

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

**Aislamiento y selección de levaduras a partir de materiales
del procesamiento industrial de sorgo dulce para la
producción industrial de bioetanol combustible**

TESINA DE GRADO

Virginia Olij Passanante

Tutor: Dra. Ing. Quím. Claudia Lareo Varela

Co- Tutor: Ing. Quím. Daniel Ferrari Vidal

Montevideo, Uruguay

2014

RESUMEN

La materia prima y el consumo de energía en la destilación son los principales factores de costo en la producción de bioetanol combustible a partir materiales azucarados. El uso de medios con alta concentración de azúcares (Very High Gravity en inglés), superior a los 200 g/L, permitiría producir altas concentraciones de etanol y reducir el costo energético de la destilación. Sin embargo, fenómenos de inhibición causados por estrés osmótico, altas concentraciones de etanol, entre otros, hacen que las fermentaciones sean lentas e incompletas. Es indispensable disponer de levaduras industriales que fermenten altas concentraciones de azúcar, resistentes al etanol y con elevada eficiencia. En el presente trabajo se aislaron seis levaduras de materiales industriales con el fin de seleccionar una cepa con las características referidas. Se evaluó su tolerancia a diferentes concentraciones de etanol y su desempeño en fermentaciones de medios conteniendo 150 y 250 g/L de glucosa.

*Los resultados muestran que la cepa A obtuvo los mejores resultados dentro de las cepas aisladas. Presentó tolerancia a medio conteniendo 50 y 100 g/L de etanol y consiguió consumir la totalidad de la glucosa a las 18-20 h en la fermentación de un medio con 150 g/L de glucosa, logrando una producción de etanol de 66 g/L. Este comportamiento fue muy similar al observado en la levadura de panificación comercial *Saccharomyces cerevisiae*, que también logró un consumo total de glucosa y alcanzó una concentración final de etanol de 67 g/L.*

*Por otro lado, en la fermentación de un medio con 250 g/L la cepa A no logró un consumo total de la glucosa. Y alcanzó una concentración final de etanol de 79 g/L, valor inferior al obtenido por *Saccharomyces cerevisiae* (81 g/L) y por la cepa industrial CAT (108 g/L).*

La estrategia de aislamiento utilizada permitió obtener una cepa promisorio para la producción de etanol a concentraciones de glucosa habituales en la industria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 BIOCOMBUSTIBLES.....	2
1.2 BIOETANOL.....	3
1.3 BIOETANOL EN URUGUAY	6
1.4 SORGO DULCE	8
Generalidades	9
Morfología.....	11
Desarrollo biológico	13
1.5 OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE.....	14
Cosecha	15
Tratamiento pos-cosecha.....	16
Lavado y extracción de azúcares fermentables	17
Clarificación	18
Concentración	19
Fermentación	20
Destilación y rectificación	21
Deshidratación	22
1.6 FERMENTACIONES VHG	22
1.7 BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN	25
1.8 MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LAS FERMENTACIONES VHG.....	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBEJTIVO GENERAL:.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 AISLAMIENTO DE CEPAS DE MATERIALES INDUSTRIALES.....	34
3.2 ESTUDIO PRIMARIO DE LA RESISTENCIA AL ETANOL	35
3.3 SELECCIÓN DE LEVADURAS	35
3.4 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 g/L DE GLUCOSA	35
3.4.1 Microorganismos.....	35
3.4.2 Desarrollo del inóculo	36
3.4.3 Estudio de la capacidad de producción de etanol	36
3.5 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA A.....	37

3.5.1 Microorganismos.....	37
3.5.2 Desarrollo del inóculo	37
3.5.3 Determinación del peso seco	37
3.6 ANALISIS DE LA RESISTENCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL	38
3.6.1 Microorganismos.....	38
3.6.2 Desarrollo del inóculo	38
3.6.3 Estudio de la resistencia al etanol.....	39
3.7 ENSAYO DE FERMENTACIÓN DE MEDIO CON 250 g/L DE GLUCOSA	40
3.7.1 Microorganismos.....	40
3.7.2 Desarrollo del inóculo	40
3.7.3 Estudio de la capacidad de producción de etanol	41
3.8 METODOS ANALÍTICOS.....	41
3.8.1 Determinación de azúcares, alcoholes y productos de degradación mediante cromatografía líquida	41
3.8.2 Crecimiento celular	42
3.9 CALCULOS.....	42
3.10 ANALISIS ESTADÍSTICO	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS	45
4.2 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE ETANOL A CONCENTRACIONES DE 50 g/L	48
4.3 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 g/L DE GLUCOSA	49
4.4 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE A.....	53
4.5 ANALISIS DE LA RESISTENCIA AL ETANOL DE LA LEVADURA A.....	54
4.6 ENSAYO DE FERMENTACION EN MEDIO CON 250 g/L DE GLUCOSA	58
5. CONCLUSIONES	63
6. REFERENCIAS.....	65
7. ANEXO	78
ANÁLISIS DE RESULTADOS DE VARIANZA PARA DIFERENTES PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 g/L DE GLUCOSA.....	79
ANÁLISIS DE RESULTADOS DE VARIANZA PARA DIFERENTES PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 250 g/L DE GLUCOSA.....	84

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. PORCENTAJE DE CONSUMO DE FUENTES DE ENERGÍA DESDE 2006 AL 2010. (ADAPTADO DE: BALANCE ENERGÉTICO 2012- DIRECCIÓN NACIONAL DE ENERGÍA- MIEM).....	7
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS RELEVANTES QUE DEBEN POSEER LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL (ADAPTADO DE DIEN ET AL., 2003).	29
TABLA 3. COMPOSICIÓN DE MEDIOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL ETANOL.....	39
TABLA 4. DESCRIPCIÓN DE CULTIVOS DE LEVADURAS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS DIFERENTES MATERIALES INDUSTRIALES.	45
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LEVADURAS EN MICROSCOPIO ÓPTICO (1000x).....	47
TABLA 6. RESULTADOS DE CRECIMIENTO EN MEDIO YPD CONTENIENDO 50 G/L DE ETANOL.	48
TABLA 7. CONCENTRACIONES DE ETANOL Y GLICEROL OBTENIDAS DE FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 G/L DE GLUCOSA.	51
TABLA 8. RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 G/L DE GLUCOSA.....	51
TABLA 9. RESULTADOS DEL ANÁLISIS A LA RESISTENCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL DE LAS CEPAS A Y <i>S. CEREVISIAE</i>	57
TABLA 10. CONCENTRACIONES DE ETANOL Y GLICEROL OBTENIDAS DE FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 250 G/L DE GLUCOSA.	61
TABLA 11. RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 250 G/L DE GLUCOSA.	61
TABLA 12. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DEL FACTOR YPS ENTRE A, B, C Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC).....	79
TABLA 13. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, B, C Y <i>S. CEREVISIAE</i> (SAC) PARA EL FACTOR YPS	79
TABLA 14. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONSUMO DE GLUCOSA ENTRE A, B, C, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC).	80
TABLA 15. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, B, C Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) PARA EL CONSUMO DE GLUCOSA.	80
TABLA 16. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DE LA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN ENTRE A, B, C Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) ..	81
TABLA 17. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, B, C Y Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) PARA LA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN.	81
TABLA 18. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA ENTRE A, B, C Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC). 82	
TABLA 19. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, B, C Y Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) PARA LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA.	82
TABLA 20. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO ENTRE A, B, C Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC).	83
TABLA 21. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, B, C Y Y <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) PARA LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO.	83
TABLA 22. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DEL FACTOR YPS ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT.....	84
TABLA 23. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, <i>S. CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT PARA EL FACTOR YPS.....	84
TABLA 24. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DEL CONSUMO DE GLUCOSA ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT.....	85
TABLA 25. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT PARA EL CONSUMO DE GLUCOSA.....	85
TABLA 26. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DE LA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN ENTRE A, <i>S. CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT ..	86
TABLA 27. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT PARA LA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN.	86
TABLA 28. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT. 87	
TABLA 29. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA	87
TABLA 30. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VARIANZA DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT.	88
TABLA 31. TUKEY'S ALL PAIR COMPARISON ENTRE A, <i>S.CEREVISIAE</i> (SAC) Y CAT DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO.	88

FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO CON LOS PRINCIPALES PASOS Y MATERIALES DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ETANOL (ADAPTADO DE MUSSATTO ET AL., 2010).	5
FIGURA 2. PORCENTAJE DE ENERGÍA IMPORTADA Y DE ORIGEN LOCAL DESDE 1990 A 2010. FUENTE: BALANCE ENERGÉTICO 2011, DIRECCIÓN NACIONAL DE ENERGÍA- MIEM.	6
FIGURA 3. CONSUMO ENERGÉTICO POR FUENTE EN EL AÑO 2011 (FUENTE BALANCE ENERGÉTICO DIRECCIÓN NACIONAL DE ENERGÍA- MIEM).	8
FIGURA 4. CULTIVOS DE SORGO DULCE. FUENTE: WWW. SWEETFUEL-PROJECT.EU).	11
FIGURA 5. CORTE TRANSVERSAL DE TALLO DE SORGO DULCE (FUENTE: SWEETETHANOL).	12
FIGURA 6. ESQUEMA DE PROCESO DE OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE. ADAPTADO DE DIAS ET AL., 2012.	15
FIGURA 7. ESQUEMA DE SISTEMA DE TRAPICHES PARA LA EXTRACCIÓN DE JUGO RICO EN AZÚCARES FERMENTABLES DEL SORGO DULCE (ADAPTADO DE GONZÁLEZ ET AL., 2010).	18
FIGURA 8. VÍA METABÓLICA DE OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE GLUCOSA (MODIFICADA DE GLAZER Y NIKAIIDO, 2007).	28
FIGURA 9. PLANTA DE PRODUCCIÓN DE COMBUSTIBLE A PARTIR DE SORGO DULCE ALUR, BELLA UNIÓN, ARTIGAS.	34
FIGURA 10. FOTOGRAFÍAS DE LAS PLACAS DE CULTIVOS DE LEVADURAS AISLADOS DE: A Y B JUGO MIXTO DE SALIDA DE MOLINOS, C Y D MEZCLA DE JUGOS DE MOLINOS, E FIBRA DE SORGO, F TALLO DE SORGO, G Y H JUGO DE SALIDA DE PRIMER MOLINO.	45
FIGURA 11. FOTOGRAFÍA DE LO OBSERVADO EN UN MICROSCOPIO ÓPTICO (1000x) DE LAS MUESTRAS DE A Y B. JUGO MIXTO DE SALIDA DE MOLINOS, C Y D MEZCLA DE JUGOS DE MOLINOS, E FIBRA DE SORGO, F TALLO DE SORGO, G Y H JUGO DE SALIDA DE PRIMER MOLINO.	46
FIGURA 12. PERFILES DE GLUCOSA (LLENO) Y ETANOL (VACÍO) DURANTE LA FERMENTACIÓN EN UN MEDIO CON 150 G/L DE GLUCOSA PARA LAS CEPAS A (CUADRADO), B (ROMBO), C (TRIÁNGULO) Y <i>S. CEREVISIAE</i> (CÍRCULO).	50
FIGURA 13. PERFIL DE GLICEROL DURANTE LA FERMENTACIÓN EN UN MEDIO CON 150 G/L DE GLUCOSA PARA LAS CEPAS A (CUADRADO), B (ROMBO), C (TRIÁNGULO) Y <i>S. CEREVISIAE</i> (CÍRCULO).	50
FIGURA 14. PERFIL DE CRECIMIENTO DE CEPA A EN UN MEDIO CON GLUCOSA A CONCENTRACIONES DE 20 G/L.	54
FIGURA 15. PERFILES DE VIABILIDAD (A), CÉLULAS TOTALES (B), ETANOL (C) Y GLUCOSA (D) DE LAS LEVADURAS A (LLENO) Y S (VACÍO) EN MEDIOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE ETANOL DE; 100 G/L (CÍRCULO); 150 G/L (TRIÁNGULO); Y 200 G/L (CUADRADO).	57
FIGURA 16. PERFILES DE PÉRDIDA DE MASA (PÉRDIDA DE CO ₂) DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 250 G/L PARA LA CEPA A (ROMBO), LA CEPA INDUSTRIAL CAT (CUADRADO) Y LA CEPA <i>S. CEREVISIAE</i> (CÍRCULO).	59
FIGURA 17. PERFIL DE GLUCOSA (LLENO) Y ETANOL (VACÍO) DE LA CEPA INDUSTRIAL CAT (CUADRADO), LA CEPA COMERCIAL <i>S. CEREVISIAE</i> (CÍRCULO) Y LA CEPA A (ROMBO) PARA LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 250 G/L DE GLUCOSA.	60
FIGURA 18. PERFIL DE PRODUCCIÓN DE GLICEROL PARA LA CEPA A (ROMBO), <i>S. CEREVISIAE</i> (CÍRCULO) Y CAT (CUADRADO) EN FERMENTACIÓN CON 250 G/L DE GLUCOSA.	60

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIOCOMBUSTIBLES

En los últimos tiempos tanto el uso como los precios del petróleo, se han visto incrementados. Sumado a esto, la preocupación por la falta de fuentes del mismo en los próximos años así como por su impacto en el ambiente ha ido aumentando. Para poder hacer frente a dichos obstáculos y satisfacer las necesidades energéticas, ha sido necesario replantearse el manejo de recursos energéticos, empezando a existir cada vez un interés mayor en el uso de biocombustibles (Barbara, 2007).

El petróleo se produce a partir de plantas y animales descompuestos que han estado enterrados bajo tierra por millones de años, en otras palabras; es un combustible fósil no renovable. A diferencia de éste, los biocombustibles son combustibles obtenidos de forma renovable a partir de biomasa (materiales orgánicos) (Hernández y Hernández, 2008).

Los biocombustibles pueden ser sólidos (biomasa), líquidos (bioetanol, biodiesel) o gaseosos (biogás). Pueden clasificarse en biocombustibles de primera o segunda generación dependiendo del material del que fueron obtenidos así como de la tecnología utilizada para su procesamiento. Los de primera generación son provenientes principalmente de materias primas que también son destinadas a la alimentación, como el maíz, la soja, el sorgo, la caña de azúcar, etc. y son obtenidos por tecnologías de fermentación y transesterificación en el caso del bioetanol y el biodiesel respectivamente. El riesgo inherente asociado a esta clase de biocombustibles es su competencia con el uso de la materia prima como alimento. El aumento de la población mundial necesita ir acompañado de un aumento en la producción de granos, el cual no se está observando dado que un porcentaje de los mismos está siendo utilizado como materia prima para la producción de biocombustibles. Asimismo, los cultivos utilizados para la producción de biocombustibles están utilizando recursos como ser la energía, agua y tierra, que podrían ser utilizadas para cultivos con fines alimenticios (FAO, 2008).

Por otro lado, los biocombustibles de segunda generación son obtenidos de biomasa lignocelulósica (como switchgrass), así como de semillas oleaginosas no comestibles (como la jatrofa). La materia prima utilizada en este caso no necesita crecer en suelos ricos en nutrientes y por lo tanto no compiten por un lugar con los cultivos destinados a la alimentación. Esto permite que todo el cultivo sea destinado a la producción de biocombustibles y por lo tanto la producción de biomasa por hectárea sea mayor. Por lo anteriormente mencionado es que la investigación y utilización de biocombustibles de segunda generación se ve cada vez más en boga. Sin embargo, se debe tener en

cuenta que muchos de los cultivos utilizados para la producción de biocombustibles de segunda generación pueden ser invasivos y por tanto tener un impacto negativo sobre las fuentes de agua, la agricultura y la biodiversidad (FAO, 2008).

Por último, los biocombustibles buscan disminuir la producción de gases con efecto invernadero sobre la atmósfera. Dentro de estos gases se encuentran el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4), el óxido nitroso (N_2O), el monóxido de carbono (CO), el óxido nítrico (NO) y otros halocarburos.

Dentro de los contaminantes mencionados, el CO_2 es uno de más relevantes. Su producción puede verse disminuida por la absorción del mismo por las plantas, sin embargo no llega a ser cancelada por completo debido a que la cantidad de CO_2 absorbida por las plantas no es suficiente para consumir la cantidad del mismo producida durante el proceso de obtención de los biocombustibles y durante su uso como fuentes de energía.

Por otro lado, otro de los gases con efecto invernadero, el óxido nitroso está presente en los fertilizantes utilizados sobre los cultivos y es liberado a la atmósfera, y el monóxido de carbono es producido durante el uso de los biocombustibles en medio de transporte.

Todos estos gases pueden ser dañinos tanto para el ambiente como para el ser humano. Sin embargo, comparados con los combustibles fósiles, los biocombustibles producen cantidades menores de la mayoría de los contaminantes (a excepción del NO), lo que los hace de gran interés (Elbehri et al., 2013).

1.2 BIOETANOL

El bioetanol puede ser obtenido por la fermentación de azúcares simples o polisacáridos, como la celulosa y el almidón, que pueden ser convertidos en azúcares simples. Las fuentes de carbohidratos pueden ser clasificadas en tres grupos (Mussatto et al., 2010):

- 1- Materiales con azúcares simples (glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa): caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, suero de leche y melazas.
- 2- Materiales amiláceos; maíz, trigo y tubérculos como el boniato y la mandioca.
- 3- Biomásas lignocelulósicas: materiales leñosos, pajas, residuos agrícolas, de cultivos y de pastos (switchgrass).

Dada la diversidad de materias primas existentes para la producción de bioetanol, existen varias variables a considerar al momento de elegir la más adecuada. Entre ellas se encuentran (BNDES, CGEE, FAO y CEPAL, 2008)

- El costo de la materia prima, que generalmente representa entre el 70 % y 80% del costo del bioetanol.
- Uso de tierra, agua y de agroquímicos que debe otorgarse a los cultivos.
- El que no posean otros usos primordiales, como por ejemplo alimenticios.
- La existencia de co-productos y sub-productos que puedan tener valor industrial o energético para maximizar la viabilidad económica.
- El balance energético: relación entre la energía renovable producida y la energía consumida no renovable para la producción del biocombustible.
- El nivel de emisiones de gases de efecto invernadero.
-

Los azúcares presentes inicialmente en cada una de las materias primas son diferentes. La caña de azúcar y la remolacha azucarera contienen principalmente sacarosa que puede ser convertida a sus componentes monoméricos, glucosa y fructosa para ser fermentados. Los materiales amiláceos, como el maíz y el trigo, contienen almidón que puede ser hidrolizado a glucosa mediante el uso de las enzimas alfa amilasa y amiloglucosidasa, para ser luego fermentado. Los materiales lignocelulósicos contienen altas concentraciones de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, lo que los hace un sustrato interesante para la obtención de bioetanol. Sin embargo, para obtener azúcares fermentables a partir de ellos es necesario realizar tratamientos mecánicos y enzimáticos, lo que lo convierte en un proceso más dificultoso (Mussatto et al., 2010)

A grandes rasgos, la producción de bioetanol se realiza generalmente en tres pasos (Mussatto et al., 2010):

- 1- Obtención de solución de azúcares fermentables
- 2- Fermentación de los azúcares a bioetanol

3- Separación y purificación del etanol

El paso previo a la fermentación, en el cual se obtienen los azúcares fermentables, es lo que diferencia el proceso de obtención de etanol de las diferentes fuentes, azúcares simples, almidón y lignocelulosa (Figura 1).

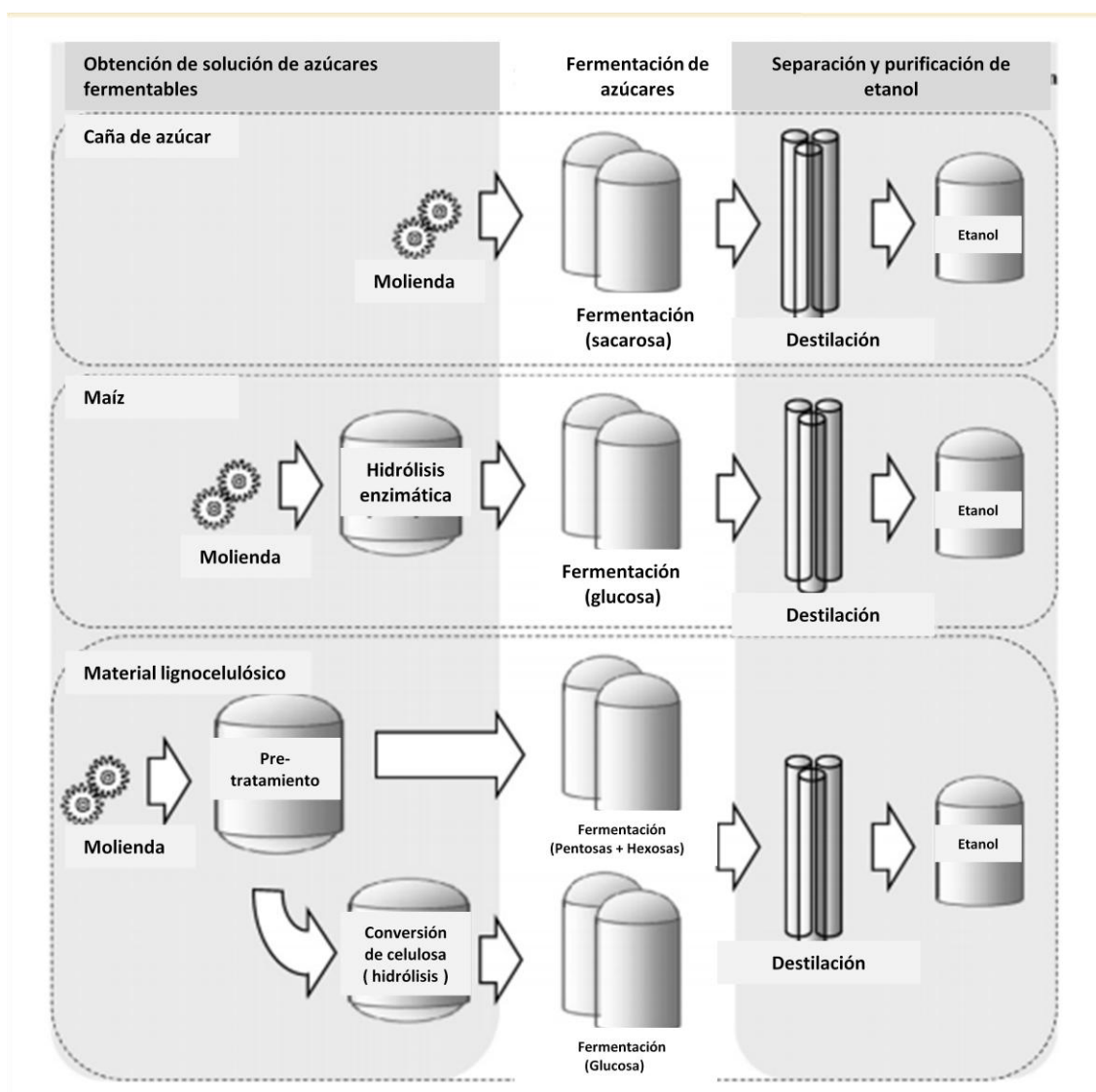


Figura 1. Diagrama de flujo con los principales pasos y materiales del proceso de obtención de etanol (Adaptado de Mussatto et al., 2010).

