

SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE VINAZA

Angie Lizeth Basante Velasco & Yuli Marcela Zúñiga López

Director
Mauricio Ramírez Castrillón MSc., PhD.
Codirector
Yesid Fabián Zambrano Salgado PhD.

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2021

SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE VINAZA

Angie Lizeth Basante Velasco & Yuli Marcela Zúñiga López

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbióloga**

Director
Mauricio Ramírez Castrillón MSc., PhD.
Codirector
Yesid Fabián Zambrano Salgado PhD.

Línea de Investigación:
Biotecnología
Grupo de Investigación:
Micología (GIM)

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2021

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Alternativas bajo en costos para la obtención de etanol, a partir de una cepa <i>S. cerevisiae</i> nativa, adaptada a los compuestos volátiles y contaminantes presentes en la vinaza	Industrias azucareras enfocadas en la elaboración del azúcar y etanol de diferentes materias primas
Responsabilidad social	Nuevas dinámicas en los procesos productivos con el fin de implementar labores de tratamiento tecnológico y disposición de residuos, con el objetivo de preservar y/o conservar los ecosistemas.	Fortalecimiento de la relación de la empresa con sus grupos de interés y disminución del impacto ambiental a consecuencia de sus actividades
Científico	Artículo científico basado en la producción de bioetanol con levaduras en medios sintéticos	Organizaciones científicas interesados en el aprovechamiento de subproductos industriales
Ambiental	Obtención de un medio de cultivo para siembra de levaduras fermentadoras resistentes a diferentes grupos de inhibidores.	Los ingenios azucareros, organizaciones científicas y los laboratorios de microbiología enfocados en la industria.

SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE VINAZA

Angie Lizeth Basante Velasco¹, Yuli Marcela Zúñiga López¹, Yesid Fabián Zambrano Salgado² y Mauricio Ramírez Castrillón¹

¹Grupo de investigación en Micología (GIM), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

²Línea de Investigación en producción de biocombustibles, simulación de procesos industriales y, Bioprocesos. Facultad de Ingeniería, Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

RESUMEN

La vinaza proviene de la destilación del material fermentado en la producción de etanol. Parte de la vinaza se recircula para el tanque de fermentación disminuyendo el consumo de agua y costos de producción, sin embargo, a su vez inhibe el crecimiento de la levadura. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue seleccionar una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* tolerante a vinaza diluida con fines de producción de etanol. Se evaluaron 23 cepas de *Saccharomyces* spp., las cuales fueron reactivadas de la micoteca USC, incluyendo una cepa industrial y cepas de referencia como controles. Se diseñó un medio de vinaza suplementado con Miel B, determinando la concentración de azúcares reductores totales y la acidez volátil, realizando fermentaciones bajo condiciones de restricción de oxígeno, temperatura ambiente y agitación constante. Tres cepas de *S. cerevisiae* fueron preseleccionadas por su capacidad productora de alcohol en medio sintético, aunque solo fue evaluada para experimentos posteriores la cepa LC010-A. Las concentraciones de alcohol fueron 6,7% v/v para *S. cerevisiae* LC010-A y 4,5% v/v para *S. cerevisiae* NCYC 660 (código interno RNC.1). Las cepas de levaduras por lo general son tolerantes a los componentes tóxicos de la vinaza, cuando los niveles de estos ácidos son menores a 3000 ppm aproximadamente, ya que si se supera este rango conlleva a bajos rendimientos, e incluso la inactivación de la levadura. Por tanto, estas levaduras, especialmente *S. cerevisiae* LC010-A, mostró tolerancia fermentando sustratos que contienen vinaza e inhibidores, resaltando el potencial uso de las cepas nativas del Valle del Cauca.

Palabras clave: Fermentación, acidez volátil, levaduras nativas, resistencia al estrés, medio de cultivo de vinaza con miel B.

SELECTION OF A NATIVE STRAIN OF *Saccharomyces cerevisiae* FOR THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM VINASSE

ABSTRACT

Vinasse comes from the distillation of fermented material in the production of ethanol. Part of the vinasse is recirculated for the fermentation tank decreasing water consumption and production costs, however, in turn it inhibits the growth of yeast. Therefore, the objective of this study was to select a native strain of *Saccharomyces cerevisiae* tolerant to diluted vinasse for ethanol production purposes. 23 strains of *Saccharomyces* spp. were evaluated, which were reactivated from the USC mycotheca, including an industrial strain and reference strains as controls. A vinasse medium supplemented with Honey B was designed, determining the concentration of total reducing sugars and volatile acidity, performing fermentations under conditions of oxygen restriction, ambient temperature and constant agitation. Three strains of *S. cerevisiae* were preselected for their alcohol-producing capacity in synthetic medium, although only the LC010-A strain was evaluated for further experiments. Alcohol concentrations were 6.7% v/v for *S. cerevisiae* LC010-A and 4.5% v/v for *S. cerevisiae* NCYC 660 (internal code RNC.1). Yeast strains are usually tolerant to the toxic components of vinasse, when the levels of these acids are less than 3000 ppm approximately, since if this range is exceeded it leads to low yields, and even the inactivation of the yeast. Therefore, these yeasts, especially *S. cerevisiae* LC010-A, showed tolerance by fermenting substrates containing vinasse and inhibitors, highlighting the potential use of strains native to Valle del Cauca.

Keywords: Fermentation, volatile acidity, native yeasts, stress resistance, vinasse culture medium with honey B.

