.42	2.048	38.176	14.49
65	166.90	11.512	21.08	138.64	37.38	2.090	38.344	17.05

CASO 2

Mediciones en el reactor (g/l) y volátiles a la salida del reactor (g/l)

Tiempo (horas)	X	E	A	AE	AA	%OD	A	E	AE
0	0.88	13.68	0.00	0.08	0.14	6.8	0.0	0.012	0.002
5	3.82	17.38	0.17	0.03	0.22	7.2	0.0	0.012	0.000
10	4.16	15.2	0.19	0.04	0.40	7.2	0.0	0.001	0.000
15	5.15	13.82	0.22	0.04	0.44	7.2	0.0	0.008	0.002
20	9.24	6.72	0.4	0.53	1.15	30.0	0.0	0.002	0.002
25	9.66	5.17	1.0	4.18	1.32	25.0	0.0	0.000	0.002
30	10.93	6.93	1.7	3.15	1.85	40.0	0.0	0.000	0.002
35	11.80	8.00	1.7	3.23	4.85	46.0	0.0	0.000	0.002
40	12.35	9.7	1.7	3.24	3.28	50.0	0.0	0.000	0.003
45	12.61	9.99	2.1	3.10	3.70	67.0	0.0	0.012	0.020
50	12.88	24.21	3.2	4.63	2.58	65.0	0.0	0.008	1.017
55	12.81	18.00	3.0	3.10	6.00	64.0	0.0	0.006	0.017
60	12.00	10.00	2.5	4.18	9.50	60.0	0.0	0.004	0.018
65	12.71	3.30	2.3	3.36	11.50	79.0	0.0	0.002	0.019

RESPIRACIÓN.

Tiempo (h)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	qO ₂ (g/L/h)	Vel salida CO ₂ (g/h)	Tasa de eliminación de alcohol (g/m ³ h)
0	0	17.7	0.6240	0	0
5	0.9	18.0	0.5879	0.025	157.1
10	1.2	17.7	0.6240	0.35	306.2
15	1.4	17.3	0.6788	0.39	405.08
20	2.3	15.1	0.9807	0.64	887.14
25	2.4	15.5	0.9257	0.67	1150.7
30	2.0	16.2	0.8297	0.56	1027.5
35	2.2	15.7	0.8983	0.61	1026.9
40	2.4	15.3	0.9531	0.67	1010.9
45	2.7	14.9	1.0003	0.75	996.1
50	2.3	16.1	0.8434	0.64	732.0
55	3.0	16.7	0.7611	0.83	795.4
60	3.7	17.2	0.6926	1.03	876.11
65	4.4	17.8	0.6103	1.22	931.8

BALANCE DE ETANOL Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS.

Tiempo (h)	Σ entrada (g)	Σ salida (g)	Σ medio (g)	Σ consumido (g)	Productos formados (g)			
					X	A	AE	AA
0	0	0.00	29.74	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	7	1.15	37.24	1.65	1.09	0.35	0.00	0.17
10	11	2.45	32.36	6.43	1.78	0.41	0.78	0.40
15	16	3.75	29.23	12.76	3.87	0.47	1.22	0.63
20	26	4.43	14.04	37.26	12.12	0.00	5.39	2.10
25	46	4.52	10.80	60.41	12.99	0.07	11.03	2.45
30	54	4.56	14.45	64.73	15.59	1.59	10.94	3.55
35	67	4.61	16.65	75.48	17.35	1.63	11.08	5.03
40	80	4.67	20.15	84.92	18.45	1.67	11.22	6.51
45	90	5.14	20.47	94.13	18.64	2.36	11.31	7.28
50	101	5.87	49.00	76.86	18.87	4.46	15.06	4.92
55	105	6.56	36.31	91.87	18.64	3.70	14.87	10.85
60	108	7.26	20.09	110.39	16.91	3.50	14.68	16.78
65	112	7.95	6.60	127.19	18.24	2.74	14.06	22.70

CASO 3

Mediciones en el reactor (g/l) y volátiles a la salida del reactor (g/l)

Tiempo (horas)	X	E	A	AE	AA	%OD	A	E	AE
0	0.78	5.40	1.57	0.13	0.0	17.5	0.000	0.0000	0.0000
5	0.78	6.3	1.6	0.10	0.0	6.5	0.0005	0.0011	0.0000
10	1.16	7.13	1.6	0.04	0.0	5	0.0005	0.0012	0.0004
15	1.66	8.8	2.8	0.18	0.07	6.5	0.0009	0.0015	0.0022
20	2.15	10.50	4.04	0.32	0.14	13	0.0013	0.0018	0.0039
25	3.51	12.80	4.7	0.68	0.43	9.5	0.0016	0.0022	0.0081
30	5.15	15.40	7.91	1.34	2.06	6.5	0.0026	0.0026	0.0162
35	8.55	13.78	11.84	5.10	5.52	5	0.0039	0.0023	0.0612
40	9.45	12.19	10.53	5.17	5.50	5	0.0035	0.0021	0.0620
45	10.11	10.91	11.3	6.72	7.15	5.1	0.0038	0.0018	0.0812
50	10.36	14.45	13.92	4.66	7.55	5.9	0.0046	0.0024	0.0570
55	10.5	18.45	18	4.50	9.10	7.5	0.0059	0.0037	0.0399
60	8.94	22.34	22.15	3.30	10.93	12	0.0074	0.0038	0.0389
65	8.24	21.66	22.7	2.27	11.63	30	0.0075	0.0036	0.0270

RESPIRACIÓN.