Alrededor del 95% del bioetanol producido mundialmente es obtenido a partir de cultivos agrícolas. El 40 % es producido a partir de caña de azúcar y caña de remolacha, mientras que el 60 % restante lo hace a partir cultivos amiláceos (Biofuels Platform, 2010). Estados Unidos y Brasil son los principales productores del mismo, utilizando como materias primas el maíz y la caña de azúcar respectivamente (Mussatto et al., 2010).

El bioetanol posee tres aplicaciones principales; como solvente y materia prima para otros productos de la industria; como ingrediente para la elaboración de bebidas; y como aditivo o sustituto de la gasolina (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2008).

A pesar de que la energía producida por el bioetanol sea del 68 % de la producida por su cantidad equivalente en petróleo, su combustión es más limpia (posee mayores concentraciones de oxígeno). Como consecuencia de esto último, la emisión de sustancias tóxicas por su combustión es menor que la del petróleo, la emisión de CO₂ se ve disminuida en un 80 % y la liberación de óxido de disulfuro causante de la lluvia ácida, eliminada (Krylova et al., 2008).

Actualmente el bioetanol es el principal biocombustible utilizado en el mundo y su uso se está expandiendo. Se proyecta que habrá una expansión aún mayor de su producción y consumo en los próximos años (Bastos, 2007).

1.3 BIOETANOL EN URUGUAY

En Uruguay la matriz energética posee una alta dependencia de fuentes importadas (Figura 2), constituidas fundamentalmente por el petróleo y sus derivados. En los últimos años entre el 40-50 % de la energía utilizada corresponde a combustibles fósiles, principalmente el petróleo, seguida por la electricidad, residuos de biomasa, leña y carbón y el gas natural (Tabla 1 y Figura 3).

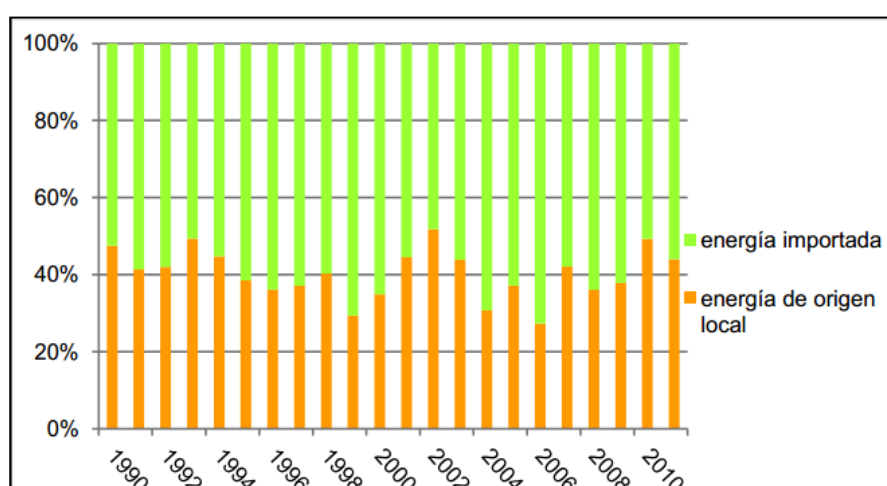


Figura 2. Porcentaje de energía importada y de origen local desde 1990 a 2010. Fuente: Balance Energético 2011, Dirección Nacional de Energía- MIEM.

Tabla 1. Porcentaje de consumo de fuentes de energía desde 2006 al 2010. (Adaptado de: Balance energético 2012- Dirección Nacional de Energía- MIEM).

Fuente de energía	2006	2007	2008	2009	2010
Petróleo y derivados	51%	51%	45%	46%	44%
Electricidad	26%	26%	24%	23%	22%
Gas natural	3%	3%	2%	1%	1%
Leña y carbón	18%	17%	14%	16%	14%
Residuos de biomasa	2%	3%	15%	14%	19%

Con el fin de disminuir progresivamente el consumo de petróleo, diversificar la matriz energética, colaborar con la disminución de la emisión de gases con efecto invernadero, utilizar materia prima nacional, impulsar el desarrollo de las cadenas agroindustriales e impulsar el desarrollo de regiones deprimidas del país es que se crea en el 2006 Alcoholes del Uruguay S.A (ALUR), empresa dependiente en un 90 % de ANCAP y el restante 10% a PDSVA (Venezuela). La misma es encargada de la producción de biodiesel (planta en Montevideo), bioetanol (en planta en Bella Unión y futura planta de Paysandú) y alcoholes potables (en planta en Paysandú).

Con el mismo objetivo es que en el año 2007 se creó la Ley. 18.195, en la cual se impone que ANCAP debe incorporar hasta un 5 % de etanol producido en el país con materias primas nacionales a las gasolinas de uso automotivo, entre 2008 y 2014, constituyendo este un límite obligatorio de allí en adelante (ANCAP, 2007).

A partir de estos hechos comienza a figurar desde el año 2010 una nueva fuente de energía secundaria en la matriz energética del país, los biocombustibles (Figura 3).

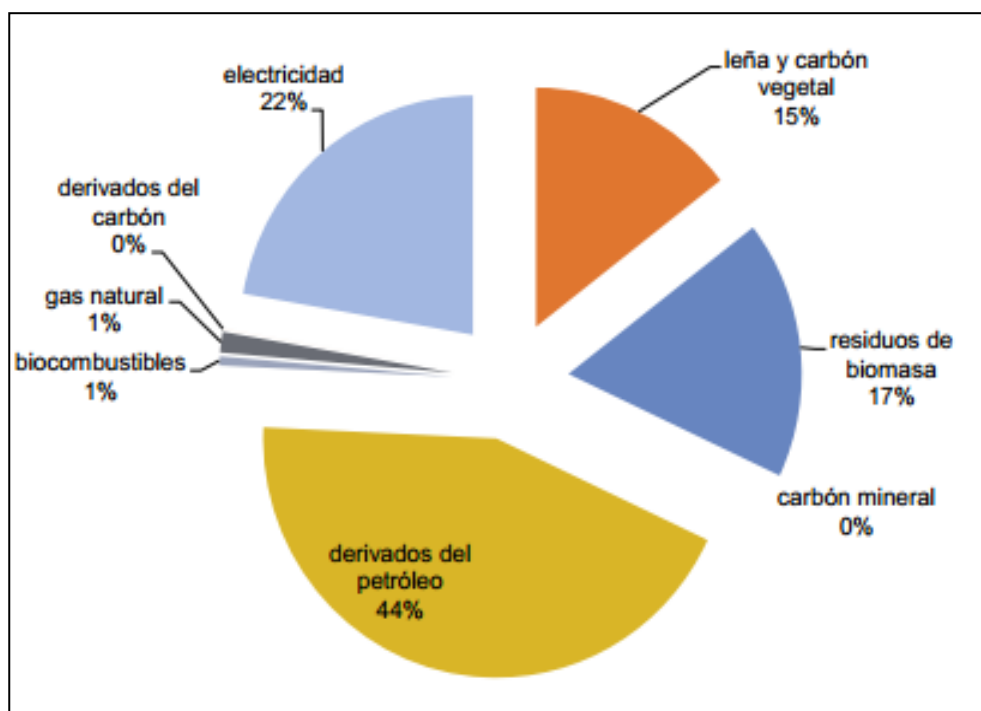


Figura 3. Consumo energético por fuente en el año 2011 (Fuente Balance Energético Dirección Nacional de Energía- MIEM).

La producción de bioetanol en Uruguay se realiza actualmente a partir de cultivos de caña de azúcar y sorgo dulce (en menor proporción) cultivados en la zona de Bella Unión, Artigas. En los inicios de ALUR existían 2.400 hás de caña de azúcar destinadas para la producción de bioetanol. Actualmente se están por alcanzar las 11.500 hás de caña de azúcar y las 3.000 hás de sorgo dulce (Agroindustria ALUR Bella Unión, disponible online) y se estima que para el 2015 la producción de biocombustibles represente un 63 % de lo producido por las plantas, lo que permitirá sustituir entre el 12 y 13 % de los combustibles fósiles (disponible en <http://www.alur.com.uy/articulos/2013/p-11-3-13.html>).

1.4 SORGO DULCE

La denominación sorgo es aplicada a un amplio rango de genotipos pertenecientes a la familia de gramíneas (Poaceae) de la especie *Sorghum bicolor* (L) Moench. Dentro de ésta se encuentran cinco variedades (Pin et al., 2011):

- Sorgo grano, variedad enana, de 50 a 80 cm de altura que es generalmente utilizado para grano. El sorgo grano es el cuarto cereal más importante a nivel mundial a después del trigo, arroz y maíz.
- Sorgo forrajero, posee alto contenido de fibra y proteínas por lo que es principalmente utilizado como alimento de ganado.
- Sorgo fibra, variedad con tallos altos, finos y ricos en celulosa y hemicelulosa.
- Sorgo escobero, es una variedad que presenta inflorescencias con ramas largas y elásticas, utilizado principalmente para la producción de escobas.
- Sorgo dulce, variedad de tallo largo, grueso, con alto contenido de azúcares, lo que lo hace apto para la producción de bioetanol.

Generalidades

El sorgo dulce es un cultivo que puede desarrollarse en un amplio rango de suelos y climas (tropicales, subtropicales y templados) y que hace un uso eficiente de agua, dióxido de carbono, nutrientes y energía solar (Kundiyana, 1996; Serna-Saldívar, 2010). Es considerado un cultivo resistente a las sequías, lo que lo habilita a crecer en regiones semi-desérticas de Africa y Asia. Esta resistencia está dada principalmente por su metabolismo fotosintético tipo C4 que se caracteriza por permitirle acumular CO₂ durante la noche para disminuir la tasa de fotorespiración en la presencia de luz y así reducir la pérdida de agua y el desperdicio de carbono (Keeley y Rundel, 2003). A pesar de su gran adaptabilidad, la mayoría de las variedades necesitan de altas temperaturas para obtener su mejor crecimiento (Reisi y Almodares, 2008).

El período de crecimiento del sorgo dulce puede ir de 3 a 5 meses, siendo el mismo inferior al de la caña de azúcar, cuyo período va de 10 a 12 meses (Serna-Saldivar et al., 2012). Asimismo, la cantidad de agua requerida para su crecimiento es la tercera parte de la que necesita la caña de azúcar. En climas tropicales con correcta irrigación, el sorgo dulce puede ser cosechado de dos a tres veces al año, lo que incrementa su rentabilidad (Almodares y Hadi, 2009).

El sorgo dulce puede crecer en suelos con pH entre 5 y 8.5 (Smith y Frederiksen, 2000), que posean cierto grado de salinidad y alcalinidad (Almodares et al., 2008b).

La semilla debe ser sembrada en una profundidad del suelo tal que le permita obtener la humedad suficiente para germinar y para que sus raíces crezcan correctamente. Le época de siembra debe iniciarse cuando hay una temperatura del entorno de los 12 °C (Almodares et al., 2008b). Una siembra tardía puede reducir el período de crecimiento, lo que afecta tanto la cantidad como el rendimiento de carbohidratos obtenido (Almodares et al., 1994). Sumado a lo anterior, la siembra tardía puede provocar una cosecha tardía, que hace que el cultivo se exponga a pestes y enfermedades que son dominantes al final de su ciclo (Almodares et al., 2008b).

Una fertilización balanceada puede aumentar el rendimiento del cultivo (Rego et al., 2003). Un uso adecuado de fertilizantes a base de nitrógeno promueve la tasa de crecimiento y el contenido de sacarosa del sorgo dulce (Tsialtas y Maslaris, 2005). Adicionalmente, la aplicación simultánea de fertilizante conteniendo potasio promueve aún más el aumento del rendimiento del cultivo (Pholsen y Sornsungnoen, 2004; Almodares y Mostafafi, 2006; Almodares et al., 2006; Almodares et al., 2008a; Fazaeli et al., 2006).

Los rendimientos agrícolas reportados para el sorgo dulce varían de 54 a 69 t/ha para el material fresco, 16 a 18 t/ha en base a biomasa seca (Almodares y Hadi, 2009; Bennett et al., 2009). El rendimiento de azúcar puede ir desde 6 a 8 toneladas por hectárea y el porcentaje de azúcares fermentables varía según la especie, oscilando en el rango de 12 a 21 % y (Almodares y Hadi, 2009). Se estima que el azúcar obtenida del sorgo dulce puede llegar a rendir 8000 litros de etanol por hectárea (Hunter y Anderson, 1997), esto es, el doble del rendimiento del grano de maíz y 30 % más que el promedio de producción de la caña de azúcar brasilera (6000 L/ha) (Luhnow y Samor, 2006).

Por último, otra ventaja que presenta el sorgo es que la totalidad de la planta tiene valor económico; el grano puede ser utilizado como alimento tanto para humanos como para animales; las hojas pueden destinarse a forraje; el tallo para la producción de combustibles; y la fibra (bagazo obtenido luego de la extracción de azúcar del tallo) como alimento para animales o para la generación de combustibles de segunda generación (Almodares et al., 2008b; Guigou et al., 2011).

Morfología

La estructura general del sorgo dulce consta de un tallo, hojas, flor y grano (Figura 4).



Figura 4. Cultivos de sorgo dulce. Fuente: [www. sweetfuel-project.eu](http://www.sweetfuel-project.eu)).

El sorgo dulce normalmente desarrolla entre 7 y 24 hojas, que se disponen dísticamente a lo largo del tallo. Su tamaño oscila de entre 30 cm a 135 cm de longitud y 1.5 cm a 13 cm de ancho (Pin et al., 2011). Poseen bordes dentados y una superficie lisa cubierta de una sustancia cerosa que actúa como barrera para la evaporación. En condiciones secas la hoja se enrolla, lo que reduce el área expuesta y por lo tanto la pérdida de humedad. Las hojas poseen un alto contenido de proteína que permite que sean utilizadas como forraje para los animales (Serna- Saldivar et al., 2012).

Las flores del sorgo dulce se encuentran agrupadas en panojas apicales formadas por varias espigas rojizas. Una vez que crece la panoja, la misma comienza a florecer inmediatamente. Luego de florecido y polinizado el sorgo dulce entra en la etapa de desarrollo del grano. Una vez madurado, el mismo representa un 5.6 a 19.6 % de la biomasa total (Guiying et al., 2004).

El grano del sorgo es rico en lípidos, proteínas y carbohidratos no estructurales, principalmente el almidón. Este almidón podría pasar por un proceso de pre-tratamiento e hidrólisis enzimática para convertirse en azúcares simples que puedan luego ser fermentados. Sin embargo la interacción entre las proteínas y el almidón, entre otros factores, hacen que el acceso de las enzimas se vea restringido, lo que afecta la obtención de azúcares fermentables y por lo tanto disminuye el rendimiento de la fermentación (Serna - Saldívar et al., 2012).

El tallo es la región de mayor importancia del sorgo dulce para la producción de bioetanol. Es robusto, similar al de la caña de azúcar, con un diámetro en su base que va desde los 1.5 cm a 5 cm y con una altura que oscila entre los 0.5 m a 5 m. Si se realiza un corte transversal del mismo (Figura 5), se observa una corona externa, denominado fibra, con numerosos haces vasculares densamente dispuestos. Dentro de esta corona se encuentra una médula blanda rodeada de tejido parenquimático. La mayor parte del azúcar del tallo se encuentra en la médula (Pin et al., 2011).

La corona externa está cubierta por un polvo blanco de consistencia cerosa que sirve de protección en condiciones climáticas adversas. En épocas de sequía evita la evaporación del agua del tallo, mientras que cuando el tallo se encuentra anegado impide que más agua ingrese al mismo (Guiying et al., 2004).



Figura 5. Corte transversal de tallo de sorgo dulce (Fuente: Sweetethanol).

El tallo madurado posee una humedad de un 73 % y presenta sólidos que se clasifican en carbohidratos estructurales y no estructurales.

Los carbohidratos no estructurales son la principal fuente de azúcares fermentables y representan aproximadamente entre el 12 % y el 21 % de los sólidos en el tallo del sorgo. Los mismos están constituidos por los azúcares simples sacarosa, glucosa y fructosa, que se presentan en cantidades variables según el cultivo, la época de cosecha, el estado de maduración y otros factores (Mamma et al., 1996; Phowchinda et al., 1997). En la mayoría de las variedades, la sacarosa es el azúcar dominante, y la proporción restante son partes iguales de glucosa y fructosa.

En términos generales, la proporción de azúcares simples en el jugo obtenido del sorgo dulce va de 53-85 % para la sacarosa y de 6-21 % para la fructosa y la glucosa (Gnansounou et al., 2005; Mamma et al., 1996; Phowchinda et al., 1997; Prasad et al., 2007).

Los carbohidratos estructurales presentes en el tallo son la celulosa, hemicelulosa y lignina, que se presentan en proporciones, generalmente, de 34 a 44%, 25 a 27% y 18 a 20% respectivamente (Ballesteros et al., 2003; Kim y Day, 2011; Sipos et al., 2009). Estos carbohidratos pueden pasar por un proceso de hidrólisis que les permitirá ser utilizados para la producción de etanol (Sipos et al., 2009).

Desarrollo biológico

El sorgo dulce posee etapas de desarrollo y crecimiento bien diferenciadas, que pueden clasificarse en cuatro fases (Guiying et al., 2004):

- 1- Siembra: es la etapa desde la germinación hasta el nacimiento de los nodos. Durante la germinación es necesario mantener una adecuada humedad, oxigenación y temperatura para obtener buenos resultados. El tiempo que tarda la emergencia de la planta depende de la época del año; en setiembre demora entre 7 y 10 días, mientras que en verano puede ocurrir luego de 2 o 3 días del sembrado. Luego de la aparición de 3 a 5 hojas comienza a crecer el tallo, proceso que puede llegar a demorar alrededor de 30 días. En ocasiones, ocurre el crecimiento de más de un tallo, llegándose a alcanzar un número de siete en algunas variedades. El crecimiento de tallos en exceso puede causar efectos adversos sobre

el crecimiento de los mismos, por lo que a veces es recomendable recortar alguno de ellos para así obtener tallos más largos y anchos.

- 2- Crecimiento: Luego de 47 a 55 días de la emergencia de la planta, la misma entra en la etapa de crecimiento en la cual la superficie de las hojas se expande rápidamente y la planta se elonga. Esta etapa es fundamental para el desarrollo de la planta, por lo que un cuidado y manejo correcto del cultivo es vital ya que el mismo afectará el rendimiento del tallo y de la semilla. Durante esta fase también comienza la diferenciación de las semillas jóvenes presentes en las espigas.
- 3- Floración: Luego de la aparición de la última hoja comienza la emergencia de la panoja y pasados de 2 a 5 días comienza la floración. En esta etapa es que el cultivo tiene el mayor requerimiento de agua.
- 4- Maduración: Esta fase puede llegar a durar hasta 30 días y se divide en tres sub-etapas: lactal, cerosa y madura. En la primera, una parte de los nutrientes es almacenada en el tallo y otra es transferida al grano, lo que hace que este último aumente su masa seca y crezca a un ritmo rápido. En la etapa cerosa, la humedad del grano es reducida, así como su masa seca, lo que provoca que el mismo se endurezca. En la tercera y última sub-etapa, la acumulación de materia seca en el grano llega a su máximo y la semilla se seca y endurece por completo, mostrando el color y calidad particular según la variedad correspondiente.

Existe una relación entre el grado de madurez de la planta y la concentración de azúcares en el tallo. Esta última también depende de la variedad de sorgo dulce utilizada, de la fecha de siembra y las condiciones de cultivo (Pin et al., 2011).

La mayor acumulación de azúcares ocurre luego de la aparición de la panoja y especialmente después de la floración. Si el crecimiento del cultivo se lleva a cabo en lugares con temperaturas bajas, el desarrollo puede detenerse tempranamente y por lo tanto cesar la acumulación de azúcares, llegando a concentraciones menores de las mismas (Pin et al., 2011).

1.5 OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE

El proceso mediante el cual se obtiene bioetanol a partir de sorgo dulce consta de varios pasos que se resumen en la Figura 6.