1. INTRODUCCIÓN

La levadura se define como aquellos hongos cuyo crecimiento asexual es ocasionado principalmente por brotes o fisión y no forman su estado sexual sobre un cuerpo fructífero. No existe una distinción precisa entre la levadura y los hongos filamentosos dimórficos que generalmente producen grandes cantidades de crecimiento similar a la levadura. Para las levaduras ascomicetas o basidiomicetas, esta distinción está respaldada por comparaciones moleculares [1]. Las levaduras son microorganismos eucariotas con una enorme diversidad en forma, tamaño y color [2]. Los componentes macromoleculares de las levaduras contienen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos. Su pared celular está compuesta por polisacáridos (80-90 %) especialmente glucanos y mananos y en menor cantidad está la quitina, entre otros componentes como proteínas y lípidos. Generalmente crecen en ambientes ácidos, aunque toleran un rango de pH entre 3 a 10. Las levaduras que más se tienen en cuenta para su estudio son *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Y. lipolytica* y *Kluyveromyces fragilis*, ya que estas especies son consideradas microorganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) para el consumo humano dando a conocer su uso como aditivo alimentario [2].

Saccharomyces cerevisiae es conocido en la elaboración de alimentos y en la producción de etanol por medio de fermentación [3]. Su nombre procede del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo), *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura heterótrofa y su fuente de energía la obtiene de la glucosa, la cual tiene una capacidad ideal de fermentación y producción de etanol [2]. De hecho, sus parámetros fermentativos la resaltan como óptima para su desarrollo industrial. Por ejemplo, los primeros microorganismos utilizados como fuente de proteína unicelular (SCP, Single Cell Protein) fue *S. cerevisiae*, con una producción de 200.000 toneladas anuales de peso seco. *S. cerevisiae* es la levadura que se ha utilizado con mayor frecuencia a través de los años por el hombre que al principio, no se tenía un conocimiento de que esta levadura podría otorgar una variedad de usos para la elaboración de alimentos, tales como; el pan y las bebidas alcohólicas [2].

En el proceso de elaboración de etanol de la caña de azúcar en territorio colombiano, se ha consolidado como una de las actividades agropecuaria más relevantes, entre las cuales se encuentran los cultivos de maíz, algodón, del sorgo, entre otras; siendo así de gran importancia entre las actividades industriales y comerciales [4, 5]. Debido al aumento de la demanda de energía y agotamiento de los recursos energéticos naturales, surge la búsqueda de alternativas que aumenten la producción de biocombustibles que ayuden a mitigar el uso de combustibles fósiles y a reducir en gran medida las emisiones de gases de efecto invernadero. Por lo tanto, el desarrollo de fuentes de energía renovables como el alcohol combustible a partir de fermentaciones y aprovechamiento de efluentes es fundamental para ofrecer alternativas de su uso y así mismo mitigar el impacto ambiental [3, 6, 7]. En la mayoría de las destilerías colombianas, el alcohol combustible se produce mediante la aplicación de varias etapas, una de ellas es la destilación del mosto resultante de la fermentación de jugos o mieles de caña de azúcar, obteniendo un subproducto líquido con pH ácido y con alto contenido de materia orgánica, denominado vinaza [4]. La composición de la vinaza depende en gran medida de la materia prima y de las condiciones de fermentación y destilación aplicadas, que si no se trata adecuadamente podría convertirse en una de las varias preocupaciones ambientales por ser altamente contaminante [8].

La vinaza es proveniente de la fermentación de las melazas de caña de azúcar y se obtiene en la etapa de destilación del material fermentado, siendo el residuo orgánico de la obtención de alcohol. Tiene un color café, con un olor dulce y un pH bajo (3,8-5,5) [6]. La vinaza tiene un alto contenido de materia orgánica en una proporción de (4 a 12 g/g), minerales, nutrientes como: azufre, nitrógeno, fósforo, potasio, alcoholes, aldehídos y ácidos grasos que contienen compuestos fenólicos recalcitrantes que afectan la producción de etanol y el crecimiento microbiano. Sin embargo, estos compuestos pueden ser utilizados como nutrientes para las plantas. Por ejemplo, la industria azucarera Manuelita S.A. ya emplea la vinaza como biofertilizantes iniciando la distribución de vinaza en polvo, invirtiendo COP \$26 mil millones en la planta de secado de vinaza en el Valle del Cauca, con capacidad anual de 20.000 toneladas [9]. Proyectos de innovación tecnológica como esta, son los que dan alternativas al aprovechamiento del subproducto de la elaboración de bioetanol de caña de azúcar, ya que al ser almacenado a grandes cantidades es tóxico para el medio ambiente y que puede ser corrosiva por presentar un pH ácido de 4,9 y 5,4, el cual no es recomendable almacenar en recipientes metálicos y por el contrario es mejor almacenarlo en recipientes plásticos o hecho de concreto [7].

El principal efluente del proceso de la fermentación y obtención de etanol es la vinaza, en una proporción de recolección entre 8 a 15 L por cada L de alcohol, esta proporción puede variar según la industria azucarera y la

tecnología aplicada [10, 4]. En la composición de este subproducto prevalecen los compuestos volátiles y no volátiles provenientes del caldo de fermentación, tales como: los compuestos fenólicos y azúcares residuales [5]. Un ejemplo de contaminación ambiental provocada por la vinaza en el Valle del Cauca, fue hace 30 años en donde una licorera vertió sus vinazas de 80°C a las aguas de los ríos, alterando el sistema ecológico y que a su vez inició la búsqueda de alternativas de aprovechamiento de este efluente [5, 6, 7].