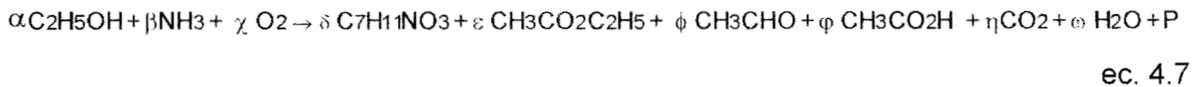
Tiempo (h)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	qO ₂ (g/L/h)	Vel salida CO ₂ (g/h)	Tasa de eliminación de alcohol (g/m ³ h)
0	0.00	21.00	0.0275	0	0
5	0.01	21.00	0.0275	0.003	561.9
10	0.25	20.22	0.0061	0.074	566.7
15	0.93	17.83	0.3596	0.28	517.8
20	1.12	16.85	0.5096	0.33	490.7
25	1.25	15.40	0.7315	0.37	477.7
30	1.64	13.57	1.0115	0.49	762.1
35	2.78	11.95	1.2594	0.83	1444.8
40	2.85	12.67	1.1492	0.85	1773.0
45	2.35	15.56	0.7070	0.70	1723.4
50	3.44	13.79	0.9778	1.03	1724
55	3.00	14.10	0.9304	0.89	1682
60	2.42	16.09	0.6259	0.72	1634.4
65	1.46	18.36	0.2785	0.43	1765.5

BALANCE DE ETANOL Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS.

Tiempo (h)	Σ entrada (g)	Σ salida (g)	Σ medio (g)	Σ consumido (g)	Productos formados (g)			
					X	A	AE	AA
0	0	0	11.21	0	0	0	0	0
5	7.8	0.11	12.98	5.9	0.73	3.26	0.27	0
10	15.6	0.22	14.62	11.9	1.49	3.4	0.18	0
15	23.46	0.32	18.04	16.31	2.15	5.94	0.6	0.14
20	31.28	0.36	21.52	20.61	3.54	8.52	0.98	0.29
25	39.82	0.56	25.6	24.87	6.14	9.79	2.4	0.86
30	68.26	0.81	30.65	48.01	9.37	16.37	5.18	4.09
35	125.14	1.5	28.66	106.19	16.93	26.25	20.84	11.49
40	164.96	1.76	25.48	148.93	18.87	24.03	28.23	11.49
45	176.32	1.98	22.69	162.86	20.15	25.96	40.22	14.87
50	201.92	2.2	29.91	181.02	20.57	31.72	42.36	15.63
55	224.12	2.68	38.38	194.27	20.95	44.83	46.32	18.93
60	244.58	3.16	46.69	205.94	17.8	51.27	53.01	22.84
65	278.72	3.45	45.49	240.99	16.43	53.21	53.13	24.42

Cálculo de la composición de los productos no cuantificados.

Se resolvió la ec. 4.7 a las 65 horas de cada caso (etanol consumido), a este tiempo también se consideró la cantidad de volátiles formados, el acumulado de oxígeno consumido y el acumulado de dióxido de carbono liberado. El sulfato de amonio se transformó en su equivalente molar de amonio.



donde:

- α , coeficiente estequiométrico del etanol
- β , coeficiente estequiométrico del amonio
- χ , coeficiente estequiométrico del oxígeno
- δ , coeficiente estequiométrico de la biomasa
- ε , coeficiente estequiométrico del acetato de etilo
- ϕ , coeficiente estequiométrico para el acetaldehído
- γ , coeficiente estequiométrico para el ácido acético
- η , coeficiente estequiométrico del dióxido de carbono
- ω , coeficiente estequiométrico del agua
- P, productos no cuantificados

Se propuso un balance por elementos.

Para carbono:

$$2\alpha = 7\delta + 4\varepsilon + 2\phi + 2\gamma + \eta + \text{Cp}$$

Para hidrógeno:

$$6\alpha + 3\beta = 11\delta + 8\varepsilon + 4\phi + 4\gamma + 2\omega + \text{Hp}$$

Para oxígeno:

$$\alpha + 2\chi = 3\delta + 2\varepsilon + \phi + 2\gamma + 2\eta + \omega + \text{Op}$$

Para nitrógeno:

$$\beta = 7\delta + \text{Np}$$