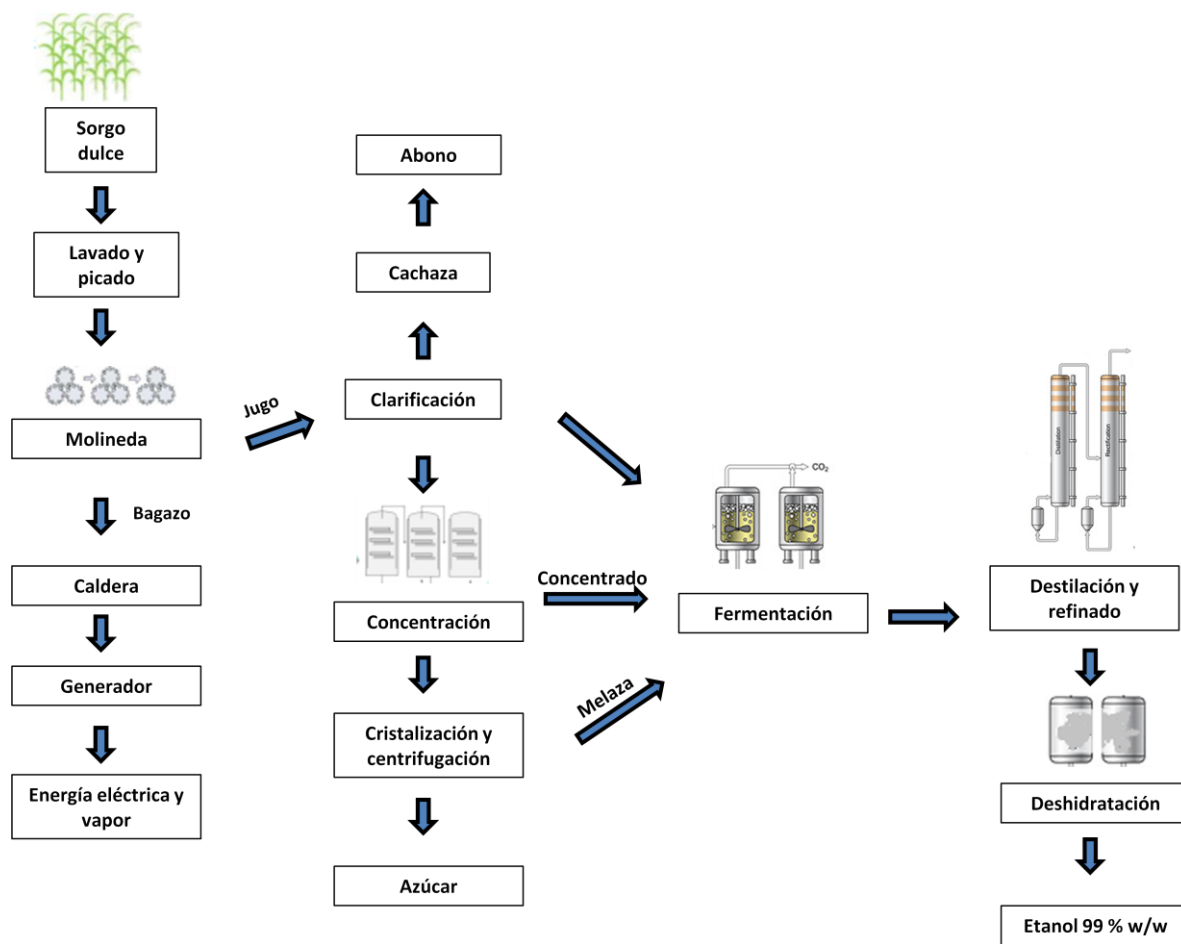


Figura 6. Esquema de proceso de obtención de etanol a partir de sorgo dulce. Adaptado de Dias et al., 2012.

Cosecha

La cosecha del sorgo dulce debe llevarse a cabo cuando la biomasa y el azúcar acumulado alcancen su concentración más elevada. El período de tiempo que le lleve alcanzar las mismas dependerá de la variedad utilizada y de las condiciones climáticas. Como los azúcares buscados para la producción del bioetanol se concentran en el tallo (o caña), la mejor manera de realizar la cosecha es cortando los mismos por la base (Pin et al., 2011).

El principal inconveniente en la cosecha es el alto riesgo de pérdida de azúcares fermentables si la misma no se lleva a cabo en el momento correcto y bajo condiciones climáticas favorables. Estudios han demostrado que si se demora la cosecha del sorgo dulce entre 3 y 4 semanas luego de

alcanzada la maduración, la concentración de sacarosa se ve disminuida en un 4-6 % con respecto a cultivos cosechados previos a alcanzar su estado de maduración fisiológica (Broadhead, 1969).

La pérdida de azúcares fermentables también puede ocurrir por la existencia de condiciones climáticas adversas. En climas más fríos, las heladas pueden llevar a una pérdida significativa de los azúcares fermentables (Cundiff y Parrish, 1983; Eiland et al., 1983; Eiland y Clayton, 1984; Parrish y Cundiff, 1985; Worley y Cundiff, 1992).

Tratamiento pos-cosecha

Se debe intentar que el período transcurrido entre la cosecha y el procesamiento de los tallos, (período pos- cosecha) del sorgo sea el menor posible, ya que de no serlo, existe el riesgo de perder una parte de los azúcares fermentables.

Una vez cortados los tallos, los mismos son muy sensibles a la contaminación dado su alto contenido de humedad en la biomasa (entre 70 y 80 %) y su gran concentración de azúcares fácilmente fermentables. De ocurrir la contaminación, puede ocasionar que parte del azúcar que sería destinado a la obtención de etanol, sea consumida por los microorganismos contaminantes, causando una disminución del rendimiento de la fermentación (Pin et al., 2011).

Una forma de evitar la pérdida de azúcares durante el almacenaje de la materia prima es el control de la temperatura. El almacenamiento a temperatura ambiente puede causar que los tallos lleguen a perder hasta el 20 % de sus azúcares fermentables en solo 3 días, mientras que si se los mantiene en ambientes refrigerados esta pérdida no ocurre (Wu et al., 2010).

Otro modo de conservar los azúcares fermentables, es extrayendo el jugo, concentrándolo y luego almacenarlo como tal para utilizarlo posteriormente en la fermentación (Bennett y Anex, 2009)

Lavado y extracción de azúcares fermentables

El proceso de obtención de bioetanol comienza con el lavado y picado de la caña del sorgo dulce. Para ello se desfibrila y corta la misma cuidando que no ocurra extracción del jugo prematuramente.

Luego, generalmente, los pequeños trozos obtenidos pasan luego a un sistema de trapiche formado por varios molinos de 1.7 m de ancho que ejercen presión sobre la caña y permiten la extracción de los azúcares fermentables presentes (Figura 7).

A pesar de que la caña se somete a presiones considerables y repetidas, ésta nunca cede la totalidad de sus jugos, quedando con una cantidad de los mismos y en general con una humedad en el entorno del 45 % y 50 %. Para poder lograr extraer la mayor cantidad del jugo remanente y mantener la humedad, la caña es sometida a un proceso de imbibición, donde el jugo es sustituido por agua. Para ello, en el cuarto molino se agrega agua bruta, es decir no tratada, a través de aspersores, para que retire los restos de los azúcares por difusión y humedezca el material para el último molino. El jugo recogido del último molino se dispersa sobre el molino anterior y así sucesivamente, enriqueciendo el agua de azúcares hasta el primer molino. Por tanto, el jugo del primer molino será el más concentrado (González et al., 2010).

Parte de los jugos obtenidos de los molinos, excepto el del primero, caen en una canaleta y se unen, formando un mixto de jugos. Asimismo este mixto se une posteriormente con el jugo del primer molino formando una mezcla de jugos.

Otra forma de extraer los azúcares fermentables de la caña del sorgo es a través de un proceso de difusión. El mismo consiste en colocar los trozos de caña en una cinta transportadora por la cual circula agua a 70 °C a contracorriente, de forma tal que los azúcares presentes en las células de la planta pasen al agua (Baquero, 1987).

.

Alrededor del 90 % de los azúcares fermentables presentes en el tallo del sorgo dulce pueden llegar a ser extraídos durante esta etapa, alcanzando una tasa de extracción de hasta 0.7 en relación al peso inicial de la planta (Almodares y Hadi, 2009). En esta etapa el jugo presenta una concentración de azúcar del entorno de los 15 ° Brix (Prasad et al., 2007).

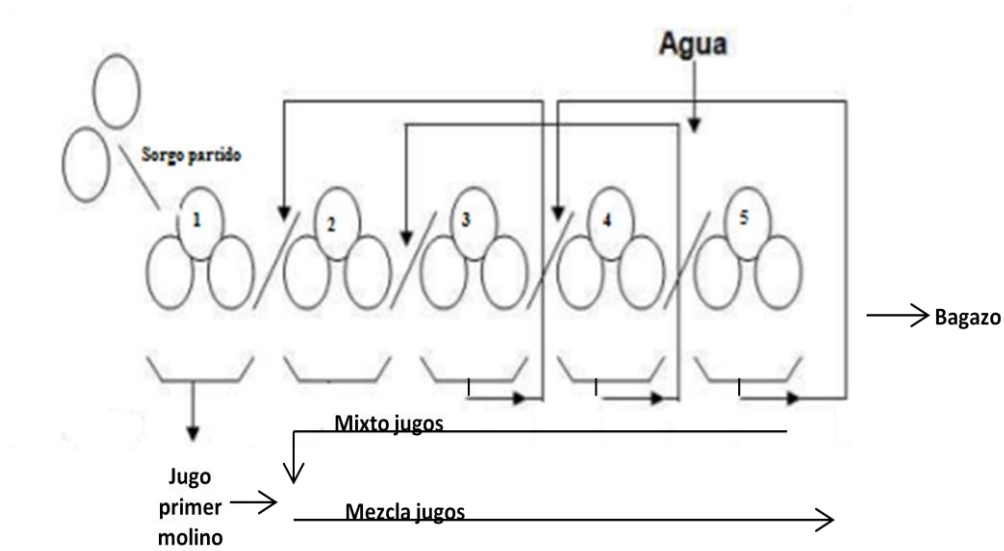


Figura 7. Esquema de sistema de trapiches para la extracción de jugo rico en azúcares fermentables del sorgo dulce (Adaptado de González et al., 2010).

Como producto secundario de la extracción de azúcares se obtiene un residuo lignocelulósico; el bagazo. Este posee al final del proceso un humedad del 50 %, otorgada por el jugo diluido que se encuentra en su interior (Pin et al., 2011).

El bagazo es enviado a las calderas para ser utilizado para la generación de vapor y energía eléctrica para el funcionamiento propio de la planta o en caso de exceso, se comercializa. Asimismo, el bagazo puede disponerse para la fabricación de papel, para raciones animales, como abono, o como materia prima para la producción de combustibles de segunda generación (Almodares y Hadi, 2009).

Clarificación

En el siguiente paso, el jugo atraviesa un clarificador para deshacerse de sólidos y otras partículas remanentes. El proceso básicamente consiste en adicionar a los jugos entrantes determinados compuestos, como cal, para que forme complejos de alto peso molecular con las impurezas, aumentar la temperatura y dejar decantar en forma mecánica. Los sólidos insolubles quedan separados por sedimentación y son enviados a un área de filtración para recuperar la aquellos azúcares que hayan quedado unidos a ellos. Una vez finalizado el proceso se obtiene jugo clarificado

y sólidos. A éstos últimos se les denomina cachaza y pueden ser posteriormente utilizados como abono orgánico (Instituto Azucarero Dominicano).

Concentración

El jugo clarificado, puede pasar directo a la etapa de fermentación o puede ser previamente sometido a un proceso de evaporación con el fin de concentrar el mismo. La energía necesaria para esta fase es obtenida del generador alimentado con el bagazo proveniente de la primera etapa del proceso. El vapor condensado formado puede ser utilizado como fuente de calor para otras unidades de la planta, o como fuente de agua (Gnansounou et al., 2005).

Este proceso permite preservar los azúcares y poseer materia prima para suplir a la planta en los meses posteriores a la cosecha del sorgo dulce. Asimismo, provoca un aumento de la presión osmótica en el jugo que ayuda a evitar el crecimiento de bacterias y levaduras en el mismo. La concentración final de azúcar obtenido puede ir de 16 a 85 °Brix dependiendo del período de tiempo que vaya a estar almacenado.

El jugo concentrado puede ser destinado directo a la fermentación o pasar por dos pasos adicionales para la obtención de azúcar; la cristalización y la centrifugación. La cristalización se da a partir de la colocación del jugo concentrado en tanques al vacío a temperaturas y presiones reducidas. De allí se obtiene una mezcla de cristales de sacarosa y un licor, que son separados en centrífugas, donde el azúcar es lavado con agua caliente. El azúcar es luego secado y almacenado, mientras que el licor pasa por una etapa adicional de calentamiento para extraer los azúcares remanentes, principalmente glucosa y fructosa. El jugo obtenido es aproximadamente 50 % azúcar y es conocido como melaza y puede ser destinado también a la fermentación (Gnansounou et al., 2005).

Vale la pena destacar que el jugo del sorgo dulce no es comúnmente utilizado para la obtención de azúcar cristalizada (sacarosa) por la presencia de altas cantidades de azúcares invertidos, la glucosa y fructosa, que dificultan el proceso de cristalización (Turhollow et al., 2010; Woods, 2000).

Fermentación

EL proceso de fermentación es realizado por levaduras, en la mayoría de los casos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El mismo consiste básicamente, en la conversión de azúcares en etanol, dióxido de carbono, biomasa de levaduras y pequeñas cantidades de subproductos como glicerol, aceites, aldehídos y cetonas (Jacques et al., 1999).

Las levaduras utilizadas pueden conservarse liofilizadas, congeladas, en medios sólidos o en medios líquidos. Para poder utilizarlas para la fermentación es necesario estabilizarlas y lograr una concentración suficiente de levaduras para llevar a cabo el proceso. Para ello se las hace crecer en un medio con condiciones favorables para su crecimiento. Esto implica que sean soluciones que contengan fuentes de carbohidratos (como glucosa, fructosa o sacarosa), fuentes de vitaminas, aminoácidos, nitrógeno y co-factores (como el extracto de malta y la peptona), suplementadas con algún bactericida (para evitar la contaminación) y con oxígeno (Hernández et al., 2003). Su pH debe ser ajustado en el entorno de los 4.5 y debe mantenerse la temperatura entre 30 °C y 35 °C (Pin et al., 2011).

Una vez obtenido la concentración buscada de levaduras se inocula el jugo concentrado con la solución de las mismas.

Antes de comenzar con el proceso fermentativo, el jugo concentrado debe ser pasteurizado con el fin de evitar el desarrollo de algún tipo de bacteria que pueda haber contaminado a éste. Asimismo está demostrado que la adición en concentraciones adecuadas de elementos traza como zinc, magnesio y manganeso mejoran el rendimiento de la fermentación (Deesuth et al., 2012).

La fermentación puede realizarse en batch o de forma continua. En la primera, las reacciones de fermentación son llevadas a cabo en un sistema cerrado, es decir, se coloca inicialmente el medio en el fermentador y se lo inocula con la concentración de microorganismos adecuada, y el medio no se vuelve a alterar. La composición del medio, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos se modifican generalmente como resultado del metabolismo de las células. El proceso finaliza cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa. El rendimiento de este tipo de fermentación depende mucho de la tolerancia de los microorganismos al alcohol (Pin et al., 2011; Biorreactores, disponible online).

A diferencia de la fermentación en batch, en la fermentación continua se establece un sistema abierto: se está constantemente adicionando medio estéril en el reactor y simultáneamente

quitando medio utilizado. La ventaja de este método frente al batch es que la inhibición de las levaduras por altas concentraciones de etanol es menor, lo que permite tener un mayor rendimiento (Pin et al., 2011; Biorreactores, disponible online).

Actualmente, cada vez más industrias están realizando lo que se denomina fermentación a altas concentraciones de azúcar, VHG (del inglés Very High Gravity). El detalle de este proceso será descrito en una sección posterior.

Las levaduras utilizadas en la fermentación pueden ser recuperadas mediante centrifugación y posteriormente lavadas con ácido sulfúrico (para evitar la contaminación bacteriana) para un nuevo uso. Si las levaduras recuperadas son viables, son reutilizadas en posteriores fermentaciones, de lo contrario se emplean como fuente de proteínas para la preparación de ración para animales.

Teóricamente el jugo de sorgo dulce posee un rendimiento de etanol del 85 %, o dicho de otra forma, rinde 54.4 L de etanol por cada 100 kg de tallo fresco (Almodares y Hadi, 2009). El mismo puede verse incrementado si se logran condiciones más favorables para el proceso, como ser adición de cantidades adecuadas de elementos traza, suplementos nutricionales, la temperatura, etc.

Destilación y rectificación

La concentración de etanol en el medio luego de la fermentación se encuentra entre un 9 -14 % v/v. Para alcanzar concentraciones finales de alrededor de 95 % v/v es necesario realizar una destilación. El proceso consiste en pasar el medio fermentado por una serie de columnas de destilación y rectificación en las que el agua y el etanol son separadas. La separación ocurre por las diferencias en los puntos de ebullición de ambos líquidos, siendo el etanol más volátil que el agua (Pin et al., 2011).

Deshidratación

Para producir ETBE (Etil Ter-Butil Eter) y etanol apto para mezclar directamente con gasolina, es necesario poseer como materia prima etanol anhidro con concentraciones entre 99.7-99.8 w/w (Pin et al., 2011).

Para obtener el mismo, se pasa la solución de etanol de 95 % v/v por tamices moleculares que retienen las moléculas de agua, aumentando de esta forma gradualmente la concentración de etanol en la solución (Kwiatkowski et al., 2006).

El etanol anhidro debe ser almacenado en tanques con atmósferas controladas, es decir libres de aire y generalmente con nitrógeno u dióxido de carbono, para evitar la solubilización del vapor de agua (Pin et al., 2011).

1.6 FERMENTACIONES VHГ

El etanol puede ser producido a través de procesos fermentativos de bacterias y levaduras. Estos microorganismos convierten los azúcares u otros carbohidratos a etanol, dióxido de carbono y otros compuestos secundarios bajo condiciones de anaerobiosis. La concentración de azúcar inicial en el medio se relaciona directamente con la cantidad de etanol producida, y concentraciones iniciales elevadas de la misma implicarían concentraciones finales de etanol altas.

Generalmente, en las fermentaciones las concentraciones iniciales de azúcares van de 150 g/L a 200 g/L. Se define como fermentaciones que parten de altas concentraciones iniciales de azúcares (VHG del inglés Very High Gravity) a aquellas que son capaces de fermentar por completo mezclas con concentraciones iniciales de entre 250 g/L a 300 g/L de azúcares. La utilización de estos procesos presentan numerosas ventajas que incluyen; aumentar las concentraciones finales de etanol, disminuir el requerimiento del agua y los costos energéticos y aumentar la productividad de la planta. El fin del mismo es hacer un proceso cada vez más rentable (Wang et al., 2007).

A pesar de las numerosas ventajas, las fermentaciones VHГ son raramente rápidas y completas a causa de cambios fisiológicos que le ocurren a los microorganismos durante la misma (Pereira et al., 2010). Las altas concentraciones de azúcares iniciales provocan un incremento de la presión osmótica del medio que tiene efectos perjudiciales sobre las células de levaduras. Asimismo, las

concentraciones elevadas de etanol que pueden lograrse en la fermentación podrían ser tóxicas para las células y ocasionar una fermentación lenta y trunca.

Una forma de mejorar el rendimiento de la levadura es suplementar el medio con macro y micronutrientes que permitirán que la misma posea todos los requerimientos nutricionales necesarios para desempeñar un correcto crecimiento, sobrellevar los estreses causados por las altas concentraciones de azúcares y etanol y por lo tanto mejorar el rendimiento de la fermentación (Breisha, 2010).

Los medios utilizados para la fermentación pueden ser tanto naturales como sintéticos. En ambos casos el principal nutriente necesario es el carbono, que actúa como fuente de energía y que puede obtenerse de varios compuestos orgánicos, entre ellos los azúcares, como la glucosa.

El nitrógeno, junto con el carbono, es otro de los nutrientes esenciales en un medio para fermentación. El mismo es necesario para el crecimiento de la levadura e influye tanto en su resistencia al etanol como en su rendimiento. Algunos autores han reportado que la falta de nitrógeno reduce la biomasa del medio, lo que puede derivar en una fermentación trunca, mientras que un exceso del mismo puede ocasionar una baja en la producción de la enzima fosfofructoquinasa, enzima reguladora de la glucólisis. Según Berthels et al. (2007) la adición de nitrógeno en forma de amonio puede contrarrestar el recambio de transportadores de alta afinidad por azúcares y a su vez activar la enzima fosfofructoquinasa. El nitrógeno también es proporcionado a través de las peptonas y extracto de levadura que se adicionan en el medio.

Se ha reportado que la cantidad de nitrógeno adicionada al medio debe ser proporcional a la concentración de azúcar inicial en el mismo, es decir, un aumento en la concentración inicial de azúcar debe ir seguido de un aumento en los niveles de nitrógeno. Asimismo, como cantidades elevadas de nitrógeno pueden llevar a efectos no deseados sobre la fermentación, la concentración a adicionar de este nutriente debe ser optimizada. Breisha (2010) reportó que la proporción de nitrógeno con la cual se obtienen los mejores resultados en una fermentación es de 5 mg de sulfato de amonio por gramo de azúcar inicial en el medio.

Los micronutrientes o elementos traza también influyen en la promoción del crecimiento de las levaduras, en su resistencia al etanol y por tanto, en el rendimiento de la fermentación. Ha sido demostrado que la adición de magnesio al medio VHG aumenta considerablemente la concentración final de etanol lograda (Pereira et al., 2010). El magnesio interacciona con fosfolípidos de la membrana plasmática disminuyendo su permeabilidad ante las condiciones de estrés generadas por el medio con alto contenido de etanol (Birch y Walker, 2000; Hu et al., 2003), lo que le mejora su

resistencia al etanol y permite obtener mejores resultados de la fermentación. El magnesio puede ser adicionado en forma de sulfato de magnesio (MgSO_4), en donde además de aportar el elemento mencionado se aporta azufre (S), el cual es asimilado para la síntesis de aminoácidos entre otras cosas.

La adición de potasio (K) al medio de fermentación también es importante. El mismo puede ser agregado formando un compuesto con fósforo, el fosfato ácido de potasio ($\text{K}(\text{HPO}_4)_2$), donde el fósforo (P) adicionado tiene un rol en la síntesis de ácidos nucleicos.