El alto contenido de materia orgánica presente en las vinazas aumenta la turbidez de las aguas, estos sólidos en suspensión están acompañados de las melanoidinas (polímeros coloreados complejos), generando una barrera que impide el paso de luz solar y así mismo la reducción de la actividad fotosintética; en los suelos se inhibe la capacidad de germinación y pérdida de alcalinidad. Tales impactos se asocian a la elevada concentración de minerales, que a su vez, conduce ya sea a una salinización que aumenta la presión osmótica; y cuando esta es mayor a la presión de la célula vegetal puede generar un estrés hídrico; por otra parte, una sobrecarga orgánica fomenta la obstrucción de los poros de los suelos, la reducción de la actividad microbiana y del oxígeno disuelto, también provoca alteraciones en el potencial de oxido-reductor del agua; lo cual afecta la solubilidad, reactividad y toxicidad de especies químicas presentes [6, 11, 45]. Por estas razones se buscaron alternativas tecnológicas como la recirculación de la vinaza que contribuye al ahorro del agua para la dilución de la miel y en la reducción de la vinaza generada, tal rango de disminución va a depender de los componentes de la vinaza y de la tecnología empleada de la industria [12, 5]. Los niveles de recirculación iniciales en los ingenios azucareros eran superiores al 60% del efluente, pero estudios evidenciaron que causaba un porcentaje de acumulación muy alta de los inhibidores del metabolismo (compuestos volátiles), por lo cual, esta metodología se aplica en algunas destilerías hasta un máximo de 44% de recirculación de los efluentes [12, 5].

En la actualidad se han realizado estudios de cinética para la producción de etanol utilizando la levadura *S. cerevisiae*, donde se han registrado valores de 0,505 g/g a las 24 h, partiendo de 100 g/L con un rendimiento del 97,2% del máximo rendimiento teórico esperado de (0,511 g/g), evidenciando la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* [13]. Los ingenios hoy en día, se centran en utilizar melazas como sustratos de fermentación ya que se focalizan en la producción de azúcar y el aprovechamiento de las melazas, como consecuencia se buscan alternativas al agotamiento de la concentración de azúcares presente en la melaza, enfocando investigaciones en el efluente de la destilación [14]. Por tanto, la búsqueda de cepas nativas con capacidades de producir etanol, incluso en condiciones desfavorables es fundamental. El objetivo de este estudio fue seleccionar una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* tolerante a vinaza diluida con fines de producción de etanol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Origen de la vinaza y su manipulación en laboratorio

La vinaza diluida proviene de la columna mostera, donde se destila el vino que se origina de la fermentación. Esta vinaza se obtuvo del fondo de dicha columna a una concentración que varía entre 12% y 16% p/v de un ingenio azucarero del Valle del Cauca. Para analizar la vinaza, se procedió a separarla en envases plásticos de 250 mL, para facilitar el almacenamiento y manejo de esta, homogeneizando bien antes de separar, debido a la sedimentación de los sólidos insolubles. Los envases con vinaza se congelaron a -20°C para evitar degradación de componentes necesarios para posteriores experimentos. Antes de implementar la vinaza como medio principal del crecimiento de las levaduras, se realizó la filtración en un embudo Büchner conectado a una bomba al vacío en un Erlenmeyer estéril, para así determinar los sólidos totales (ver sección 2.2) y el líquido filtrado se almacenó a -20°C en frascos de plásticos tapa rosca, para determinar la acidez volátil ppm, (ver sección 2.3) y emplear la vinaza filtrada como medio principal del crecimiento (Ver sección 2.6.2). Otro parámetro determinado fueron los azúcares reductores totales (g/L), valor necesario para evaluar la calidad de la muestra.

2.2 Determinación de sólidos Totales de la vinaza y Miel B

Se registró el peso de un balón aforado vacío de 100 mL, vertiendo la vinaza homogenizada en el balón hasta alcanzar el aforo, pesando y registrando el dato para determinar la densidad de la vinaza. Se pesó un papel filtro cualitativo de 11 µm, se filtró al vacío los 100 mL de vinaza anteriormente pesado en el balón, una vez filtrado se procedió a dejar el filtro con la muestra en el horno a 70°C por 24 horas, transcurrido el tiempo se pesó y restó el peso del papel cualitativo, obteniendo los sólidos insolubles en % (g/g) aplicando la ecuación (1) [15]. Se transfirió a un balón de fondo plano de 250 mL, la vinaza filtrada de la anterior metodología, acoplado así el balón al equipo

(Hei-VAP rotary evaporator, Heidolph) para rotaevaporar la muestra. Se ajustó el equipo a 60°C y 70 rpm, agregando un agente evaporador como el etanol, para facilitar la evaporación del agua; una vez se evaporó todo el líquido se dejó en el horno a 70°C por 4 días retirando la totalidad de la humedad, por último, se pesó y restó el peso del balón, obteniendo así el % (g/g) de los sólidos solubles aplicando la ecuación (2) en 100 mL de vinaza [15]. Se omitió la separación en envases de plástico y la determinación de sólidos totales para la miel B, la cual no requirió condiciones de congelación y se mantuvo en un lugar fresco, en oscuridad a 20 °C.

$$\text{Sólidos insolubles: } \frac{M_{si}}{M_{vz}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

- **M_{si}**: Masa de sólidos insolubles
- **M_{vz}**: Masa vinaza

$$\text{Sólidos solubles: } \frac{M_{ss}}{M_{vz}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

- **M_{ss}**: Masa de sólidos solubles
- **M_{vz}**: Masa vinaza

2.3. Determinación de ácidos volátiles

En un balón aforado de fondo plano de 1 L, se depositaron 100 mL de vinaza, agregando 200 mL de H₂SO₄ al 1% v/v, completando así 300 mL. Se procedió a homogeneizar y destilar los 300 mL hasta obtener 200 mL de la muestra condensada [4].