En cuanto a la función del potasio, las levaduras intercambian el mismo por hidrógeno con el fin de mantener un equilibrio iónico. A su vez se ha demostrado que el potasio acelera la tasa de consumo de glucosa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El aumento en el consumo de glucosa es coincidente con el de potasio agregado, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual logra dicho aumento. Únicamente el potasio adicionado de forma externa tiene este efecto, lo que sugiere que el blanco de activación de éste no es un factor citoplasmático, sino que está ubicado en la superficie celular (Masayoshi et al., 1998).

Se ha demostrado a su vez, que la deficiencia de potasio disminuye la viabilidad celular en etapas tardías de la fermentación, lo que sugiere que el potasio es requerido como un factor de supervivencia (Masayoshi et al., 1998).

Otros elementos que permiten mejorar los resultados de la fermentación son el zinc y el manganeso. El primero se ha encontrado que aumenta la tolerancia al etanol y por tanto su concentración final cuando se lo agrega al medio de fermentación, mientras que el segundo es importante para el metabolismo de algunas enzimas reguladoras del proceso fermentativo (Zhao et al., 2009; Stehlik-Tomas et al., 2004).

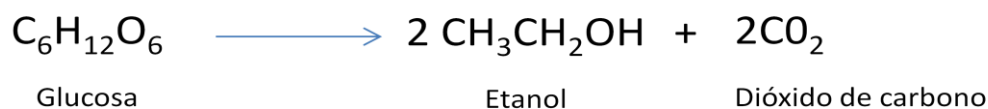
La oxigenación durante el proceso fermentativo es otro de los parámetros a controlar. Bajo condiciones de anaerobiosis, las levaduras generalmente necesitan la adición de pequeñas cantidades de oxígeno para sintetizar lípidos esenciales (esteroles y ácidos grasos insaturados) para la integridad de la membrana plasmática. Asimismo bajo estas condiciones, las levaduras acumulan fitoesteroles que pueden promover el crecimiento celular y la actividad fermentativa inicial ya que actúan como sustitutos del ergosterol en la membrana. Sin embargo, si no ocurre adición de oxígeno, estos esteroides perturban la composición de la membrana al convertirse en los esteroides predominantes, lo que puede llevar a una fermentación truncada (Luparia et al., 2004). Se ha demostrado que el oxígeno adicionado es consumido en las primeras horas de la fermentación, en

las cuales las hexosas son catabolizadas a ácido pirúvico mediante el proceso de glicólisis (o vía de Embdene-Meyerhofe-Parnas). Para la conversión de ácido pirúvico en etanol, es necesaria la ausencia total de oxígeno. Por tanto, la adición de oxígeno es solo necesaria durante las horas iniciales de la fermentación, en las cuales ocurre la formación de ácido pirúvico (Breisha, 2010).

Por último, otro factor a tener en cuenta al momento de la fermentación es la temperatura. Se ha reportado como influyente en la tasa de crecimiento de las levaduras, su viabilidad, el rendimiento de la fermentación, la actividad enzimática y el funcionamiento de la membrana (Sener et al., 2007). Olivério et al. (2010) reportaron que la temperatura óptima para llevar a cabo la fermentación es 30 °C.

1.7 BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN

Una variedad de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) pueden fermentar carbohidratos a etanol según la siguiente reacción:



El rendimiento teórico máximo de dicha reacción es de 0.511 kg de etanol y 0.489 kg de dióxido de carbono por kg de glucosa.

La ruta bioquímica por la cual se lleva a cabo la reacción se describe en la Figura 8. La misma comienza con la oxidación de glucosa a ácido pirúvico, proceso al cual se denomina glucólisis. Para ello, la glucosa es fosforilada a glucosa 6-fosfato (glucosa 6-P) por la enzima hexoquinasa, con el consumo de una molécula de adenosin trifosfato (ATP) y la formación de una molécula de adenosin difosfato (ADP). Posteriormente, la glucosa 6-P es isomerizada a fructosa 6-fosfato (fructosa 6-P) por la acción de la enzima glucosa 6-P isomerasa. La fructosa 6-P es luego fosforilada en su carbono uno

por la enzima fosfofructotquinasa 1, con el consumo de una molécula de ATP y la formación de una molécula de ADP convirtiéndose en fructosa 1,6 – bifosfato (fructosa 1,6 biP). Esta reacción es irreversible y es el punto de control de la glucólisis. Existen otros sustratos aparte de la glucosa que pueden ingresar en esta vía metabólica, por ello es que el punto de control se encuentra en este paso y no al comienzo. La fosfofructoquinasa posee centros alostéricos sensibles a las concentraciones de intermediarios que hacen que se presente en su forma activa o inactiva, y por lo tanto determina si la ruta metabólica continúe avanzando o no.

Continuando con la vía, la fructosa 1,6 biP es hidrolizada a dos moléculas de tres carbonos; la dihidroxiacetona fosfato (dihidroxiacetona-P) y el gliceraldehído-3-fosfato, por la enzima aldolasa. Puesto que solo el gliceraldehído-3-fosfato puede seguir los pasos siguientes de la glucólisis, la dihidroxiacetona-P debe ser isomerizada a gliceraldehído-3-fosfato. Esta reacción es llevada a cabo por la triosa fosfato isomerasa.

Paso siguiente, el gliceraldehído-3-fosfato es oxidado y fosforilado para convertirse en 1,3-bisfosfoglicerato. La reacción es realizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que utiliza como cofactor al de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) que actúa como aceptor de un hidrogenión (Nelson y Cox, 2001).

A continuación, la enzima fosfoglicerato quinasa transfiere el grupo fosfato de 1,3-bisfosfoglicerato a una molécula de ADP, formándose la molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de ATP. EL 3-fosfoglicerato es luego isomerado a 2-fosfoglicerato por la enzima fosfoglicerato mutasa. La enolasa proporciona posteriormente, un doble enlace al 2-fosfoglicerato, convirtiéndolo en fosfoenolpiruvato. El paso final de la glucólisis es la desfosforilación del fosfoenolpiruvato a piruvato, por la acción de la enzima piruvato quinasa. El fosfato del fosfoenolpiruvato es transferido a una molécula de ADP formando ATP.

La reacción global de la glucólisis es la siguiente:



Como puede observarse aparte de necesitarse un azúcar de seis carbonos para poder llevar a cabo el proceso, también es necesaria la presencia de compuestos como el nucleótido y la amida NAD^+ .

El ATP generado es utilizado en diferentes procesos de biosíntesis, regenerando el ADP, que puede ser reutilizado.

El NAD^+ también debe ser regenerado. Una forma de hacerlo es mediante la fermentación alcohólica. Bajo condiciones de anaerobiosis algunos microorganismos, entre ellos bacterias y levaduras, pueden transformar el piruvato a etanol y dióxido de carbono mediante un proceso de dos pasos denominado fermentación alcohólica (ver Figura 8). En el primer paso, el piruvato se descarboxila en una reacción irreversible catalizada por la piruvato descarboxilasa, convirtiéndose en acetaldehído y liberando una molécula de dióxido de carbono. En el segundo paso, el acetaldehído se reduce a etanol, por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa. En este paso, el NADH, generado en la glucólisis, es utilizado como dador del hidrógeno para la formación del compuesto final, regenerándose el NAD^+ (Nelson y Cox, 2001).

En una fermentación bien lograda, la mayor parte del azúcar es consumida y convertida en etanol y una pequeña parte es convertida a otros subproductos como ser ácidos orgánicos, compuestos que otorgan sabor y glicerol. Este último es producido por la reducción de dihidroxiacetona fosfato, regenerando el NAD^+ . Este proceso solo ocurre en la fermentación cuando la concentración de acetaldehído es inadecuada. Una pequeña cantidad de glicerol es producida en todas las fermentaciones, sin embargo su producción se puede ver incrementada por el crecimiento de las levaduras en medios alcalinos, en condiciones de estrés osmótico y en la presencia de compuestos que reaccionen con el acetaldehído, como ser el bisulfito. En las fermentaciones industriales, la producción de glicerol es controlada y llevada al mínimo, ya que la misma representaría el consumo de sustrato para un producto no buscado, y por lo tanto un menor rendimiento del proceso (Lea y Piggot, 2003).

1.8 MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LAS FERMENTACIONES VHG

Actualmente las fermentaciones VHG son muy prometedoras y atractivas dado que permiten mejoras significativas en la globalidad del proceso de fermentación, llevando a una reducción de gasto energético y por lo tanto minimizando los costos de producción.

Las levaduras, en particular las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son las más utilizadas para las fermentaciones a escala industrial. Esto se da por su capacidad de fermentar una variedad de azúcares y de desarrollar mecanismos adecuados para enfrentar condiciones adversas que se

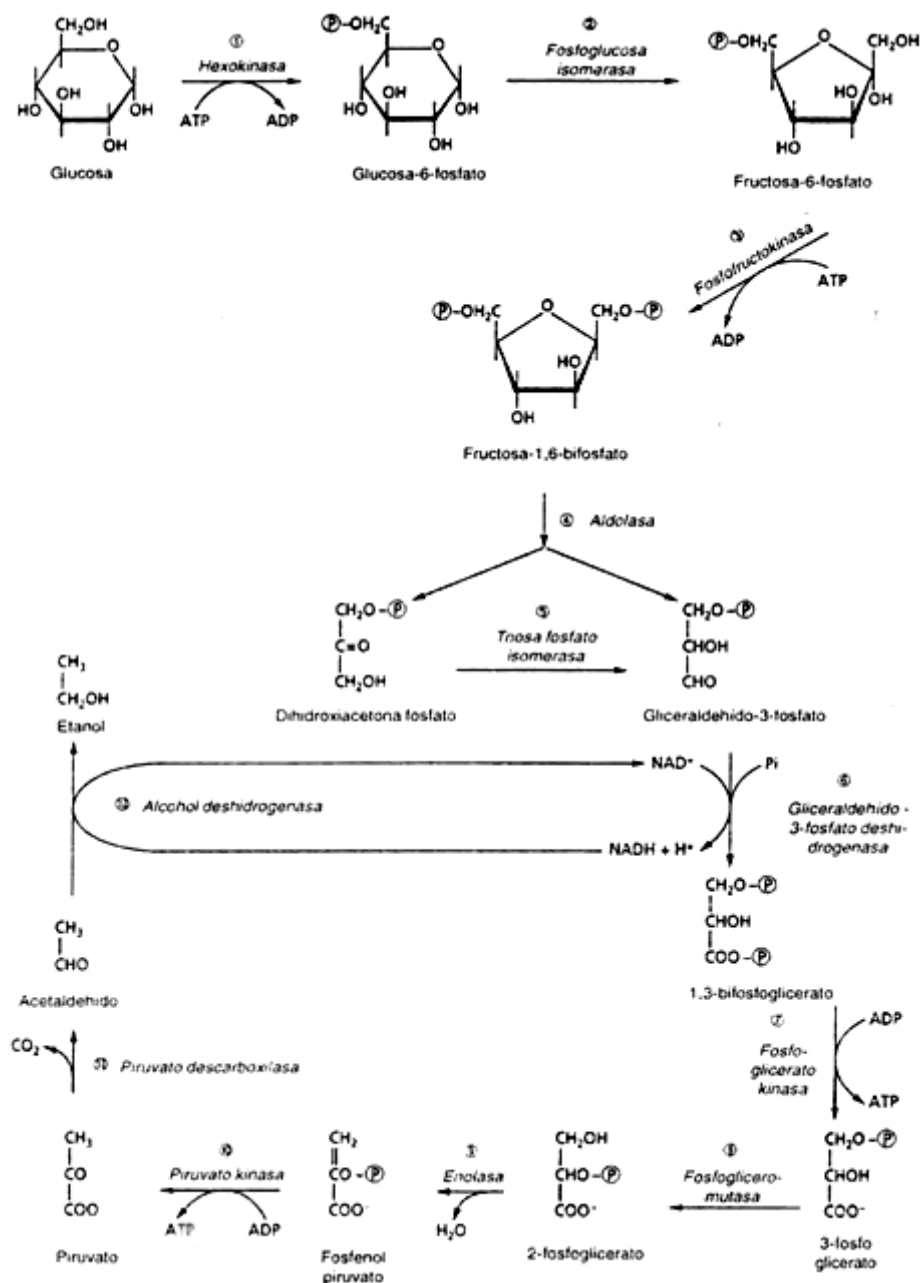


Figura 8. Vía metabólica de obtención de etanol a partir de glucosa (modificada de Glazer y Nikaido, 2007).

encuentran en este tipo de fermentaciones como ser las altas concentraciones de etanol, las altas presiones osmóticas y la presencia de inhibidores (formados durante los pre-tratamientos de la materia prima o durante la fermentación). Asimismo, estas levaduras pueden crecer rápidamente en ausencia de oxígeno, situación en la que se encuentran en fermentaciones a grandes escalas (Pereira et al., 2010 y Mussatto et al., 2010).

Sin embargo, la búsqueda e investigación de nuevos microorganismos para desempeñar las fermentaciones VHG se está realizando cada vez más. Las características buscadas en estos se describen en la Tabla 2. A modo de resumen; deben ser capaces de metabolizar una amplia variedad de azúcares, poseer requerimientos nutricionales mínimos para simplificar el proceso y reducir los costos de producción. Además, deben tener altas productividades y rendimientos de etanol, así como reducir la formación de subproductos indeseables, tolerar la presencia de inhibidores que puedan formarse durante el proceso, tener una alta tolerancia al etanol y al estrés osmótico ocasionado por la elevada concentración de azúcares fermentables (Pereira et al., 2011).

Tabla 2. Características relevantes que deben poseer los microorganismos utilizados para la producción de etanol (Adaptado de Dien et al., 2003).

Características	Requerimiento
Rendimiento de etanol	> 90% del teórico
Tolerancia a concentraciones de etanol	> 40 g/ L
Productividad de etanol	> 1 g.L ⁻¹ .h ⁻¹
Crecimiento robusto y requerimientos nutricionales simples	Formulación de medio barato
Capacidad de crecer en hidrolizados sin diluir	Resistencia a inhibidores
Las condiciones del medio retardan los contaminantes	pH ácido o altas temperaturas

La microflora presente en los entornos de las plantas donde se realizan las fermentaciones tradicionales e industriales pueden constituir una buena fuente de aislados microbianos que contengan las características buscadas. Especies de levaduras tolerantes al estrés pueden ser encontradas en procesos de fermentación alcohólica, donde la levadura es sometida al estrés osmótico y a altas concentraciones de etanol (Basso et al., 2008). Estos candidatos, pueden ser posteriormente sometidos a procesos de mejoramiento, como ingeniería genética y metabólica, para obtener un mejor rendimiento por parte de los mismos (Nevoigt, 2008; Nielsen, 2001).

Basso et al. (2008) han demostrado que los cultivos iniciadores utilizados en las fermentaciones industriales en Brasil (que utilizan caña de azúcar como materia prima), que están formados principalmente por especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, son sustituidos

completamente por otras cepas presentes en la maquinaria utilizada en cuestión de semanas. Estas cepas son altamente productivas y predominan en el fermentador durante el periodo de producción, alcanzando fermentaciones eficientes y estables. Algunas de ellas, como ser CAT-1 y PE-2, se están disponibles a la venta en el mercado desde los años 90 y al día de hoy se encuentran presentes en más de la mitad de las destilerías de Brasil, utilizándose solas o en mezclas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBEJTIVO GENERAL:

Seleccionar una cepa de levadura aislada de materiales industriales que fermente altas concentraciones de azúcar, superior a los 200 g/L, con buena eficiencia y productividad (alto rendimiento y alta velocidad de fermentación) y resistente al etanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislamiento de cepas de levaduras de materiales industriales y selección de al menos tres de ellas en base a su crecimiento en medio líquido conteniendo etanol en concentraciones de 50 g/L.
- Evaluación de los resultados de la fermentación de las tres cepas seleccionadas y selección de una de ellas en base a su rendimiento de etanol y su productividad comparadas con la levadura de panificación comercial *Saccharomyces cerevisiae*, en un medio con 150 g/L de glucosa.
- Evaluación de la fermentación de altas concentraciones iniciales de azúcar (condiciones VHG) de la cepa seleccionada y de su resistencia a altas concentraciones de etanol. Comparación de los resultados con una cepa de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) y una cepa industrial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 AISLAMIENTO DE CEPAS DE MATERIALES INDUSTRIALES

Se tomaron muestras de diferentes materiales industriales pertenecientes a diferentes fases del proceso de producción de bioetanol combustible a partir de sorgo dulce de la planta Alur en Bella Unión, Artigas (Figura 9). Los materiales seleccionados fueron: jugo de salida del primer molino, jugo mixto de salida de los molinos, mezcla de jugos, fibra de sorgo, tallo del sorgo y el jugo del exprimido del tallo de sorgo.



Figura 9. Planta de producción de combustible a partir de sorgo dulce Alur, Bella Unión, Artigas.

Los jugos utilizados se pasaron a placas conteniendo un medio YPD agar conteniendo en g/L: glucosa 20, peptona 20, extracto de levadura 10, y agar 15 junto con cloranfenicol al 0.05 % para inhibir el crecimiento bacteriano.

La fibra y el tallo se colocaron en frascos con medio líquido YPD (glucosa 20 g/L, peptona 20 g/L y extracto de levadura 10 g/L) durante 72 horas. Luego de transcurrido este tiempo se traspasó un volumen del medio a a placas con YPD agar y clorafenicol al 0.05%.

Se realizaron los aislamientos necesarios para obtener cultivos de levaduras puros. Posteriormente se caracterizó a cada uno de los cultivos según sus características morfológicas: forma, elevación, borde, color y textura. Luego se realizó un frotis de cada una de las muestras y se hizo una tinción de Gram, que las tiñó de color violeta. Cabe destacar que esta tinción es específica para caracterizar

bacterias, pero se utilizó en este caso con el fin de observar con mayor claridad las colonias bajo microscopio óptico. Se describió la forma de las levaduras bajo microscopio óptico (aumento 1000x).

3.2 ESTUDIO PRIMARIO DE LA RESISTENCIA AL ETANOL

Para analizar la resistencia al etanol se preparó un medio líquido YPD, al cual se esterilizó y se le adicionó en condiciones asépticas etanol en concentración de 50 g/L. Se colocó el medio en tubos tapados de 10 mL y se lo dejó 24 horas para observar la carencia de contaminación. Luego de transcurrido este tiempo se inoculó cada tubo con una ansada de cada uno de los cultivos y se observó su crecimiento luego de 48 horas. Se realizaron duplicados de todas las muestras.

Para corroborar que no hubo contaminación en los tubos se repicó su contenido con un ansa en YPD agar, se dejó durante 48 horas a temperatura ambiente y se observó presencia o no de crecimiento.

3.3 SELECCIÓN DE LEVADURAS

En base a las características morfológicas y a su crecimiento en presencia de etanol se seleccionaron tres levaduras a las que se les denominó A, B y C.

3.4 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 g/L DE GLUCOSA

3.4.1 Microorganismos

Los microorganismos que se utilizaron en este trabajo fueron las levaduras A, B, C y la levadura seca de panificación comercial *Saccharomyces cerevisiae* (*Fleischmann*). Las primeras tres se mantuvieron

mediante repique en tubos inclinados con medio YPD agar. Estos tubos se conservaron en cámara a 4 °C.

3.4.2 Desarrollo del inóculo

Se cultivaron por duplicado las levaduras A, B y C en tubos inclinados de agar YPD estériles a temperatura ambiente durante 2 días. Se traspasó su contenido, en un ambiente estéril y con un ansa, a matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL de medio líquido YPD.

En el caso de la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae*, se pesaron 1.5 g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL del mismo medio mencionado anteriormente.

Los matraces se cultivaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C durante 16 horas. Se calculó el volumen de la toma a realizarse para obtener una concentración inicial de 1×10^8 células/mL en el matraz de fermentación. Ese volumen se centrifugó en tubos de 50 mL a 5000 rpm y 4 °C por 8 minutos. El sobrenadante se descartó y la biomasa se lavó con 5 mL de agua destilada estéril. Se volvió a resuspender su contenido en un agitador de tubo tipo vortex y se centrifugó en las mismas condiciones. Por último, se agregó 5 mL del medio de fermentación a la biomasa, se agitó mediante agitador de tubo tipo vortex y esta suspensión se utilizó como inóculo de fermentación.

3.4.3 Estudio de la capacidad de producción de etanol

Se estudió la capacidad de producción de etanol de las diferentes levaduras a partir de medios sintéticos conformados por: glucosa 150 g/L, peptona 20 g/L, y extracto de levadura 10 g/L.

Se emplearon matraces de tapa rosca de 250 mL, con 150 mL de medio pasteurizado (100 °C, 30 min) El pH se ajustó a 4.5 con H_2SO_4 10 M o NaOH (1 M) La fermentación se realizó en agitador orbital a una temperatura de 30 °C, una velocidad de agitación de 100 rpm y una concentración inicial de 1×10^8 células/mL.

Se monitoreó la fermentación durante 24 horas, tomando 5 mL de muestra a las 0, 16 y 24 horas. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm y 4 °C por 8 minutos y se conservó el sobrenadante en tubos de 10 mL con tapa, en un freezer a -18 °C. En todos los casos se determinó glucosa, etanol y glicerol y se realizó recuento celular.

3.5 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA A

3.5.1 Microorganismos

El microorganismo utilizado fue la levadura A. La misma se mantuvo mediante repique en tubos inclinados en medio YPD agar que se conservaron en cámara a 4 °C.

3.5.2 Desarrollo del inóculo

Se cultivó por duplicado la levadura A en tubos inclinados de YPD agar estériles a temperatura ambiente por 2 días. Se traspasó su contenido, en un ambiente estéril y con un ansa, a matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL de medio líquido YPD.

Los matraces se cultivaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C durante 24 horas.

3.5.3 Determinación del peso seco

Se monitoreó el crecimiento del inóculo durante 24 horas, tomando 1 mL de muestra a las 0, 5, 8, 12, 16 y 24 horas. Se colocó dicho volumen de cada una de las tomas en tubos separados de tapa rosca de 10 mL y se lo centrifugó durante 8 minutos a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se conservó la biomasa. Se colocaron los tubos en una estufa a 60 °C hasta peso constante (diferencia no mayor a 0.5 mg en medidas consecutivas).

3.6 ANALISIS DE LA RESISTENCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

•

3.6.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este experimento fueron las levaduras A, y la levadura seca de panificación comercial *Saccharomyces cerevisiae* (*Fleischmann*). La primera se mantuvo mediante repique en tubos inclinados con medio YPD agar. Estos tubos se conservaron en cámara a 4 °C.

3.6.2 Desarrollo del inóculo

Se cultivó por duplicado la levadura A en tubos inclinados de YPD agar estériles a temperatura ambiente por 2 días. Se traspasó su contenido, en un ambiente estéril y con un ansa, a matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL de medio líquido YPD.

En el caso de la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae*, se pesaron 1.5 g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL del mismo medio.

Los matraces se cultivaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C durante 16 horas. Se calculó el volumen de la toma a realizarse para obtener una concentración inicial de 1×10^8 células/mL en el matraz de fermentación. Este volumen se centrifugó en tubos de 50 mL a 5000 rpm y 4 °C por 8 minutos. El sobrenadante se descartó y la biomasa se lavó con 5 mL de agua destilada estéril. Se volvió a resuspender su contenido en un agitador de tubo de tipo vortex y se centrifugó en las mismas condiciones. Por último, se agregó 5 mL del medio de fermentación a la biomasa, se agitó nuevamente mediante agitador de tubo tipo vortex y esta suspensión se utilizó como inóculo de fermentación.

3.6.3 Estudio de la resistencia al etanol

Se estudió la capacidad de producción de etanol de las dos levaduras en medios sintéticos suplementados con diferentes concentraciones de etanol. Para ello se trabajó con los tres medios mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de medios utilizados para el estudio de la resistencia al etanol.

Medio	Glucosa (g/L)	Peptona (g/L)	Extracto de Levadura (g/L)	Etanol (g/L)
10*	150	20	10	100
15**	150	20	10	150
20***	150	20	10	200

*El 10 indica que el medio de fermentación contenía una concentración inicial del 10% (100 g/L) de etanol.

** El 15 indica que el medio de fermentación contenía una concentración inicial del 15% (150 g/L) de etanol

***El 20 indica que el medio de fermentación contenía una concentración inicial del 20% (200 g/L) de etanol.

Se emplearon matraces de tapa rosca de 250 mL, conteniendo 150 mL de medio pasteurizado (100 °C, 30 min). El pH se ajustó a 4.5 con H₂SO₄ 10 M o NaOH (1 M). La fermentación se realizó en agitador orbital a una temperatura de 30 °C, con una velocidad de agitación de 100 rpm y una concentración inicial de 1x10⁸ células/ mL.

Se monitoreó la fermentación durante 24 horas, tomando 5 mL de muestra a las 0, 16 y 24 horas. Cada muestra se centrifugó a 5000 rpm y 4 °C por 8 minutos y se conservó el sobrenadante en tubos de 10 mL con tapa en freezer a -18 °C. En todos los casos se determinó glucosa, etanol y glicerol y se realizó recuento celular.

3.7 ENSAYO DE FERMENTACIÓN DE MEDIO CON 250 g/L DE GLUCOSA

3.7.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este ensayo fueron la cepa de levadura A, la levadura industrial CAT (suministrada por ALUR) y la levadura seca de panificación comercial *Saccharomyces cerevisiae* (*Fleischmann*). La primera se mantuvo en las mismas condiciones que fueron descritas en las secciones anteriores.

3.7.2 Desarrollo del inóculo

Se cultivó por duplicado la levadura A en tubos inclinados de agar YPD estériles a temperatura ambiente por 2 días. Se traspasó su contenido, en un ambiente estéril y con un ansa, a matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL de medio líquido YPD. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* se pesaron 1.5 g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón y 100 mL del mismo medio YPD.

Para la levadura industrial CAT, se pesaron 1.5 g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón conteniendo 100 mL de medio formado por glucosa 50 g/L, peptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L y antibiótico *Kamoran*® concentraciones de 3 ppm. El *Kamoran*® es un biocida utilizado en la industria para controlar la contaminación bacteriana durante la fermentación alcohólica (Perissatto et al., 2008).

Los matraces se cultivaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C durante 16 horas. Se calculó el volumen de la toma a realizarse para obtener una concentración inicial de 1×10^8 células/mL en el matraz de fermentación. Este volumen se centrifugó en tubos de 50 mL a 5000 rpm y 4 °C por 8 minutos. El sobrenadante se descartó y la biomasa se lavó con 5 mL de agua destilada estéril. Se volvió a resuspender su contenido en un agitador de tubo tipo vortex y se centrifugó en las mismas condiciones. Por último, se agregaron 5 mL del medio de fermentación a la biomasa, se agitó nuevamente mediante agitador de tubo tipo vortex y esta suspensión se utilizó como inóculo de fermentación.

3.7.3 Estudio de la capacidad de producción de etanol

Se estudió la capacidad de producción de etanol de las diferentes levaduras a partir de medios sintéticos conformados por; glucosa 250 g/L, peptona 6 g/L, extracto de levadura 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, y $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 5 mg/ g de glucosa (Breisha, 2010). En los matraces correspondientes a CAT se le adicionó antibiótico *Kamoran*® a 3ppm.

Se emplearon matraces de tapa rosca de 250 mL con 150 mL de medio pasteurizado (100 °C, 30 min). El pH se ajustó a 4.5 mediante el uso de H_2SO_4 10 M o NaOH (1 M). La fermentación se realizó en agitador orbital a una temperatura de 30 °C, una velocidad de agitación de 100 rpm y una concentración inicial de 1×10^8 células/ mL.

Se monitoreó la fermentación durante 72 horas, tomando 5 mL de muestra a las 0, 24, 33, 48 y 72 horas. Cada muestra se centrifugó a 5000 rpm y 4 °C por 8 minutos y se conservó el sobrenadante en tubos de 10 mL con tapa, en un freezer a -18 °C. En todos los casos se determinó glucosa, etanol y glicerol.

Asimismo se realizó seguimiento de la fermentación por pérdida de CO_2 , determinado mediante la pérdida de la masa. La misma se monitoreó por pesadas durante las 72 horas. Se utilizó como control un matraz conteniendo únicamente medio.

3.8 METODOS ANALÍTICOS

3.8.1 Determinación de azúcares, alcoholes y productos de degradación mediante cromatografía líquida

La determinación de glucosa, glicerol y etanol se realizó por cromatografía líquida en un HPLC Shimadzu CLASS-VP 5.04 con detector de índice de refracción. Se empleó una precolumna Shodex Sugar KS-G o una columna Shodex Sugar KS-801. Las condiciones instrumentales fueron: flujo 0,7 mL/min y temperatura 55 °C. Se utilizó agua Mili Q como fase móvil.

Previo el análisis se agregó 10 µL de ácido sulfosalicílico al 20 % cada 5 mL de muestra para precipitar proteínas y luego se centrifugó. Las muestras no presentaron precipitado.

En todos los casos las muestras a analizar se filtraron con filtros Millipore de 0.22 μm . De tener que realizarse diluciones se utilizó agua Mili Q. Se realizaron curvas de calibración utilizando estándares para cada analito en cada grupo de muestras analizada.

3.8.2 Crecimiento celular

Previo y durante la fermentación se determinó la concentración celular y la fracción de células viables mediante recuento directo en cámara de Neubauer utilizando azul de metileno como colorante vital (Lee et al., 1981).

3.9 CALCULOS

Se calcularon los siguientes parámetros para la evaluación de la fermentación:

- **Rendimiento de etanol basado en el consumo de glucosa ($Y_{p/s}$):** cantidad de etanol producido por cantidad de glucosa consumida ($g_{\text{etanol}} / g_{\text{glucosa}}$).
- **Eficiencia de Fermentación:** gramos de etanol producido por gramos de etanol que teóricamente debiera haberse producido según el consumo de glucosa*:

$$\text{Eficiencia de fermentación} = Y_{p/s} / 0.511$$

- **Consumo de glucosa:** Porcentaje de glucosa inicial consumida:

$$\text{Consumo de glucosa} = 100 \times (\text{concentración inicial de glucosa} - \text{concentración final de glucosa}) / (\text{concentración inicial de glucosa}).$$

- **Productividad volumétrica (Qp):** cantidad de etanol producida por volumen de medio por tiempo (en este estudio se calculó a las 24 horas de fermentación).
- **Velocidad específica de formación de producto (q_p):** cantidad de etanol producidos por cantidad de biomasa por tiempo (g_{etanol}/g_{biomasa}·h).

Velocidad específica de formación de producto = Qp / concentración de células vivas a las 24 horas de fermentación.

3.10 ANALISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de ANOVA de los datos experimentales para comprobar si las diferencias encontradas entre ellos eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) utilizando el programa KaleidaGraph®, Synergy Software.

*Cálculo basado en el rendimiento estequiométrico: 1 g de glucosa produce 0.511 g de etanol.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS

En la Figura 10 se presentan las fotografías de las placas con cultivos de levaduras puros aislados del jugo mixto de salida de molinos (A y B) , de la mezcla de jugos de molino (C y D), de la fibra del sorgo (E), del tallo del mismo (F) y del jugo mixto de salida de molinos (G y H). En la Tabla 4 se resumen las características morfológicas de cada uno de ellos.

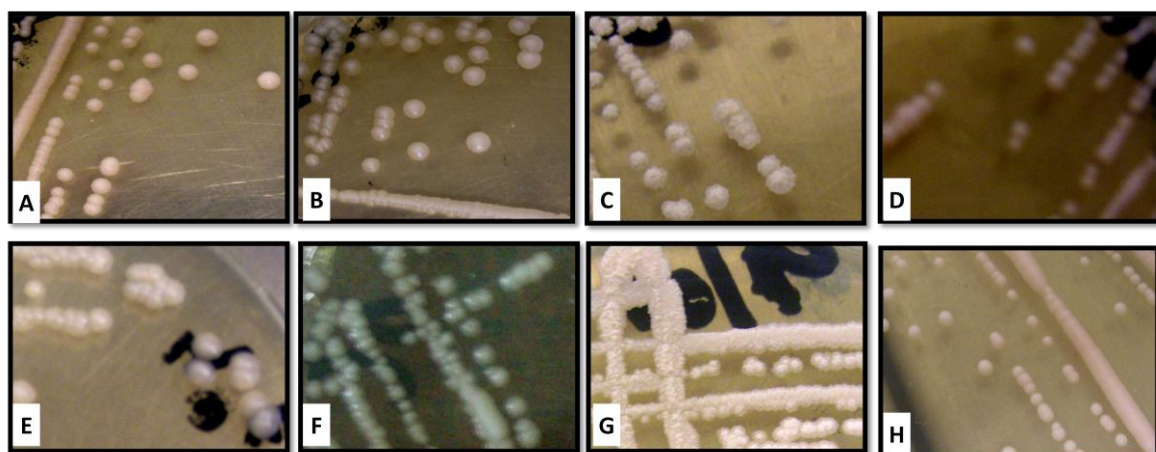


Figura 10. Fotografías de las placas de cultivos de levaduras aislados de: A y B Jugo mixto de salida de molinos, C y D Mezcla de jugos de molinos, E Fibra de sorgo, F Tallo de sorgo, G y H Jugo de salida de primer molino.

Tabla 4. Descripción de cultivos de levaduras obtenidos a partir de los diferentes materiales industriales.

Cepa	Forma	Elevación	Borde	Color	Textura
A	Redonda	Alta	Entero	Blanca	Cremosa
B	Redonda	Baja	Entero c/halo transparente	Blanco	Cremosa
C	Redonda	Baja	Ondulado	Blanco	Rugosa
D	Redonda	Baja	Entero	Blanco	Cremosa
E	Redonda	Baja	Entero c/halo transparente	Blanco	Cremosa
F	Redonda	Baja	Entero	Blanca	Cremosa
G	Redonda	Baja	Ondulado	Blanco	Rugosa
H	Redonda	Alta	Entero	Blanco	Cremosa

Se aprecia tanto en las fotografías (Figura 10) como en la Tabla 4 que todas las levaduras eran de forma redondeada. Sin embargo las mismas se diferenciaron en elevación, borde, color y textura. Se distinguieron en total lo que en un principio se creyeron ser cuatro tipos diferentes de levaduras:

- 1- redondeadas, altas, de borde entero, color blanco y textura cremosa
- 2- redondeadas, bajas, de borde ondulado, color blanco y textura rugosa
- 3- redondeadas, bajas, de borde entero, color blanco y textura cremosa
- 4- redondeadas, bajas, de borde entero con halo transparente, color blanco y textura cremosa.

Vale la pena destacar que a partir del jugo de salida del primer molino, el jugo mixto de salida de los molinos y la mezcla de jugos se lograron aislar lo que en un principio parecieron dos tipos de levaduras diferentes. En el caso de las dos primeras la diferencia se encontraba en textura, borde y elevación, mientras que entre las terceras la diferencia estuvo entre la elevación y el borde.

La Figura 11 muestra la morfología de las células de las cepas aisladas en microscopio óptico con aumento 1000x con aceite de inmersión y tinción de Gram. La Tabla 5 resume lo observado en las mismas, distinguiendo las levaduras obtenidas de un mismo material por su textura.

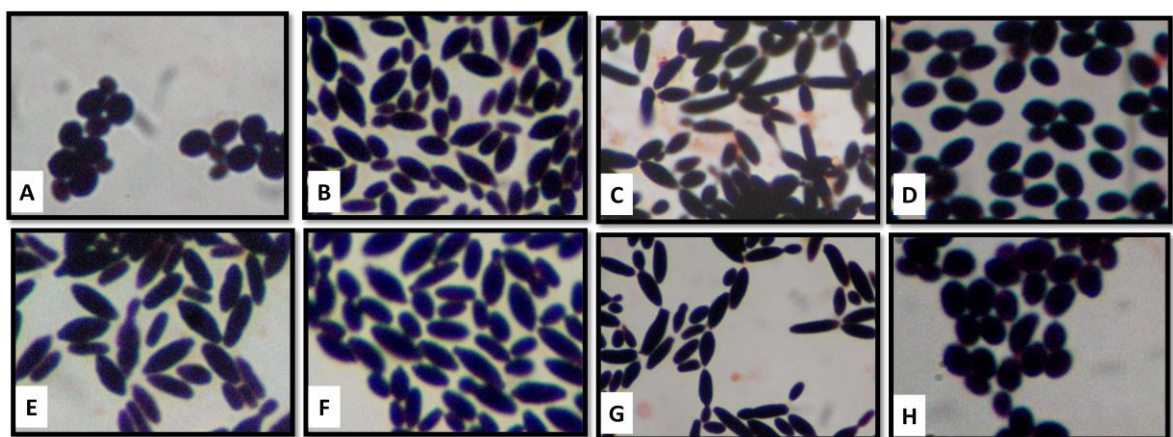


Figura 11. Fotografía de lo observado en un microscopio óptico (1000x) de las muestras de A y B. Jugo mixto de salida de molinos, C y D Mezcla de jugos de molinos, E Fibras de sorgo, F Tallo de sorgo, G y H Jugo de salida de primer molino.

Tabla 5. Características de levaduras en microscopio óptico (1000x).

Cepa	Forma
A	Ovaladas
B	Avellanadas
C	Alargadas
D	Ovaladas
E	Avellanadas
F	Avellanadas
G	Alargadas
H	Ovaladas

Se encontraron tres formas diferentes entre las levaduras aisladas: ovalada, alargada y avellanada. Esta distinción estableció que había un tipo menos de levadura que el previsto por la caracterización morfológica. Se consideró entonces que las levaduras descriptas como redondeadas, altas, de borde entero, color blanco y textura cremosa eran las mismas que las descriptas como redondeadas, altas, de borde entero, color blanco y textura cremosa, dado que en lo único que se diferenciaron fue en la elevación, parámetro que posee un alto margen de error.

Tomando en cuenta lo observado tanto en las placas como en el microscopio óptico, en un principio se estimó la existencia de tres cepas diferentes; una cremosa, borde entero sin halo y forma ovalada al microscopio óptico; otra cremosa, borde entero con halo y forma avellanada al microscopio óptico; y por último, una rugosa, con borde ondulado, con forma alargada y dispuestas en forma de fila bajo el microscopio óptico. Sin embargo, se notó luego que en algunas fotografías de las levaduras con forma ovalada al microscopio, coexistían levaduras con forma avellanada. Dado que las levaduras a medida que envejecen pueden alterar su forma, tamaño y hasta su apariencia en la superficie (Jazwinski, 1990 y Mortimer y Johnston, 1959) se determinó que las levaduras cremosas con halo y forma ovalada al microscopio óptico y cremosas sin halo con forma avellanada, eran la misma levadura pero en diferentes etapas de crecimiento.

4.2 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE ETANOL A CONCENTRACIONES DE 50 g/L

El conocer si las levaduras aisladas pueden crecer en medios conteniendo concentraciones de etanol de 50 g/L, permitió tener un primer indicio de si las mismas pueden llevar a cabo una fermentación en presencia de altas concentraciones de éste, como ocurre en fermentaciones industriales.

La presencia de crecimiento de las diferentes levaduras y el lugar donde ocurrió el mismo dentro de los tubos con medio YPD y etanol se presentan en la Tabla 6. Como se observa en la misma, todos los tubos presentaron crecimiento en el fondo. Esto implicó que todas las levaduras aisladas resistieron al etanol, aunque tal vez no a concentraciones de 50 g/L ya que una parte del mismo pudo haberse evaporado durante el período que las levaduras estuvieron creciendo. Para conocer la concentración de etanol en los tubos se podría haber realizado una determinación de la misma por cromatografía líquida. Al tratarse de un estudio primario, se decidió descartarlo, dejándolo para una etapa posterior.

Tabla 6. Resultados de crecimiento en medio YPD conteniendo 50 g/L de etanol.

Cepa	Crecimiento en tubos con etanol
A	Crecimiento en el fondo
B	Crecimiento en el fondo
C	Crecimiento en el fondo y superficie
D	Crecimiento en el fondo
E	Crecimiento en el fondo
F	Crecimiento en el fondo
G	Crecimiento en fondo y superficie
H	Crecimiento en el fondo

Aquellas levaduras que se observaron como rugosas a simple vista, también presentaron crecimiento en la superficie de los tubos. La razón por ello se desconoció y se decidió no profundizar en la misma.

Luego de realizado el estudio, se plaqueó el contenido de los tubos en YPD agar para determinar la presencia de contaminación. En el caso de las levaduras que presentaron crecimiento tanto en el fondo del tubo como en la superficie, se tomó muestra de ambas. El crecimiento en placa de estas últimas mostró en ambos casos levaduras de superficie rugosa, por lo que a simple vista se trataría del mismo tipo. Se especuló que inicialmente estas levaduras crecen en el fondo como el resto, y

que luego al finalizar su ciclo de vida mueren y quedan en la superficie. Para comprobar esta hipótesis se podría haber realizado un análisis de viabilidad de las mismas.

Por último, no se observó crecimiento de microorganismos contaminantes en ninguna de las placas.

4.3 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 g/L DE GLUCOSA

Para realizar los estudios iniciales de fermentación con 150 g/L de glucosa, se decidió seleccionar tres cepas de las aisladas inicialmente, que presentaran diferencias en las células observadas bajo microscopio óptico y que fueran colonias morfológicamente distintas. Se seleccionaron las levaduras de textura cremosas sin y con halo aisladas del jugo mixto de salida de molinos y la levadura de textura rugosa obtenida de la mezcla de jugos (A, B y C). A pesar que en un principio se consideró que las cepas salidas del primer molino cremosas sin halo y con halo eran la misma levadura en diferentes estados de crecimiento, se decidió igualmente utilizar ambas para el ensayo y así comprobar si efectivamente esto era así o no.

Mediante la evaluación de los resultados obtenidos en los ensayos de fermentación en medios sintéticos con 150 g/L de glucosa se escogió la levadura, entre las tres seleccionadas, que obtuviese los mejores resultados de consumo total de glucosa, altas concentraciones finales de etanol, bajas concentraciones finales de glicerol, alto rendimiento, elevada productividad total y elevada velocidad de específica de formación de producto. Se usó la levadura de panificación, *Saccharomyces cerevisiae* como referencia.

En la Figura 12 y 13, y en la Tabla y 8 se muestran los resultados obtenidos de la fermentación utilizando un medio sintético con concentraciones iniciales de glucosa de 150 g/L.