Una vez se obtuvo los 200 mL del destilado, se agregó 5 gotas de fenolftaleína y se procedió a titular con NaOH 0.1 N hasta un viraje de color rosa pálido que se mantenga por 60 segundos. Se anotó el volumen gastado aplicando la ecuación (3).

$$\text{Acidez volátil} = (V_t - V_{tB}) * 171,4 \quad (3)$$

Donde:

- **V_t**: Volumen gastado con la muestra
- **V_{tB}**: Volumen gastado por el blanco

2.4 Medición de azúcares reductores

Para la medición de los azúcares reductores de las muestras de caldo de cultivo se empleó el método DNS, el cual se basa en utilizar dos soluciones (A y B). La solución A se preparó diluyendo 150 g de tartrato de sodio y potasio NaK(COO)₂(CHOH)₂.4H₂O (PanReac AppliChem) en 250 mL de agua destilada, se agitó y se mantuvo la solución en calentamiento hasta obtener una solución translúcida. La solución B se preparó pesando 19,9985 g de NaOH (Merck) y 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (PanReac AppliChem) en 100 mL de agua destilada, que mediante calor y agitación constante se disolvieron los grumos obteniendo una solución homogénea, completando con agua destilada hasta 250 mL. Se mezclaron las soluciones A y B en un frasco de vidrio color ámbar con tapa rosca, protegiéndolo de la luz con papel aluminio.

Para determinar la curva de calibración se realizó una solución patrón de glucosa anhidra (PanReac AppliChem) a una concentración de 0.01 M en 50 mL, se realizó diluciones seriadas, tomando de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 mL de la solución patrón, cada uno se depositó en tubos de ensayo separados y se aforó con 10 mL de agua destilada. Se envolvieron los tubos con papel aluminio, para evitar la degradación del DNS. Una vez se realizaron los estándares, se transfirió 1 mL de cada concentración a un tubo de ensayo vacío, e inmediatamente se añadió 1 mL de DNS. Se calentaron los tubos en baño maría y se llevó a ebullición por 5 minutos, transcurrido el tiempo se

transfirió a baño de hielo. A cada uno de los tubos se le añadió 2 mL de agua destilada y se homogeneizó en vortex (Boeco V1 Plus) [16, 17]. La medición de la absorbancia fue a 540 nm, tomando como 0 la solución (blanco) construyendo la curva de calibración y la ecuación de la recta (Anexo 1) para poder determinar la concentración de glucosa [16, 17].

Determinar la concentración de glucosa presente en las muestras, se llevó a cabo en tubos de ensayo en los cuales se vertió el 1 mL de muestra y se agregó 1 mL de solución de DNS y se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito en la curva de calibración. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro Genesys 20 (ThermoScientific) a 540 nm, reemplazando el valor obtenido en la ecuación de la curva patrón, determinando así la concentración de glucosa presente en la muestra [16, 17]. Por otra parte, se consideró azúcares fermentables a la sacarosa, compuesta en glucosa y fructosa fermentadas por la levadura para producir etanol [24].

2.5 Levaduras evaluadas de la Micoteca USC

Los ensayos se realizaron con el medio de cultivo sintético, tanto en caldo como en agar, GYP (extracto de levadura 0,5% p/v, peptona 1% p/v, glucosa 2% p/v y agar 2% p/v). Se reactivaron un total de 10 cepas identificadas en anteriores trabajos como *Saccharomyces* spp. [18, 19]. También, fueron utilizadas tres cepas de referencia y 10 cepas híbridas, donadas por el biólogo Felipe Niño (Universidad del Valle), totalizando 23 levaduras evaluadas. Todas las levaduras fueron conservadas en aceite mineral y crio conservación, donde se realizó siembra por agotamiento en agar GYP incubando a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas evaluadas en este estudio.

CEPA	Fuente de aislamiento	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> LE013, LC010, LC010-A, LC009	Lagos artificiales de la Universidad del Valle	[18]
<i>S. cerevisiae</i> MT3, MT21, PF9, PF10, PF1	Fermentación de la chicha a partir de diferentes sustratos (Maíz y Piña) en Colombia	[19]
<i>S. cerevisiae</i> RNC (Ricardo Niño Castañeda)	Tanque de fermentación	Este estudio. Cepas donadas por Felipe Niño
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>S. cerevisiae</i> CECT 1352 (H1)	Híbridos ejecutados en laboratorio entre cepa industrial de <i>S. cerevisiae</i> y cepas de referencia, para asimilación de melazas, jugo de caña y jugos azucarados	
Híbrido <i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 1325 (H2)		
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>S. cerevisiae</i> CECT 1352 x <i>D. hansenii</i> CBS 1325 (H3)		
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>Schwanniomyces Occidentalis</i> NCYC 1519 (H4)	Híbridos ejecutados en laboratorio para asimilación de amilolíticas, enfoque de sacarificación y fermentación simultánea	
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>Lipomyces starkeyi</i> CBS 1809 (H6)	Híbridos ejecutados en laboratorio para asimilación de Insulina	
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>K. marxianus</i> CBS 1809 (H7)		
<i>K. marxianus</i> CBS 745 x <i>S. cerevisiae</i> CECT 1685 (H10)		
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>S. cerevisiae</i> NCYC 73 (H8)		
<i>S. cerevisiae</i> RNC x <i>S. cerevisiae</i> CECT 1685 (H9)		

<i>S. cerevisiae</i> NCYC 73 x <i>S. cerevisiae</i> CECT 1685 (H11)	Híbridos ejecutados en laboratorio para asimilación de Melaza	
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 660 (RNC.1)	Cepa de referencia National Collection of Yeast Cultures	[20]
<i>S. cerevisiae</i> CECT 1685	Cepa de referencia Colección Española de Cultivos Tipo	[21]
<i>S. kluyveri</i> CBS 4800	Cepa de referencia Westerdijk Fungal Biodiversity Institute	[22]

2.6 Fermentación en medio sintético

La concentración inicial de levadura para las fermentaciones se estandarizó a 1×10^7 cel/mL a partir de la ecuación (4), utilizando cámara de Neubauer, para la inoculación en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de caldo GYP estéril. Cada experimento fue realizado por triplicado biológico.

$$\text{Concentración celular } \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Total de células contadas} \times 5}{10^{-4} \text{ mL}} * Fd \quad (4)$$

Donde:

- **Fd:** Factor de dilución.
- Una vez contadas el total de células, se realizó la estimación del número de células en un cuadrante de 0.1 mm^3 , convirtiendo a 10^{-4} mL .