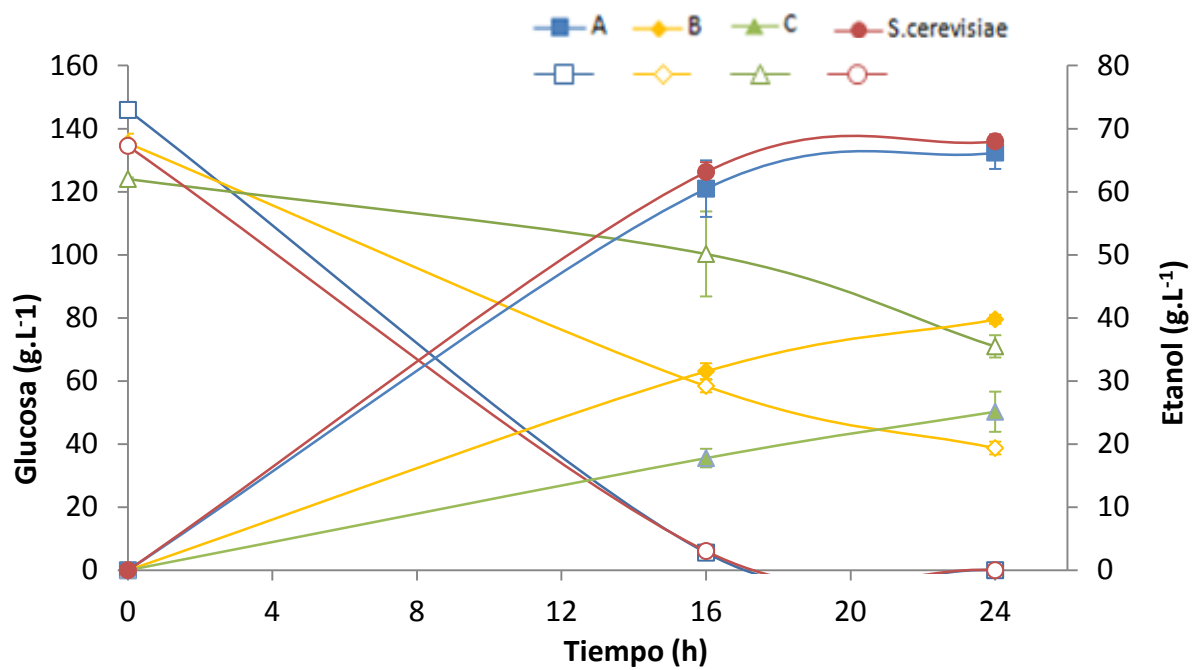


Figura 12. Perfiles de glucosa (lleno) y etanol (vacío) durante la fermentación en un medio con 150 g/L de glucosa para las cepas A (cuadrado), B (rombo), C (triángulo) y *S. cerevisiae* (círculo).

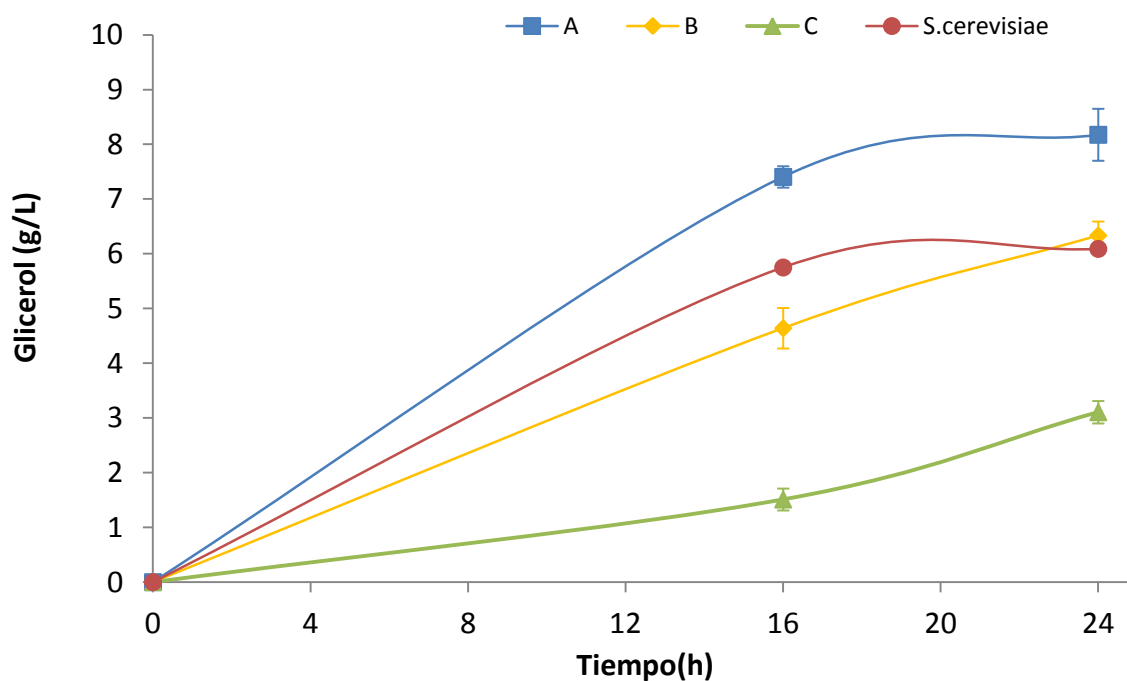


Figura 13. Perfil de glicerol durante la fermentación en un medio con 150 g/L de glucosa para las cepas A (cuadrado), B (rombo), C (triángulo) y *S. cerevisiae* (círculo).

Tabla 7. Concentraciones de etanol y glicerol obtenidas de fermentación en medio con 150 g/L de glucosa.

Muestra	Concentración de etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
A	66 ± 3	8.2 ± 0.1
B	41 ± 1	6.3 ± 0.3
C	25 ± 3	3.1 ± 0.2
<i>S.cerevisiae</i>	67 ± 1	6.1 ± 0.0

Tabla 8. Resultados de la fermentación en medio con 150 g/L de glucosa.

Muestra	Consumo de glucosa (%)	Y p/s (g _{etanol} /g _{glucosa})	Eficiencia de fermentación	Q _p (g/L.h)	q _p (g/cél.h).10 ⁻¹²
A	100	0.45 ± 0.02	0.88 ± 0.05	2.8 ± 0.1	22 ± 2
B	71 ± 2	0.41 ± 0.01	0.80 ± 0.03	1.7 ± 0.1	9 ± 1
C	43 ± 3	0.47 ± 0.02	0.92 ± 0.04	1.0 ± 0.1	7 ± 1
<i>S.cerevisiae</i>	100	0.50 ± 0.01	0.98 ± 0.02	2.8 ± 0.1	31 ± 3

La levadura A consumió totalmente la glucosa entre las 18-20 horas (Figura 12) de iniciada la fermentación y produjo una concentración final de etanol de 66.2 g/L y 8.2 g/L de glicerol (Tabla 7 y 8 y Figura 12). Su eficiencia de fermentación fue de 0.88, su productividad total (Q_p) de 2.8 g/L.h y su velocidad específica de formación de producto (q_p) de 22 x 10⁻¹² g/cél.h (Tabla 8). Estos resultados son similares a los obtenidos por la levadura comercial de referencia *S. cerevisiae* (no existió diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados entre estas levaduras) (Figura 12 y 13 y Tabla 7 y 8) con la única salvedad de que la levadura A realizó la fermentación con una eficiencia levemente menor que la *S. cerevisiae* (0.88 para A y 0.98 para la levadura comercial) y con una velocidad específica de formación de producto un poco más baja. La similitud de comportamientos entre ambas levaduras permitió afirmar que la levadura A, aislada de la mezcla de jugos, podría ser una buena candidata para realizar fermentaciones con concentraciones iniciales de azúcar mayores (VHG).

Por otro lado, tanto la levadura B como la C no lograron un consumo total de glucosa durante la fermentación. La primera consumió el 71 % de su glucosa inicial (Tabla 8) y obtuvo concentraciones finales de etanol y glicerol de 41 g/L y 6.3 g/L respectivamente (Tabla 7 y Figura 13). Tanto su

eficiencia, como su productividad total y su velocidad específica de formación de producto fueron inferiores a las alcanzadas por la levaduras A y *S. cerevisiae*, siendo las mismas de 0.80, 1.7 g/L.h y 9×10^{-12} g/cél.h respectivamente. La levadura C tuvo un consumo de glucosa del 43 % (Tabla 8) y produjo concentraciones finales de etanol y glicerol de 25 g/L y 3.1 g/L respectivamente (Tabla 7 y Figura 13). A pesar del bajo consumo de glucosa y baja producción de etanol, la eficiencia de fermentación de esta cepa fue de 0.92, valor muy cercano al de *S. cerevisiae*. El elevado valor de este parámetro se debió a que la mayor parte de la glucosa consumida por la levadura (aunque el consumo haya sido bajo) fue utilizada para la producción de etanol. Sin embargo dado que su velocidad específica de formación de producto fue la más baja de las cepas en estudio (7×10^{-12} g/cél.h) no alcanzó altas concentraciones finales de etanol. Por último, la cepa C fue la de menor productividad total, alcanzando únicamente un valor de 1.0 g/L.h.

El análisis estadístico mostró la existencia de una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el consumo de glucosa, productividad volumétrica y velocidad específica de formación de producto de B y C con A y *S. cerevisiae*. Asimismo, B y C presentaron diferencias significativas entre ellas ($p \leq 0.05$) en los parámetros productividad volumétrica y consumo de glucosa (ver Tablas 14, 15, 18, 19, 20 y 21 en Anexo).

La Figura 12 muestra las curvas de consumo de glucosa y producción de etanol de las levaduras B y C. En la misma se puede observar que la velocidad de consumo de glucosa y de producción de etanol fue menor que para la cepa A. Esto pudo haberse debido a una fermentación incompleta, causada por un tiempo de fermentación insuficiente.

Esta teoría se vio apoyada por el hecho de que su curva de etanol no pareció estabilizarse sino que tendió a seguir creciendo. Asimismo, ambas levaduras poseyeron un alto rendimiento de etanol basado en el consumo de glucosa ($Y_{p/s}$), un elevado rendimiento de fermentación y una baja productividad total. Esto se traduce en que la mayor parte del azúcar que ambas cepas consumieron, aunque el consumo no fuera total, fue convertida a etanol, pero que el tiempo en que se desarrolló la fermentación no les fue suficiente para obtener su máxima productividad. Como este trabajo se enfocó en seleccionar una cepa que pudiera fermentar azúcares de forma rápida y similar a la de las cepas industriales, no se consideró necesario repetir el experimento con las cepas anteriormente mencionadas permitiéndoles fermentar por una mayor cantidad de horas.

Por otra parte, dadas las diferencias que se obtuvieron en los resultados de las levaduras A y B, se rechazó la hipótesis de que podrían tratarse de una misma levadura pero en diferentes estados de crecimiento, es decir se trataba de dos levaduras diferentes.

Dado que la levadura A logró fermentar en menos de 24 horas la totalidad del azúcar, obtuvo una concentración final de etanol elevada y una alta eficiencia de fermentación, se seleccionó a la misma, entre las tres levaduras aisladas, para continuar con experimentos posteriores.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE A

La curva de crecimiento de la levadura A en un medio con 20 g/L de glucosa se observa en la Figura 14.

En Figura 14 se puede distinguir que existieron tres fases diferentes. La primera de ellas duró hasta las 8-9 horas, y se caracterizó por no presentar un crecimiento pronunciado de la levadura, dado que la misma se encontraba adaptándose al medio. Esta fase fue seguida por una etapa de crecimiento acelerado (fase exponencial), cuyo máximo se presentó a las 17 horas.

Luego de la fase de crecimiento acelerado y hasta las 24 horas se observó un leve crecimiento en el número de levaduras, pero no tan pronunciado como en la fase anterior. Por lo tanto, podría decirse que se estaba alcanzando la fase estacionaria, en la cual las levaduras dejaron de crecer por falta de nutrientes en el medio y en algunos casos por la presencia de sustancias tóxicas.

La toma de levadura para realizar el inóculo e iniciar la fermentación debe realizarse en la fase de crecimiento acelerado. Dentro de la misma, es recomendable hacerlo en un punto que no se esté muy cercano a la fase estacionaria, donde las levaduras no obtendrían su mejor rendimiento. En el caso de la levadura A, el tiempo ideal para realizar la toma para el inóculo sería entre las 12 h y 16 h, tal como se realizó en este trabajo.

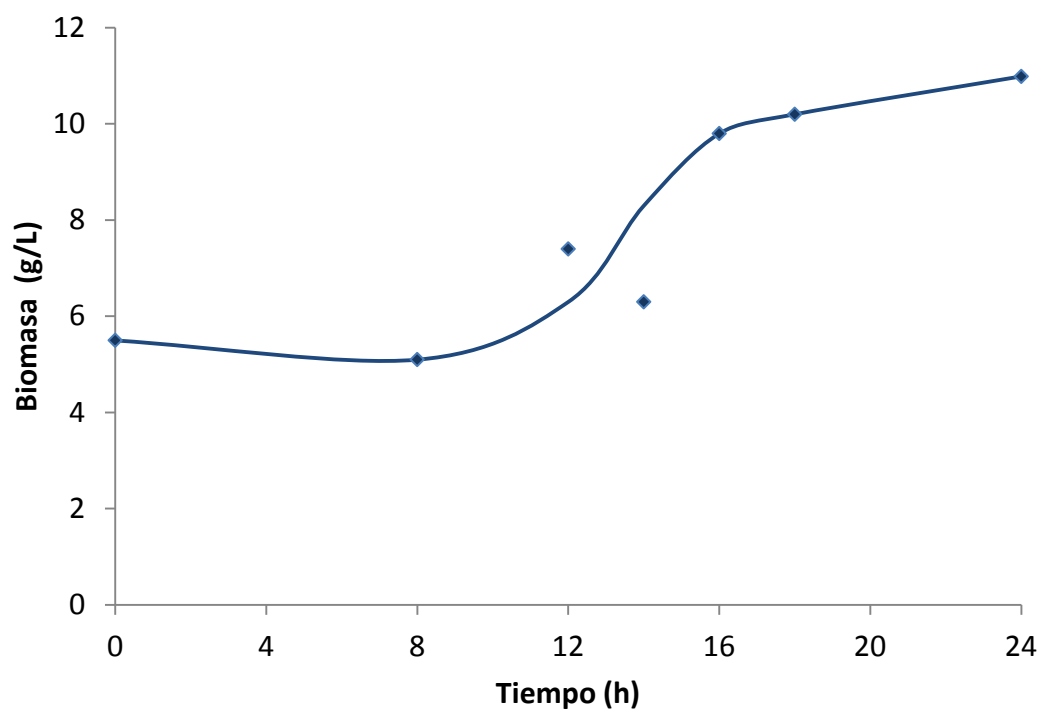


Figura 14. Perfil de crecimiento de cepa A en un medio con glucosa a concentraciones de 20 g/L.

4.5 ANALISIS DE LA RESISTENCIA AL ETANOL DE LA LEVADURA A

El estrés ocasionado por las altas concentraciones de etanol, puede llevar a fermentaciones incompletas y de bajo rendimiento, algo que se intenta evitar a escala industrial. Por lo tanto, fue de suma importancia, conocer si la levadura A aislada de la planta industrial era capaz de tolerar al etanol a determinadas concentraciones y por tanto llevar a cabo fermentaciones en presencia del mismo.

En la Figura 15a se presentan las fracciones viables de las cepas A y *S. cerevisiae* a las 0, 16 y 24 horas de la fermentación en medios con 100 g/L (representado como 10), 150 g/L (representado como 15) y 200 g/L (representado como 20). La Figura 15b muestra a su vez el perfil de células totales de las levaduras.

Para la cepa A se observó que a medida que aumentó la concentración de etanol en el medio, tanto la concentración de células totales, como la fracción viable de la levadura disminuyeron.

En cuanto a la concentración de células totales, en la figura 15b se observa que la misma fue superior, hasta las 16 horas, en el medio con 100 g/L de etanol, que en los medios conteniendo 150 g/L y 200 g/L del mismo. Luego de las 16 horas, la concentración de células totales en el medio de 100 g/L disminuyó hasta las concentraciones de los otros dos medios mencionados. Por otro lado, la fracción viable de células en un medio con concentraciones de etanol de 100 g/L (Figura 15a) disminuyó hasta las 16 horas y se mantuvo estable hasta las 24 horas.

En los medios con concentraciones de 150 g/L y 200 g/L de etanol, la concentración de células totales se mantuvo constante durante todo el período de la fermentación, mientras que la fracción viable de células disminuyó abruptamente de las 0 a 16 horas, alcanzando a ser cero en ambas concentraciones de etanol. Es decir que luego de las 16 horas todas las células que quedaban remanentes en el medio estaban muertas.

Por lo tanto, puede decirse que la levadura A toleró moderadamente, por 24 horas, concentraciones de 100 g/L de etanol, pero no así concentraciones mayores de etanol.

El comportamiento de *S. cerevisiae* fue similar al de la levadura A aunque con algunas variaciones. La concentración de células totales presentó un comportamiento diferente al de la cepa A, dado que se mantuvo casi constante durante toda la fermentación. Este comportamiento era más de esperar en una fermentación que el obtenido por A. Por otro lado, a diferencia de la levadura A, a concentraciones de etanol de 100 g/L la fracción de células viables de *S. cerevisiae* (Figura 15a) se mantuvo casi constante, indicando mayor tolerancia a dichas concentraciones.

Esta tolerancia no fue observada a concentraciones de 150 g/L y 200 g/L de etanol, donde al igual que A, a las 16 horas la viabilidad se hizo nula. La diferencia más significativa entre las levaduras A y *S. cerevisiae* se presentó en la viabilidad inicial a concentraciones de 150 g/L y 200 g/L, donde la viabilidad de la primera fue mucho menor a la de la segunda. Esta discrepancia entre ambas cepas fue difícil de explicar, la misma podría deberse a que la cepa A fuera más sensible a concentraciones elevadas de etanol, siendo afectada por las mismas desde el inicio.

Con respecto a la concentración de células totales en el medio conteniendo 150 g/L etanol (Figura 15b), el comportamiento fue diferente al observado en la cepa A. La concentración de células decayó significativamente de las 0 a las 16 horas y luego se mantuvo constante hasta las 24 horas. Por otro lado, en medios con 200 g/L de etanol, la concentración de células se mantuvo constante, comportamiento similar al presentado por la cepa A, pero con valores superiores a los de A.

Los resultados obtenidos por lo tanto indican que tanto la cepa comercial *S. cerevisiae*, como la levadura A presentaron tolerancia a medios con concentraciones de etanol de 100 g/L, siendo la de

ésta última un poco menor. Sin embargo, ninguna de las dos cepas presentó tolerancia a concentraciones de 150 y 200 g/L.

En la Tabla 9 y en la Figura 15c y 15d se presentan los resultados de la fermentación en los medios YPD suplementados con 100 g/L, 150 g/L y 200 g/L de etanol. En las mismas se observa que el consumo de glucosa fue mínimo para ambas levaduras en estudio a las tres concentraciones de etanol.

La producción de etanol se calculó como la concentración final de etanol menos la concentración inicial del mismo (Tabla 9). En el medio con 100 g/L de etanol, la producción de etanol fue baja tanto para A como para *S. cerevisiae*, en comparación con los resultados que se obtuvieron en fermentaciones en medios con la misma concentración de azúcares pero libres de etanol. A pesar de ello, la producción de etanol de *S. cerevisiae* fue levemente superior que en A. Parte de esta diferencia pudo haber sido causada por la evaporación del etanol en el medio de fermentación de *S. cerevisiae* al inicio de la fermentación, que ocasionó que la misma se encontrara menos inhibida. Sin embargo era de esperar que la tolerancia de *S. cerevisiae* fuera un poco mayor a la de la levadura A bajo estas condiciones dados sus mejores resultados de viabilidad celular a dichas concentraciones de etanol.

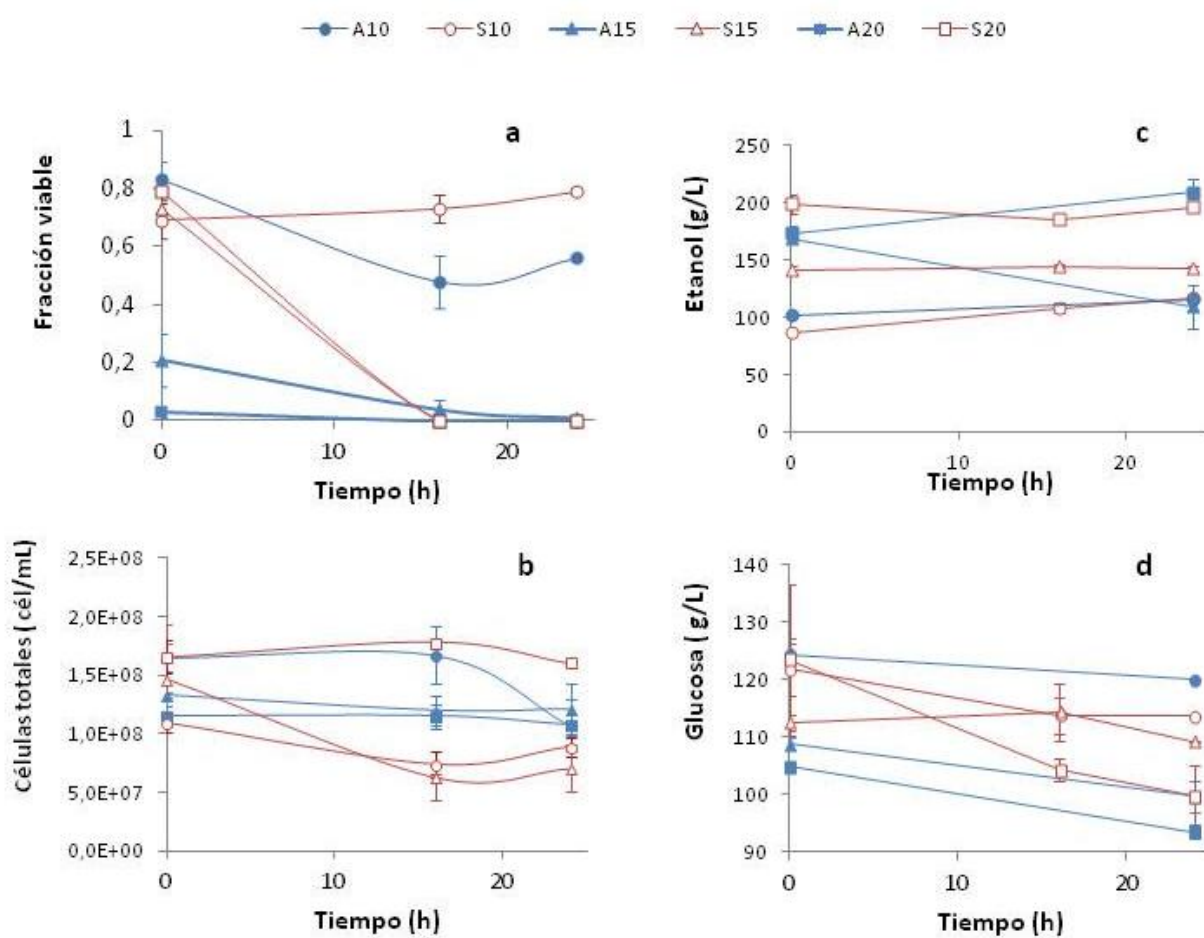


Figura 15. Perfiles de viabilidad (a), células totales (b), etanol (c) y glucosa (d) de las levaduras A (lleno) y S (vacío) en medios con diferentes concentraciones iniciales de etanol de; 100 g/L (círculo); 150 g/L (triángulo); y 200 g/L (cuadrado).

Tabla 9. Resultados del análisis a la resistencia a diferentes concentraciones de etanol de las cepas A y *S. cerevisiae*.

Muestra	Consumo de Glucosa (%)	Etanol Inicial (g/L)	Etanol Final (g/L)	Producción de etanol (g/L)
A10	3 ± 2	101 ± 2	116 ± 3	14 ± 6
S10	7 ± 3	86 ± 1	117 ± 8	31 ± 1
A15	8 ± 1	168 ± 3	109 ± 18	0
S15	3 ± 1	141 ± 4	144 ± 2	3 ± 3
A20	11 ± 1	172 ± 7	208 ± 12	36 ± 4
S20	18 ± 8	198 ± 8	187 ± 11	0

En los medios con 150 g/L de etanol ninguna de las dos levaduras produjo cantidades significativas de etanol, más aún la concentración final de etanol de la levadura A fue menor a la inicial. Este hecho se debió a la evaporación del etanol del medio y a la no producción del mismo por la levadura. Por último, a concentraciones de 200 g/L de etanol, la cepa comercial de panificación *S. cerevisiae* no produjo etanol, mientras que la levadura A tuvo una pequeña producción. Esta última fue inconsistente con el resultado de la viabilidad y no pudo justificarse por la evaporación del etanol, ya que de haberse producido esta última, la concentración inicial de etanol tendría que haber disminuido considerablemente (llegando por lo menos a 100 g/L) lo cual no hizo. Por lo tanto, se dijo que este resultado fue incoherente, ya que era de esperar que no ocurriera producción de etanol en este medio.

Uniendo los resultados obtenidos de la viabilidad de las levaduras con los de la fermentación, tanto la levadura A como la cepa comercial *S. cerevisiae* presentaron tolerancia a concentraciones de etanol de 100 g/L y produjeron en dicho medio concentraciones inferiores de etanol de la que tuvieron en un medio libre del mismo. Por lo tanto, se concluyó que la viabilidad de ambas cepas de levaduras fue poco afectada por dicha concentración de etanol, mientras que la misma tuvo un efecto inhibitorio más notorio sobre la producción de etanol.

A concentraciones de 150 g/L y 200 g/L de etanol, tanto la viabilidad como la fermentación de ambas cepas fueron inhibidas (descartando los resultados obtenidos para A20).

La resistencia al etanol se podría mejorar con la adición de fuentes de nitrógeno y vitaminas en los medios (Breisha, 2010).

4.6 ENSAYO DE FERMENTACION EN MEDIO CON 250 g/L DE GLUCOSA

En la Figura 16 se muestra los perfiles de producción de CO₂ (pérdida de masa) de las levaduras analizadas durante 72 horas de la fermentación. Estos perfiles fueron utilizados para evaluar la evolución de la fermentación ya que bajo las condiciones de oxígeno limitante en que se realizó la misma (lograda mediante el uso de Erlenmeyers con tapa rosca), la pérdida de CO₂ y la producción de etanol se encuentran relacionados dado que la mayor parte del CO₂ proviene de la fermentación (Pereira et al., 2010).

Los resultados de la fermentación así como los perfiles de glucosa, etanol y glicerol se muestran en la Tabla 10 y 11 y en las figuras 17 y 18 respectivamente.

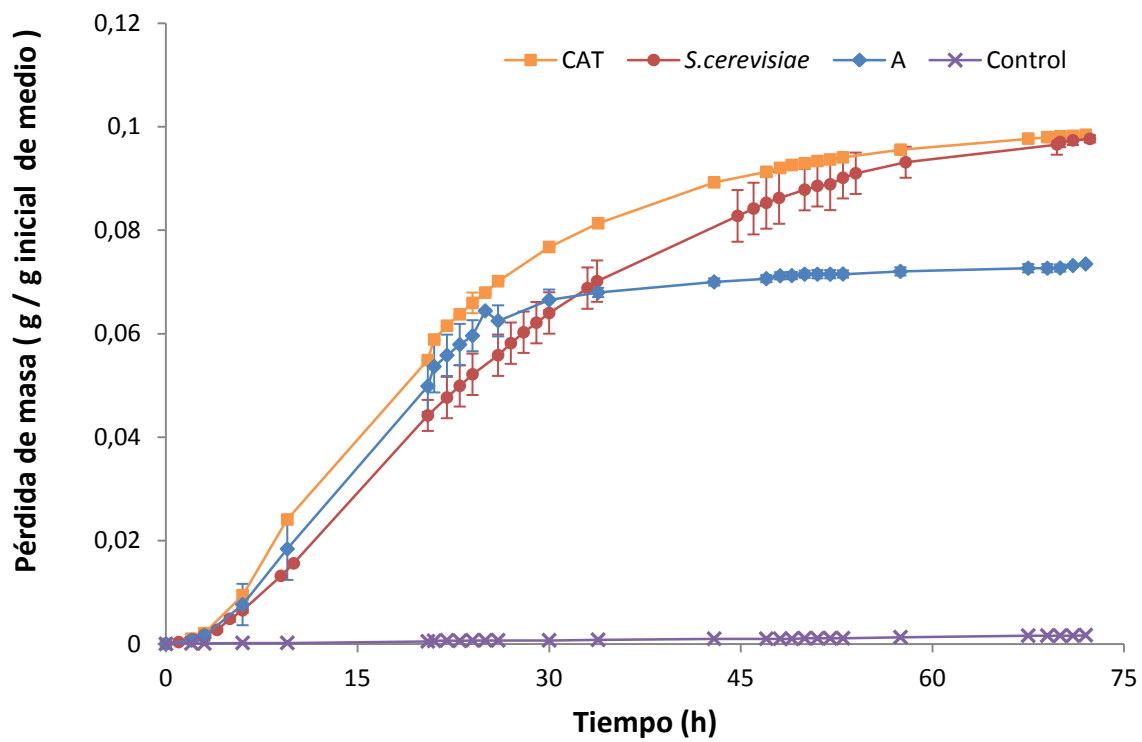


Figura 16. Perfiles de pérdida de masa (pérdida de CO₂) durante la fermentación en medio con 250 g/L para la cepa A (rombo), la cepa industrial CAT (cuadrado) y la cepa *S.cerevisiae* (círculo).

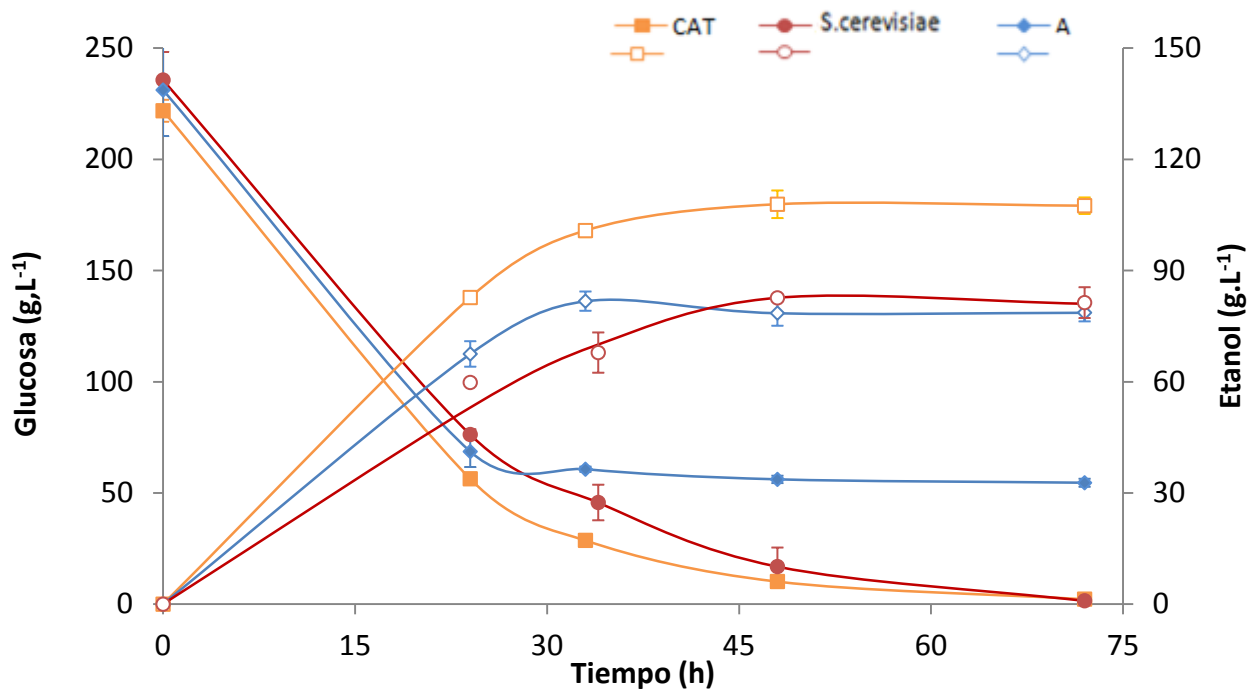


Figura 17. Perfil de glucosa (lleno) y etanol (vacío) de la cepa industrial CAT (cuadrado), la cepa comercial *S. cerevisiae* (círculo) y la cepa A (rombo) para la fermentación en medio con 250 g/L de glucosa.

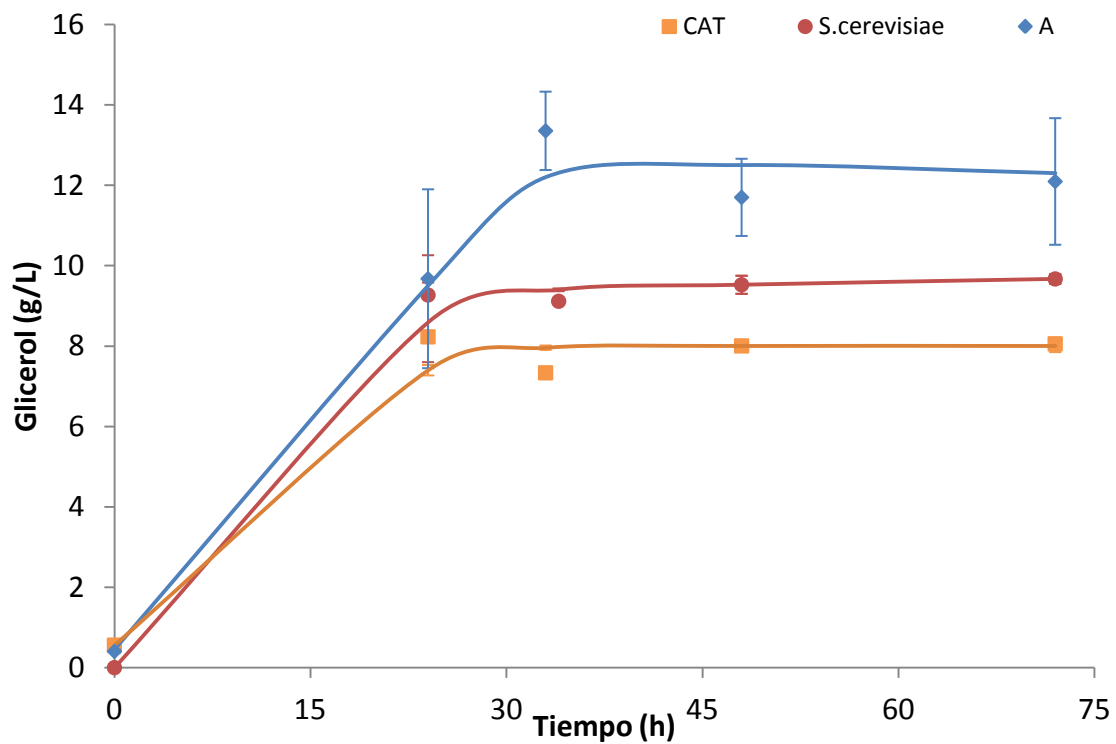


Figura 18. Perfil de producción de glicerol para la cepa A (rombo), *S. cerevisiae* (círculo) y CAT (cuadrado) en fermentación con 250 g/L de glucosa.

Tabla 10. Concentraciones de etanol y glicerol obtenidas de fermentación en medio con 250 g/L de glucosa.

Muestra	Concentración de etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
A	79 ± 2	12 ± 2
<i>S.cerevisiae</i>	81 ± 4	10 ± 2
CAT	108 ± 2	8 ± 1

Tabla 11. Resultados de la fermentación en medio con 250 g/L de glucosa.

Muestra	Consumo de glucosa (%)	Y p/s ($\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$)	Eficiencia fermentación	Q_p (g/L.h)	q_p (g/cél.h). 10^{-12}
A	76 ± 1	0.45 ± 0.03	0.68 ± 0.08	2.8 ± 0.1	29 ± 8
<i>S.cerevisiae</i>	99 ± 1	0.35 ± 0.03	0.87 ± 0.07	2.5 ± 0.1	39 ± 1
CAT	99 ± 1	0.49 ± 0.02	0.96 ± 0.04	3.5 ± 0.1	39 ± 3

Entre las levaduras analizadas, la cepa industrial CAT fue la que obtuvo mejor desempeño, presentando un consumo casi total de sustrato a las 72 horas (consumió un 99 % de la glucosa inicial) (Figura 17 y Tabla 11), una concentración final de etanol de 108 g/L y una baja producción de glicerol (8 g/L a las 72 horas) (Figura 17 y 18 y Tabla 10). Asimismo, CAT presentó la mayor productividad volumétrica (3.45 g/L.h), el mejor rendimiento de fermentación (0.49 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$) entre las levaduras (Tabla 11) y una velocidad de formación específica de producto elevada (39 x 10^{-12} g/cél.h). En el análisis estadístico CAT presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el consumo de glucosa con A y en la productividad volumétrica con A y *S. cerevisiae* (Tablas 24, 25, 28 y 29 del Anexo).

La levadura de panificación comercial *S. cerevisiae* presentó un perfil de pérdida de masa (producción de CO_2) similar al de la cepa industrial CAT. Obtuvo un consumo de glucosa del 99% luego de las 72 horas (Figura 17 y Tabla 11), una concentración final de etanol de 81 g/L y una concentración final de glicerol de 10 g/L (Figura 17 y 18 y Tabla 10). *S. cerevisiae* presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) únicamente con A en el consumo de glucosa (Tablas 24 y 25 del Anexo).

En cuanto a su productividad volumétrica, *S. cerevisiae* mostró la menor entre las levaduras (2.49 g/L.h) (Tabla 11), incluso inferior a la obtenida en la fermentación en medios con 150 g/L de glucosa (2.81 g/L.h). Sin embargo, su velocidad de formación específica de producto se vio levemente incrementada con respecto a su valor en la fermentación en medio de 150 g/L de glucosa.

Algo más a destacar es que, presentando perfiles de pérdida de masa y consumos de glucosa similares, la cepa industrial y la de panificación no presentaron concentraciones finales de etanol similares. Esto pudo haber sido ocasionado, en parte, por el mayor uso de glucosa de la cepa comercial para la producción de glicerol, ya que sus concentraciones finales de glicerol fueron superiores a las de CAT. Sin embargo observando la diferencia entre las concentraciones finales de glicerol entre ambas cepas, la misma no fue suficiente para explicar la diferencia total en la concentración de etanol. Lo remanente de la diferencia pudo haberse debido a evaporación de una parte del etanol en el medio conteniendo a la levadura de panificación *S. cerevisiae*.

La levadura en estudio A logró fermentar el medio con alta concentración de glucosa, pero su desempeño fue inferior a lo observado en las otras dos cepas; su consumo de glucosa no fue total, alcanzó el 76 %, estancándose a las 26-28 horas (Figura 17 y Tabla 11); su concentración final de etanol fue de 79 g/L y la de glicerol de 12 g/L (Figura 17 y 18 y Tabla 10). Esta última concentración fue superior al encontrado en las cepas CAT y *S. cerevisiae*.

El aumento en la concentración inicial de glucosa del medio resultó en una disminución de la eficiencia de la fermentación de la levadura A si se la compara con la obtenida en el medio con 150 g/L de glucosa inicial; pasó de 0.88 en la fermentación con 150 g/L de glucosa a 0.68 en la fermentación con 250 g/L de glucosa (Tabla 11). A pesar de la baja en este parámetros ni su productividad volumétrica, ni su velocidad específica de formación se vieron modificadas, las mismas se mantuvieron en 2.8 g/L.h y 29×10^{-12} g/cél.h respectivamente (Tabla 11). Una explicación posible para esto, fue que la levadura se comenzara a inhibir por la concentración de etanol que ella misma produjo a las 24 horas (tiempo al cual se midieron Q_p y q_p). En experimentos posteriores podría ensayarse la modificación de ciertas condiciones de la fermentación, como ser las vitaminas adicionadas, el pH del medio, la concentración de nitrógeno así como la inyección de oxígeno, para comprobar si con ellos se obtienen mejores resultados de la fermentación para la levadura A, cómo se ha probado que ocurre con otras cepas (Breisha, 2010).

5. CONCLUSIONES

Se aislaron seis cepas de levaduras a partir de fibras, tallos y jugos de sorgo dulce recolectados en Alur Bella Unión. De las seis cepas aisladas se seleccionaron tres (denominadas A, B y C) en base a su crecimiento en medio sólido YPD y en medio líquido conteniendo 50 g/L de etanol.

Se evaluó el desempeño de las cepas A, B y C en una fermentación con medios con 150 g/L de glucosa. La cepa A obtuvo un consumo de glucosa del 100 % y una concentración final de etanol de 66 g/L, mientras que la cepa B obtuvo un consumo de glucosa de 71% y una concentración de etanol de 40 g/L. La levadura C por su parte, consumió el 43 % de la glucosa y produjo 25 g/L de etanol. Dados estos resultados y que los resultados de la levadura A fueron los más similares a *S. cerevisiae* se decidió seleccionar a la misma para estudios posteriores.

El estudio de la resistencia al etanol de las levaduras A y *S. cerevisiae* en medios YPD conteniendo 100 g/L, 150 g/L y 200 g/L de etanol, permitió determinar que tanto la levadura A como *S. cerevisiae* toleraron concentraciones de etanol de 100 g/L y fueron capaces de realizar fermentaciones bajo dichas condiciones aunque obteniendo resultados inferiores a los obtenidos en medios libres de etanol. Ninguna de las dos levaduras toleró concentraciones de 150 g/L y 200 g/L de etanol, viéndose inhibida tanto su viabilidad como su producción de etanol.

En la fermentación de un medio con 250 g/L de glucosa, la levadura A logró fermentar, pero su desempeño fue inferior al observado por la levadura industrial CAT y la levadura comercial *S. cerevisiae*. No logró un consumo total de glucosa, llegando el mismo a un 76 %, su concentración final de etanol fue de 79 g/L y su eficiencia de fermentación de 0.67.

La estrategia de aislamiento utilizada permitió obtener una cepa promisorio para la producción de etanol a concentraciones de glucosa habituales en la industria. Para concentraciones mayores se deberían evaluar otras condiciones operativas y extender el aislamiento a otros materiales industriales con el fin de encontrar más cepas con características similares o mejores.

6. REFERENCIAS

Agroindustria Alur Bella Unión (2013), disponible en <http://www.alur.com.uy/bellaunion.html>.
Accedido el 06 de Febrero del 2014.

Almodares A, Hadi MR (2009). Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *Afr. J. Agric. Res.* **4** (9): 772-780.

Almodares A, Mostafafi DSM (2006). Effects of planting date and time of nitrogen application on yield and sugar content of sweet sorghum. *J. Environ. Biol.* **27**: 601-605.

Almodares A, Sepahi A, Dalilitajary H, Gavami R (1994). Effect of phenological stages on biomass and carbohydrate contents of sweet sorghum cultivars. *Ann. Plant Physiol.* **8**: 42-48.

Almodares A, Taheri R, Chung M, Fathi M (2008a). The effect of nitrogen and potassium fertilizers on growth parameters and carbohydrate content of sweet sorghum cultivars. *J. Environ. Biol.* **29**: 849-852.

Almodares A, Taheri R, Hadi MR, Fathi M (2006). The effect of nitrogen and potassium fertilizers on the growth parameters and the yield components of two sweet sorghum cultivars. *Biol. Sci.* **9** (12): 2350-2353

Almodares A, Taheri R, Safavi V (2008b). Sorghum, botany, agronomy and biotechnology, Jahad Daneshgahi of University of Isfahan, Isfahan.

ANCAP (2007). Biocombustibles, una necesidad más que una alternativa. Disponible en: <http://www.ancap.com.uy/BioCombustibles.pdf>.

Ballesteros M, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I (2003). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.* **39** (12): 1843-1848.

Bennett AS, Anex RP (2009). Production, transportation and milling costs of sweet sorghum as a feedstock for centralized bioethanol production in the upper Midwest. *Biores Technol.* **10** (4): 1595-1607.

Baquero F (1987). La industria del azúcar de remolacha. Disponible en http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2281/hd_1987_08.pdf. Accedido el 06 de Febrero del 2014.

Barbara JS (2007). The False Promise of Biofuels. Special Report from the International Forum on Globalization and the Institute for Policy Studies. Disponible en <http://www.ifg.org/pdf/biofuels.pdf>. Accedido el 19/02/2014.