Se procedió a colocar los Erlenmeyers en el agitador orbital (PSU-15i Boeco, Germany) durante 48 horas a 150 rpm en condiciones de restricción de oxígeno (un tapón de algodón en la boca del erlenmeyer, lo suficientemente ajustado y cubierto de aluminio para evitar la contaminación al medio). Posteriormente, se transfirió el cultivo a tubos de fondo cónico (previamente pesado), se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y terminado el proceso se separó el sobrenadante de la biomasa. El tubo con el precipitado se secó en horno a 70°C durante 48 horas y se registró el peso para la determinación de la biomasa total (Figura 1). Los tubos cónicos con el precipitado dejados en el horno se pesaron y restaron los pesos de los tubos cónicos vacíos, después de evaluar las 23 cepas de *Saccharomyces* spp. que se utilizaron de la micoteca de la Universidad Santiago de Cali, se procedió a seleccionar las cepas en las que se obtuvo una concentración alta de alcohol y un mejor rendimiento desde el punto de vista de la producción industrial (Figura 1).

El sobrenadante se separó en tubos de microcentrífuga de 1 mL y se analizó por el método de Winnick [43] se preparó las siguientes soluciones: Ácido sulfúrico 10 N (Merck) con agua destilada hasta 500 mL, se pesaron 19,614 g de dicromato de potasio 0,4 N (Fisher Scientific) y se disolvieron en los 500 mL de ácido sulfúrico 10 N hasta completar 1 L. Yoduro de potasio 3 N (Merck) en 100 mL. Almidón soluble en 200 mL. Tiosulfato de sodio 0,1 N (Merck) en 1 L. Se realizó una curva patrón en tubos de ensayo con tapa que contenían 5 mL de las siguientes concentraciones 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14% de etanol $\geq 99,8\%$ (Honeywell). Se realizaron diluciones 1:9 a cada concentración y a las muestras finales de la fermentación, adicionando 1 mL de la solución de Dicromato de potasio 0,4 N (Fisher Scientific) en ácido sulfúrico 10 N (Merck), en un vaso de precipitado pequeño de 50 mL y 2 mL de la solución a estudiar, dejando en reposo por 5 min. Transcurrido el tiempo, se agregó 1 mL de la solución de yoduro de potasio 3 N y 2 gotas de la solución almidón soluble (Scharlau), titulando con solución volumétrica de Tiosulfato de sodio 0,1 N (Merck) con agitación hasta obtener un cambio nítido hacia un color azul marino. Restando el volumen de Tiosulfato gastado por el blanco al momento de construir la curva de calibración (Anexo 2, 3) (Figura 1, 3).

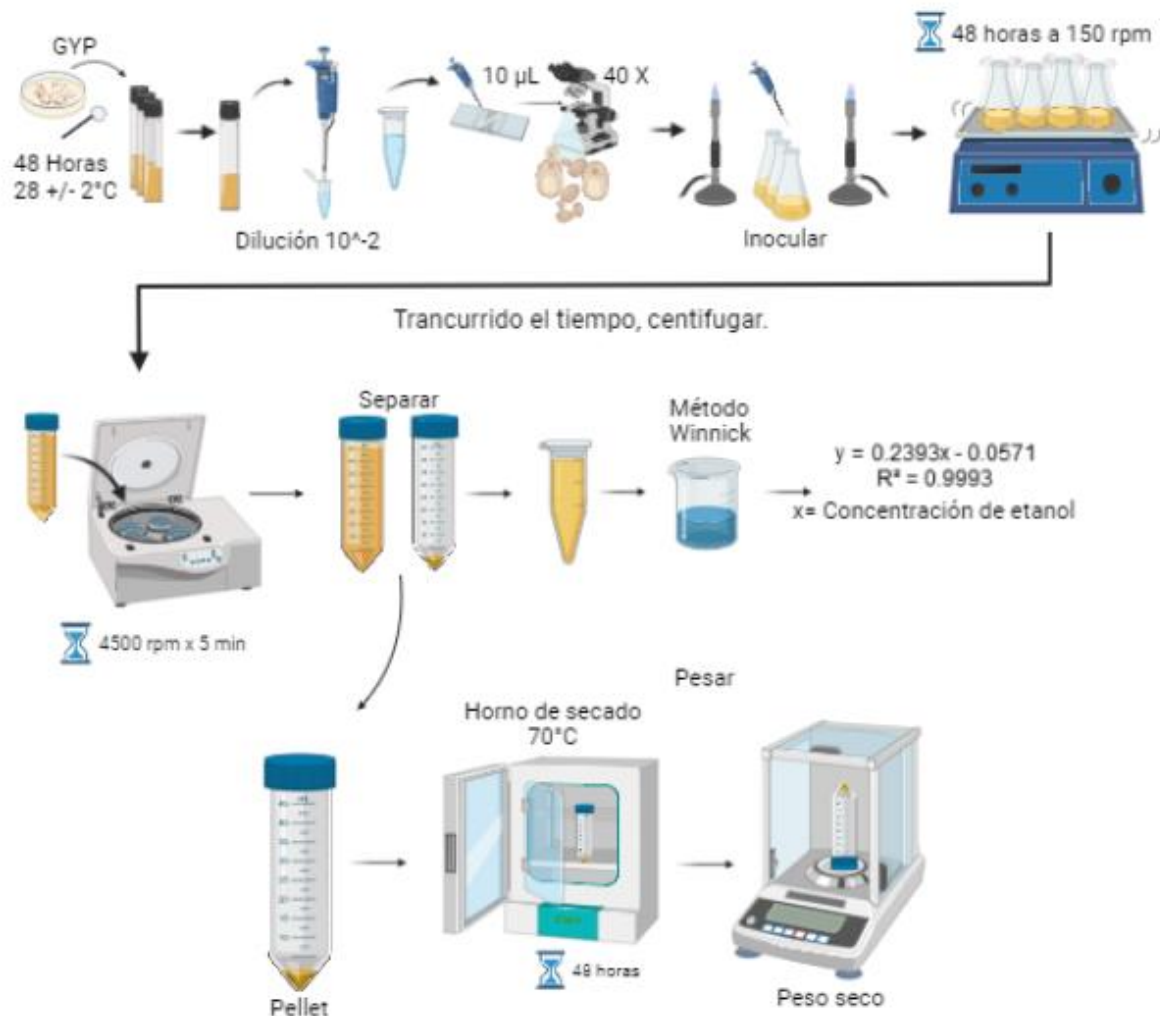


Figura 1. Metodología para evaluar parámetros de producción de etanol por fermentación en medio sintético GYP.

2.6.1 Determinación de curva de crecimiento

Para la preparación del inóculo se seleccionaron las cepas con la concentración de etanol mayor y/o cercanos a la cepa aislada de un tanque de fermentación (RNC.0) por el método de Winnick [43]. Fueron inoculados los tubos de ensayo con tres asadas de colonias en 5 mL de caldo GYP, se incubaron por 48 horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ajustando la concentración de cada cepa a $1,65 \cdot 10^8$ cel/mL.

La cinética de crecimiento se realizó por triplicado con 250 mL de caldo GYP (extracto de levadura 0,5% p/v, peptona 1% p/v y glucosa 2% p/v). Los Erlenmeyer fueron inoculados con un volumen de 1,51 µL a partir del caldo previamente mencionado (tubo de ensayo con 5 mL).

Se procedió a colocar los Erlenmeyer inoculados en el agitador orbital (PSU-15i Boeco, Germany) durante 48 horas a 150 rpm a temperatura ambiente. Se sacaron muestras de 1 mL del caldo cada hora (por duplicado) a las cuales se les calculó la concentración celular en cél/mL y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific). Se dejó un tubo con caldo GYP para el blanco del espectrofotómetro. Los tubos fueron conservados a -20°C hasta su análisis del DNS [16, 17] (Figura 2). A partir de la biomasa obtenida durante la cinética, se estimaron la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y el tiempo de duplicación (Tg).

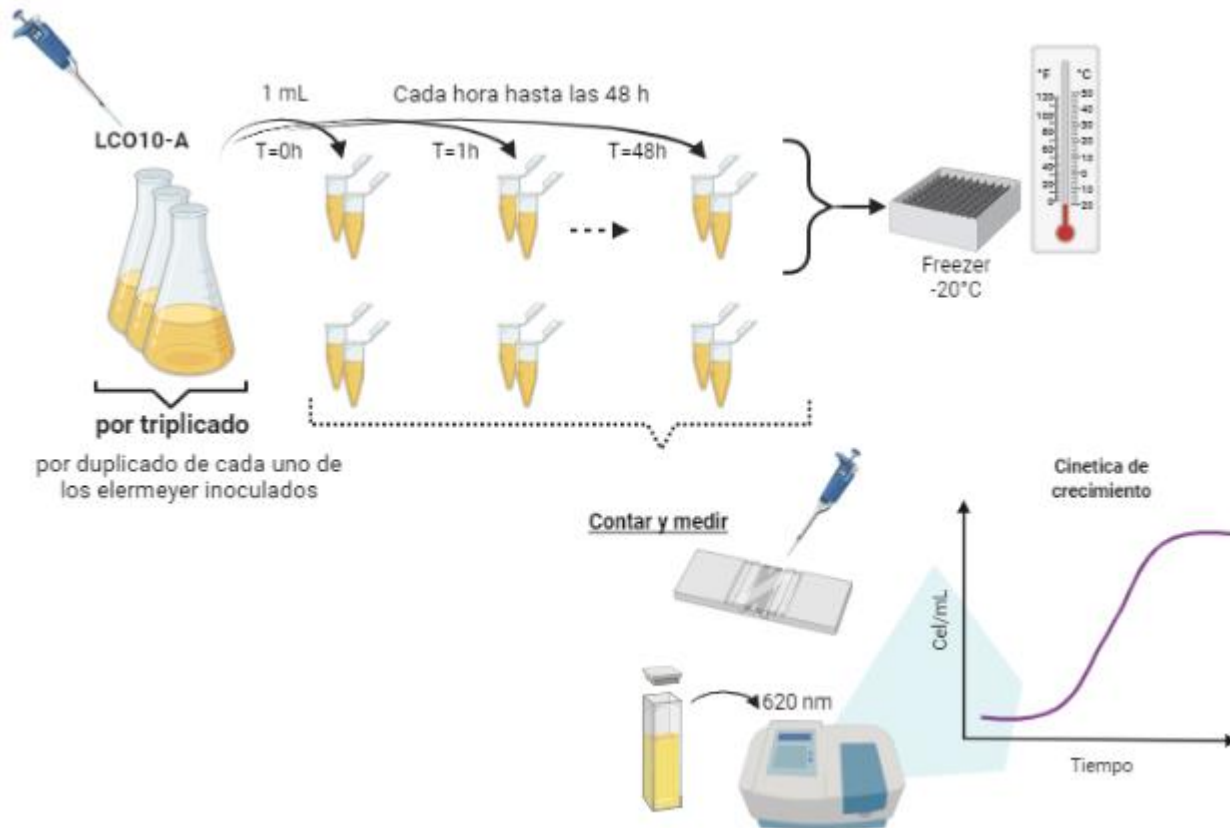


Figura 2. Procedimiento de toma de puntos de control del crecimiento. Cada alícuota fue preservada a -20°C hasta el momento de realizar análisis posteriores.