Berthels RR, Otero C, Bauer FF, Thevelein JM, Pretorius IS (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* **4** (7): 683-689.

Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **8**: 1155–63.

Bastos VD (2007). Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. *BNDES Setorial.* (25): 5-38.

Biofuels Platform. ENERS Energy Concept. Production of biofuels in the world: 2010. Disponible online: <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/production.php?id=bio-ethanol>). Accedido el 15/02/2014.

BNDES, CGEE, FAO, CEPAL (2008). Bioetanol de caña de azúcar: Una energía para el desarrollo sostenible. 1^{era} ed. Brasil.

Disponible en http://www.bioetanoldecana.org/es/download/resumo_executivo.pdf. Accedido el 20/02/2014.

Biorreactores. Disponible en <http://share.pdfonline.com/9389e71528eb463e99383d96932db909/Capitulo2.pdf>. Accedido el 16/02/2014.

Birch RM, Walker GM (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* **26**: 678–687

Breisha GZ (2010). Production of 16 % ethanol from 35 % sucrose. *Biomass and Bioenergy.* **34**: 1243-1249.

Broadhead DM (1969). Sugar production from sweet sorghum as affected by planting date, after-ripe harvesting, and storage. *Agron J.* **61** : 811-812.

Cundiff and Parrish (1983). Whole-stalk sweet sorghum storage. ASABE Paper No. 83-3058. ASABE, St. Joseph, MI.

Deesuth O, Laopaiboon P, Jaisil P, Laopaiboon L (2012). Optimization of nitrogen and metal ions supplementation for very high gravity bioethanol fermentation from sweet sorghum juice using an orthogonal array design. *energies.* **5** (9): 3178-3197.

Dias MOS, Junqueira TL, Jesus CDF, Rossell CEV, Maciel Filho R, Bonomi A (2012). Improving bioethanol production- Comparison between extractive and low temperatura fermentation. Appl Ener. **28**: 548-555.

Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl Microbiol Biotechnol. **63**: 258- 266.

Dirección Nacional de Energía Planificación y Balance. Balance energético 2012, consumo final energético por fuente (2012). Disponible en www.dne.gub.uy . Accedido el 15/02/2014.

Dirección Nacional de Energía Planificación y Balance. Balance energético nacional (2011). Disponible en <http://www.miem.gub.uy/documents/15377/64382/3-BALANCE%20ENERG%C3%89TICO%202011.pdf>. Accedido el 15/02/2014.

Eiland BR, Clayton JE, Bryan WL (1983). Losses of fermentable sugars in sweet sorghum during storage. Transactions of the ASABE. **26** (5): 1596-1600.

Eiland BR, Clayton JE (1984). Storage characteristics of sweet sorghum. Transactiones of the ASAE. 84-3579. ASAE.

Elbehri A, Segerstedt A, Liu P (2013). Biofuels and the sustainability challenge: A global assessment of sustainability issues, trends and policies for biofuels and related feedstocks. Trade and Market Division, Food and Agriculture organization of the United Nations.

Entrevista a Leonardo de León, 11 de Marzo del 2013. Disponible en: <http://www.alur.com.uy/articulos/2013/p-11-3-13.html>

Fazaeli H, Golmohammadi HA, Almodares A, Mosharraf S, Shaei A (2006). Comparing the performance of sorghum silage with maize silage in feedlot calves. *Pakistan J. Biol. Sci.* **9**: 2450-2455.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008). The state of food and agriculture 2008: Biofuels, prospects, risks and opportunities. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/i0100e/i0100e00.htm>. Accedido el 15/02/2014.

Glazer AN, Nikaido H (2007). Ethanol. En: *Micorbial biotechnology, fundamental of applied microbiology*. 2nd ed. United States of America: Cambridge University Press. Capítulo 13, p 465. ISBN-13 978-0-511-34136-6.

González F, Castellanos JA, Puertas JF (2010). Método para determinar la cantidad de agua de imbibición a utilizar en la industria de azúcar de caña. *Ingeniería mecánica*. **13** (1): 41-48.

Gnansounou E, Dauriat A, Wyman CE (2005). Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource Technol.* **96** (9): 985-1002.

Guigou M, Lareo C, Perez LV, Lluiberas ME, Vazquez D, Ferrari MD (2011). Bioethanol production from sweet sorghum: Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. *Biomass Bioenerg.* **35** (7): 3058- 3062.

Guiying L, Weibin G, Hicks A, Chapman KR (2004). A training manual for sweet sorghum. Food and Agriculture of the United Nations. Disponible en <http://ecoport.org/ep?SearchType=earticleView&earticleId=172&page=2271>. Accedido el 15/05/2014.

Hernández A, Alfaro I, Arrieta R (2003). Microbiología Industrial. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 21-29. Disponible en <http://books.google.com.uy/books?id=KFq4oEQJdEC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>. Accedido el 16/02/2014.

Hernandez M, Hernandez J (2008). Verdades y mitos sobre los biocombustibles. Elementos. **71**: 15-18. Disponible en <http://www.elementos.buap.mx/num71/pdf/15.pdf>. Accedido el 19/02/2014.

Hu CK, Bai, FW, An LJ (2003). Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. Biotechnol Lett. **25**: 1191–1194.

Hunter EL, Anderson IC (1997). Sweet sorghum. Hort Rev. **21**: 73-104.

Instituto Azucarero Dominicano. Obtención de azúcar. Disponible en http://www.inazucar.gov.do/obtension_azucar.htm. Accedido el 15/2/2014.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2008). Análisis integrado de las tecnologías, el ciclo de vida y la sustentabilidad de las opciones y escenarios para el aprovechamiento de la bioenergía en México. Disponible en: http://www2.inecc.gob.mx/descargas/cclimatico/e2008e_bioenergia.pdf. Accedido el 15/02/2014.

Jacques K, Lyons TP, Kelsall DR (1999). The Alcohol Textbook. 3^{era} ed. UK: Nottingham University Press.

Jazwinski SM (1990). An experimental system for the molecular analysis of the aging process: The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Gerontol. **45**: 68-74.

Keeley JE, Rundel PW (2003). Evolution of CAM and C4 carbon-concentrating mechanisms. Int J Plant Sci. **164** (3): S55-S77.

Kim M, Day D (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. J Ind Microbiol Biotechnol. **38** (7): 803-807.

Krylova AY, Kozyukov EA, Lapidus AL (2008). Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: a review. Solid Fuel Chem. **42**: 358–364.

Kundiya DK (1996). Sorghanol: In-field production of ethanol from sweet sorghum. In: Dairy Sci. College. University of Agricultural Science Bangalore, India.

Kwiatkowski JR, McAloon AJ, Taylor F, Johnston DB (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. Ind Crop Prod. **23**: 288-296.

Lea A, Piggot JR (2003). Fermented Beverage Production. 2^{da} ed. United States of America: Kluwer Academics/ Plenum Publishers. 31-32.

Lee SS, Robison FM, Wang HY (1981). Rapid determination of yeast viability. Biotechnol Bioeng. **11**: 641-649.

Luhnow D, Samor G (2006). WSJ article: It weans off energy imports. Wall Street Journal 9. January.

Luparia V, Soubeyrand V, Bergen ST, Julien A, Salmon JM (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. Appl Microbiol Biotechnol. **65** (1): 25-32.

Mamma D, Koullas D, Fountoukidis G, Kekos D, Macris BJ, Koukios E (1996). Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. Process Biochem. **31** (4): 377-381.

Masayoshi K, Vagnoli P, Bisson LF (1998) Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentations. Am J Enol Vitic. **49** (3): 295-301.

Mortimer RK, Johnston JR (1959). Life span of individual yeast cells. Nature. **183** (4677): 1751-1752.

Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JA (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnol Adv. **28**: 817-883.

Nelson D, Cox M. Lenhinger (2001). Principios de Bioquímica. 3^{era} ed. España: Ediciones Omega. 527-546.

Nevoigt E (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. **72** (3): 379–412.

Nielsen J (2001). Metabolic engineering. Appl Microbiol Biotechnol. **55** (3):263–283.

Olivério JL, Barreira ST, Boscariol FC, César ARP, Yamakawa CK (2010). Alcoholic fermentation with temperature controlled by ecological absorption chiller- EcoChill. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol.* **27** : 1-9.

Parrish DJ, Cundiff JS (1985). Long-term retention of fermentables during aerobic storage of bulked sweet sorghum. In: *Proceedings of the 5th Annual Solar and Biomass Workshop*. Atlanta, GA.137–140.

Pereira FB, Guimaraes PMR, Teixeira JA, Domingues L (2010). Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour Technol.* **101** (20): 7856-7863.

Pereira FB, Guimaraes PMR, Teixeira JA, Domingues L (2011). Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. *J. Biosci Bioeng.* **112** (2): 130-136.

Perissatto S, Cristina F, Garcia de Almeida P, Ceccato-Antonini S (2008). Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Braz J Microbiol.* **3** (2): 337-343.

Pholsen S, Sornsungnoen N (2004). Effects of nitrogen and potassium rates and planting distances on growth, yield and fodder quality of forage sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *J Biol Sci.* **7** (10): 1793-1800.

Phowchinda O, Delia-Dupuy ML, Strehaiano P (1997). Alcoholic fermentation from sweet sorghum: some operating problems. *Proceedings of the 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and the 2nd JSPS-NRCT-DOST- LIPP-VCC Seminar on Biotechnology: An Essential Tool for Future Development*, 19-22 November 1997, Suranaree University of Technology, Thailand.

Pin M, Picco D, Vecchiet A, León O, González P, Marcos R, Tsakiridou I, Konstatinou K, D'Apote L, Daidone L, Hernando Sanz M, Curt MD, Bartsios S, Izioutzias V (2011). Sweet ethanol sustainable ethanol for the UE: Diffusion of a sustainable EU model to produce 1st generation ethanol from sweet sorghum in decentralised plants, Technical Manual. Disponible en: http://www.sseassociation.org/Publications/Sweetethanol_Technical_Final.pdf. Accedido el 20/02/2014.

Prasad S, Singh A, Jain N, Joshi HC. (2007). Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. *Energ Fuel*. **21** (4): 2415-2420.

Rego TJ, Rao VN, Seeling B, Pardhasaradhi G, Rao JVDK (2003). Nutrient balances a guide to improving sorghum and ground based dry land cropping systems in semi-arid topical India. *Field Crop Res.* **81**: 53-68.

Reisi F, Almodares A (2008). The effect of planting date on amylase content in sorghum and corn. In *Proceeding of the 3rd Int. Biol. conference* (Eds. F Reisi & A Almodares) Tehran, Iran.

Şener A, Canbaş A, Ünal, ÜM (2007). The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species. *Turk J Agric Forest.* **31**: 349–354.

Serna-Saldivar S (2010). *Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes* CRC Press. p.22.

Serna-Saldívar S, Chuck-Hernández S, Pérez-Carrillo S, Heredia-Olea E (2012). Sorghum as a Multifunctional Crop for the Production of Fuel Ethanol: Current Status and Future Trends. En: *Bioethanol*, Editor Marco Aurelio Pinheiro Lima, Capítulo 3, pp. 51-74. ISBN 978-953-51-0008-9, DOI:10.5772/20489.

Disponible online: <http://www.intechopen.com/books/bioethanol/sorghum-as-a-multifunctional-crop-for-the-production-of-fuel-ethanol-current-status-and-future-trend>.
Accedido el 17/02/2014.

Sipos B, Réczey J, Somorai Z, Kádár Z, Dienes D, Réczey K (2009). Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse. *Appl Biochem Biotechnol.* **153** (1-3): 151–162.

Smith CW, Frederiksen RA (2000). *Sorghum: Origin, history, technology, and production*. Ed. John Wiley & Sons, New York.

Stehlik-Tomas V, Zetic VG; Stanzer D, Grba S, Vahcic N (2004). Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Tech Biotechnol.* **42**(2): 115–120.

Tsialtas JT, Maslaris N (2005). Effect of N Fertilization Rate on Sugar Yield and Non-Sugar Impurities of Sugar Beets (*Beta vulgaris*) Grown Under Mediterranean Conditions. *J Agron Crop Sci.***191** (5): 330-339.

Turhollow AF, Webb EG, Downing ME (2010). Review of Sorghum Production Practices: Applications for Bioenergy. Disponible en <http://info.ornl.gov/sites/publications/files/Pub22854.pdf>. Accedido el 21/02/2014.

Wang FQ, Gao CJ, Yang CY, Xu P (2007). Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett.* **29** (2): 233–236.

Worley JW, Cundiff JS (1992). Ethanol from sweet sorghum: a comparison of four harvesting/processing systems. In: Cundiff, J.S. (Ed.), *Liquid Fuels from Renewable Resources*. ASABE, St. Joseph, MI. 40–49.

Woods J (2000). Integrating Sweet Sorghum and Sugarcane for Bioenergy: Modelling the Potential for Electricity and Ethanol Production in SE Zimbabwe. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. King's College London. University of London, UK.

Wu X, Staggenborg S, Propheter JL, Rooney WL, Yu J, Wang D (2010). Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. *Ind Crop Prod.* **31** (1): 164-170.

Zhao XQ, Xue C, Ge XM, Yuan WJ, Wang JY, Bai FW (2009). Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *J Biotechnol.* **139** (1): 55-60.

7. ANEXO

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE VARIANZA PARA DIFERENTES PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 150 g/L DE GLUCOSA

FACTOR YPS

4 GRUPOS

A, B, C, SAC

Tabla 12. Análisis de los resultados de varianza del factor YPS entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC).

Source	DF	SS	MS	F	P
Total	7	0,1133790500	0,0016097007	3,669646	0,126068
YPS	3	0,0083162639	0,0277208800		
Error	4	0,0030216407	0,0007554102		

Tabla 13. Tukey's all pair comparison entre A, B, C y *S. cerevisiae* (SAC) para el factor YPS

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
SAC vs B	0,089095	4,5843	0,1001	0,022791 - 0,20098
SAC vs A	0,047235	2,4305	0,4206	- 0,064651 - 0,15912
SAC vs C	0,026765	1,5315	0,7172	- 0,082121 - 0,14165
C vs B	0,05933	3,0528	0,2762	- 0,052556 - 0,17122
C vs A	0,01747	0,8989	0,9154	- 0,094416 - 0,12936
A vs B	0,04186	2,1539	0,5028	- 0,070026 - 0,15375

FACTOR Consumo de glucosa

4 GRUPOS

A, B, C, SAC

Tabla 14. Análisis de varianza para el consumo de glucosa entre A, B, C, *S.cerevisiae* (SAC).

Source	DF	SS	MS	F	P
Total	7	4533,1097	647,58711	215,27457	< 0,001
Consumo de glucosa	3	4505,2061	150,73540		
Error	4	27,9036	6,97591		

Tabla 15. Tukey's all pair comparison entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC) para el consumo de glucosa.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
SAC vs B	28,662000	15,3469	0,0014	17,91 - 39,414
SAC vs A	0	0	1	- 10,752 - 10, 752
SAC vs C	57,232500	30,6448	0,0001	46,481 - 67,984
C vs B	28,5705	15,2979	0,0014	17,819 - 39,322
C vs A	57,2325	30,6448	0,0001	46,481- 67,984
A vs B	28,662	15,3469	0,0014	17,91 - 39, 414

FACTOR Eficiencia de fermentación

4 GRUPOS

A, B, C, SAC

Tabla 16. Análisis de los resultados de varianza de la eficiencia de fermentación entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC).

Source	DF	SS	MS	F	P
Total	7	0,043382357	0,006197480	3,6613386	0,12106
Eficiencia de fermentación	3	0,031801388	0,010600463		
Error	4	0,011580969	0,002895242		

Tabla 17. Tukey's all pair comparison entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC) para la eficiencia de fermentación.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
SAC vs B	0,174220	4,579	0,1005	- 0,044822 - 0,39326
SAC vs A	0,092404	2,4286	0,4211	- 0,12664 - 0,31145
SAC vs C	0,058200	1,5297	0,7179	- 0,16084 - 0,27724
C vs B	28,5705	3,0493	0,2769	- 0,10302 - 0,33506
C vs A	57,2325	0,899	0,9153	- 0,18484 - 0,25325
A vs B	28,662	2,1504	0,5039	- 13723 - 0,30086

FACTOR Q_p

4 GRUPOS

A, B, C, SAC

Tabla 18. Análisis de los resultados de varianza de la productividad volumétrica entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC).

Source	DF	SS	MS	F	P
Total	7	4,541967700	0,648852530	92,415054	0,00038
Qp	3	4,477369700	1,492456600		
Error	4	0,064597986	0,016149496		

Tabla 19. Tukey's all pair comparison entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC) para la productividad volumétrica.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
SAC vs B	1,763140	12,8306	0,0028	0,63562 - 1,6703
SAC vs A	0,051700	0,5753	0,9744	- 0,46563 - 0,56903
SAC vs C	1,763140	19,6211	0,0005	1,2458 - 2,2805
C vs B	0,61019	6,7905	0,029	0,092863 - 1,1275
C vs A	1,71144	19,0457	0,0006	1,1941- 2,2288
A vs B	1,10125	12,2552	0,0034	0,58392 - 1,6186

FACTOR q_p

4 GRUPOS

A, B, C, SAC

Tabla 20. Análisis de los resultados de varianza de la velocidad específica de formación de producto entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC).

Source	DF	SS	MS	F	P
Total	7	7,7882374E-22	1,1126053E-22	40,428541	0,00189
q_p	3	7,5395800E-22	2,5131940E-22		
Error	4	2,4865542E-23	6,2163856E-24		

Tabla 21. Tukey's all pair comparison entre A, B, C y *S.cerevisiae* (SAC) para la velocidad específica de formación de producto.

SAC vs B	2,20270E-11	12,5181	0,0031	1,192E-11 - 3,2219E-11
SAC vs A	9,11300E-12	5,169	0,0701	- 1,0367E-12 - 1,9263E-11
SAC vs C	2,36095E-11	13,3916	0,0024	1,346E-11 - 3,3759E-11
C vs B	6,10190E-01	0,8735	0,9213	- 8,6097E-12 - 1,169E-11
C vs A	1,54000E-12	8,2226	0,0148	4,3468E-12 - 2,4646E-11
A vs B	1,29566E-11	7,3491	0,0221	2,8068E-12 - 2,3106 E-11

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE VARIANZA PARA DIFERENTES PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO CON 250 g/L DE GLUCOSA

FACTOR YPS

3 GRUPOS

A, SAC, CAT

Tabla 22. Análisis de los resultados de varianza del factor YPS entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT.

Total	5	0,026836031	0,005367206	5,4806839	0,09961
YPS	2	0,21069541	0,01053477		
Error	3	0,057664904	0,001922164		

Tabla 23. Tukey's all pair comparison entre A, *S. cerevisiae* (SAC) y CAT para el factor YPS.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
CAT vs SAC	0,1411	4,5514	0,09957	- 0,042107 - 0,32431
CAT vs A	0,04105	1,3241	0,6583	- 0,14216 - 0,22426
SAC vs A	0,1005	3,2273	0,2022	-0,083157 - 0,2826

FACTOR Consumo de glucosa

3 GRUPOS

A, SAC, CAT

Tabla 24. Análisis de los resultados de varianza del consumo de glucosa entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT.

Total	5	774,1299	154,82598	95,851884	0,00191
Consumo de glucosa	2	762,20208	381,10104		
Error	3	11,9278711	3,9759369		

Tabla 25. Tukey's all pair comparison entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT para el consumo de glucosa.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
CAT vs SAC	0,414001	0,2936	0,9767	- 7,9183 - 8,7464
CAT vs A	23,6995	16,8087	0,0026	15,367- 32,032
SAC vs A	24,1135	17,2024	0,0025	15,781 - 32,446

FACTOR Eficiencia de fermentación

3 GRUPOS

A, SAC, CAT

Tabla 26. Análisis de los resultados de varianza de la eficiencia de fermentación entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT.

Total	5	0,10259558	0,020519116	5,4787408	0,09965
Eficiencia fermentación	2	0,08054384	0,04027192		
Error	3	0,022051739	0,00735058		

Tabla 27. Tukey's all pair comparison entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT para la eficiencia de fermentación.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
CAT vs SAC	0,27585	4,5502	0,0958	- 0,082418 - 0,63412
CAT vs A	0,08015	1,3221	0,659	- 0,27812- 0,43842
SAC vs A	0,1957	3,2281	0,2021	- 0,16257 - 0,55397

FACTOR Q_p

3 GRUPOS

A, SAC, CAT

Tabla 28. Análisis de los resultados de varianza de la productividad volumétrica entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT.

Total	5	0,98651124	0,19730225	33,292534	0,00895
Qp	2	0,94398008	0,47199004		
Error	3	0,042531161	0,014177054		

Tabla 29. Tukey's all pair comparison entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT de la productividad volumétrica

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
CAT vs SAC	0,9546	11,3382	0,0083	0,45705- 1,4522
CAT vs A	0,63395	7,5297	0,0262	0,1364- 1,1315
SAC vs A	0,32065	3,8085	0,1435	- 0,1769- 0,8182

FACTOR q_p

3 GRUPOS

A, SAC, CAT

Tabla 30. Análisis de los resultados de varianza de la velocidad específica de formación de producto entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT.

Source	DF	SS	MS	F	P
Total	5	7,4131759E-22	1,4826356E-22	0,49138315	0,65374
q_p	2	1,8292260E-22	9,1461799E-23		
Error	3	5,5839399E-22	1,8613133E-22		

Tabla 31. Tukey's all pair comparison entre A, *S.cerevisiae* (SAC) y CAT de la velocidad específica de formación de producto.

Comparison	Mean difference	q	P	95 % CI
CAT vs SAC	2,4905E-12	0,3048	0,9749	- 5,47E-11 - 5,9951E-11
CAT vs A	9,9625E-12	1,0327	0,7649	- 4,7048E-11 - 6,6973E-11
SAC vs A	1,2903E-11	1,3375	0,6534	- 4,4108E-11 - 6,9914E-11