2.6.2 Evaluación de producción de etanol en medio con vinaza y miel B (VMD)

Se tomaron 200 mL de la vinaza sin sólidos insolubles (filtrado), se suplementó con 30% v/v de miel B diluida con agua destilada estéril (VMD), se homogeneizó y observó en un refractómetro hasta obtener 20°Brix , para determinar la curva de crecimiento, se inocularon los Erlenmeyer por triplicado con la cepa LC010-A a una concentración de $1,65 \cdot 10^8$ cel/mL, se tomaron muestras de 1 mL por cada hora en tubos de microcentrífuga de 1 mL y se pesaron previamente hasta completar 24 horas, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min, el sobrenadante se vertió a otro tubo de microcentrífuga. El pellet resultante se dejó en el horno a 70°C por 24 horas y se obtuvo la biomasa seca al restar el peso del tubo, con estos datos se graficó la curva de biomasa vs tiempo, obteniendo el punto máximo de crecimiento con respecto a la cinética resultante. Adicionalmente se midió el contenido de etanol por el método de Winnick [43] a la muestra final de la fermentación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos en la vinaza y miel B

En la Tabla 2 se presenta la caracterización de algunos parámetros fisicoquímicos de la vinaza y miel B, donados por un Ingenio azucarero del Valle del Cauca. Las vinazas por lo general son ácidas debido al proceso de fermentación, a la acidificación del mosto con ácido sulfúrico o a la presencia de ácidos orgánicos [11, 33], en relación a esto, los pH presentes en otros estudios se encuentran entre 3,95 y 4,35 [11]; que comparados a los valores de la vinaza en esta investigación fueron de $4,01 \pm 0,04$, sugiriendo que la vinaza obtenida se encuentra en el rango establecido por la literatura. Las posibles variaciones se deben probablemente al tipo de cepa, diferencias en sus procesos tecnológicos e incluso la calidad de las materias primas [11, 4]. Con base a las investigaciones de otros autores, las melazas (Miel B) tienen un pH que varían entre 5,5-6,5 [33], lo cual se

relaciona al resultado obtenido de $5,3 \pm 0,1$ donde se muestran valores inferiores, siendo atribuido posiblemente al proceso de clarificación de las meladuras [4].

Tabla 2. Análisis fisicoquímicos realizados a la vinaza y Miel B.

Parámetro Fisicoquímico	Vinaza	Miel B
pH	$4,01 \pm 0,04$	$5,3 \pm 0,1$
Densidad (g/mL)	1,0658	1,4509
Sólidos totales % (g/g)	5,36	77,18
Sólidos solubles % (g/g)	4,73	--
Sólidos insolubles % (g/g)	0,63	--
Humedad (v/v)	94,64	22,82
Acidez volátil (ppm)	1542,6	2314,7
Azúcares reductores Totales ART (g/L)	7,25	55

Teniendo en cuenta los sólidos totales (solubles e insolubles), la vinaza obtenida presentó 5,36% y en base a la comparación de esto junto con otros estudios, los sólidos se encuentran en un [31] rango de 10% y 75% g/g [33] sin especificar el tipo de vinaza. Las cuales se clasifican en: vinaza diluida 8 a 10%, vinaza semiconcentrada del 20 a 30%, vinaza concentrada de 55 a 60% y vinaza sólida de 99 a 99,9% de sólidos totales [23]. De acuerdo con lo anterior, el 5,36% g/g obtenido es inferior al rango que se presenta en la literatura de vinaza diluida, evidenciando probablemente fallas técnicas en la evaporación del agua y en la metodología de los sólidos solubles, método que también afectaría el % de humedad. Se sugiere evaluar los sólidos totales por metodologías más específicas, tales como APHA 2540 [15, 39].

La acidez volátil mostró valores inferiores a los reportados en la literatura, ya que los rangos de acidez volátil para la melaza van de 4000-15000 ppm y 2044-2549 ppm para la vinaza [24], mientras que el resultado obtenido para la vinaza fue de 1542,6 ppm y para la miel B 2314,7 ppm. Cabe resaltar que estos valores varían según el origen, dependiendo del tipo de caña, la técnica de cosecha, las condiciones climáticas, etc. [24]. La importancia de evaluar la concentración de ácidos volátiles se basa en no superar el umbral de tolerancia de las levaduras, lo ideal es que esta variable se encuentre en un valor no superior de 3000 ppm, debido que a estas concentraciones afectarían el proceso de fermentación, conllevando a bajos rendimientos e incluso la inactivación de la levadura [24]. Además, se hace énfasis en que la acidez volátil está constituida por los ácidos grasos de cadena corta, pertenecientes a la serie acética (acético, fórmico, propiónico y butírico) formados durante la fermentación por *S. cerevisiae* o como consecuencia de fermentaciones bacterianas (*Lactobacillus*) [40].

La concentración de azúcares reductores totales se encuentra lejano a los evidenciados por la literatura, que muestra rangos de 0.5-1.45 y 37-52 g/L de vinaza y miel B respectivamente [24]. Otro reporté mostró concentración de ART de 4 g/L para vinazas y 56,40 g/L para melazas (miel B) [41], deduciendo que la fermentación de donde se obtuvo la vinaza no fue completa, ya que presentó azúcar residual en el proceso de destilación [24, 33, 40].

3.2 Levaduras evaluadas de la Micoteca USC en medio sintético GYP

El comportamiento de las cepas y su % de alcohol v/v se muestran en la Figura 3. Los resultados expresados son el promedio de los datos obtenidos por el método de Winnick de los matraces inoculados, evaluados por triplicado. Las cepas que produjeron una concentración de etanol mayor y/o cercana a la cepa RNC.0 aislada del tanque de fermentación, son respectivamente las siguientes: LC010-A, & RNC.1, con respecto a estos análisis se optó por seleccionar la cepa LC010-A por presentar mayor producción de etanol, con una concentración de 9,8% v/v (Figura 3).

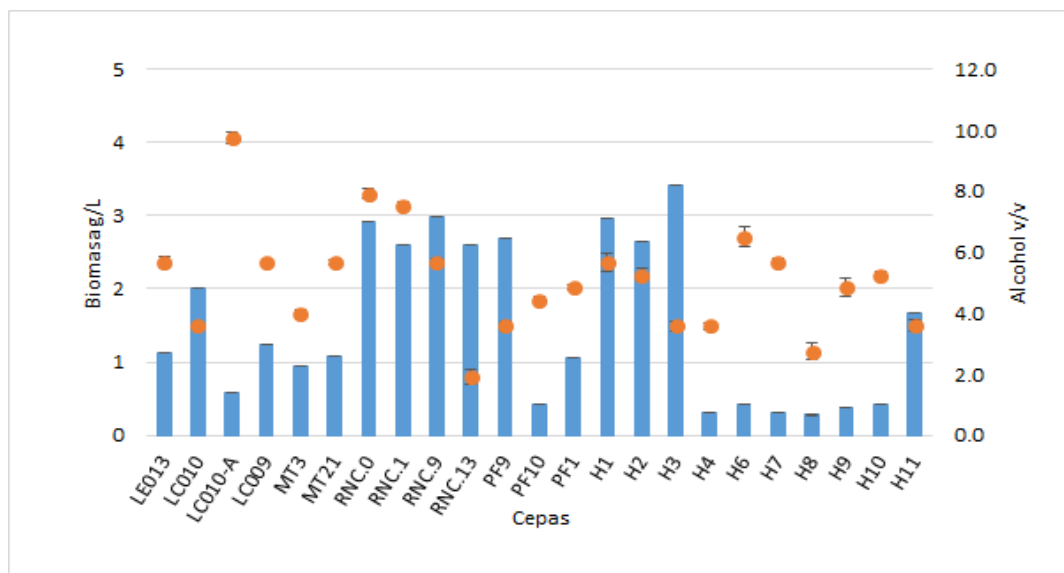


Figura 3. Porcentaje de alcohol probable (círculos naranjas) y biomasa (columnas azules) producida por las levaduras evaluadas después de la fermentación en medio sintético. Determinación de la concentración de etanol por el método de Winnick. Los valores están expresados en términos de promedio +/- desviación estándar.

La selección de levaduras nativas es una práctica que cada día ha tomado mucha fuerza en las industrias fermentativas; debido a las múltiples funciones biológicas y metabólicas que esta tiene en los diferentes procesos industriales, donde se requieren productos a gran escala. Por ejemplo, en el estudio realizado en el año 2019 se encuentra que se aíslan cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae*, en el cual se observó un incremento en el rendimiento respecto a la cepa usada en el Ingenio, esto siempre y cuando se controlen las variables del proceso con el objetivo de favorecer el desarrollo de los microorganismos [36].

Los factores que influyen en la producción de etanol son: la concentración de azúcar, la temperatura, el pH, la contaminación microbiana (principalmente por bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*), el tipo de sustrato y el microorganismo empleado, son variables que influyen en el crecimiento de las levaduras [26, 30, 31, 34]. Respecto a la concentración de azúcar, la literatura demuestra estudios preliminares de cepas de *S. cerevisiae* obtuvieron la mayor producción de etanol a una concentración de 250 g/L de sacarosa, con un promedio de producción de 2,34 g/L por encima de la cepa control, demostrando la tolerancia a elevadas concentraciones de sacarosa con mayor producción de etanol, ambas bajo condiciones de melazas de caña de azúcar [26]. Los diferentes comportamientos de las levaduras ante condiciones de restricción de oxígeno y azúcares por encima de 0.016% p/v, *S. cerevisiae* activa el metabolismo oxidorreductor incrementando la producción de etanol, conociéndolo como efecto *Crabtree* [26-29].

Las cepas LC010-A y RNC.1 fueron seleccionadas por su producción de alcohol a escala de laboratorio bajo condiciones de restricción de oxígeno y temperatura ambiente entre 21-25°C, rangos que, según estudios de fermentación, se encuentra por debajo de la temperatura óptima de 33°C para obtener mayor concentración de alcohol, [30] rangos que dependen según la cepa utilizada. Debido a que estos parámetros no se evaluaron en el presente trabajo, se sugiere realizar más estudios siendo puntos claves de discusión [10, 19]. Dentro del proceso fermentativo la concentración de alcohol es una variable a controlar, debido a que si tiene niveles teóricamente superiores al 18% generan estrés osmótico, inhibición competitiva, entre otros; factor que depende de la resistencia de la misma levadura [14, 24].

Cabe destacar que la cepa *S. cerevisiae* RNC.0, aislada de un tanque de fermentación (Tabla 1), no se tiene en cuenta como posible cepa de referencia, debido a que fue la que se usó como parámetro de comparación respecto a la concentración de etanol, es decir se buscaban cepas que produjeron una concentración de etanol mayor y/o cercana a 7,9 % v/v. Entre las tres cepas de referencias evaluadas se descarta la RNC.13 por ser *S. kluyveri*, quedando dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* RNC.1 Y RNC.9 seleccionando la cepa de referencia RNC.1 con 7,5% v/v con la concentración más cercana a 7,9 %.

3.3 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* LC010-A & RNC.1

La cepa LC010-A presentó parámetros de crecimiento y fermentación comparables con la cepa de referencia RNC.1 (Figura 4). De acuerdo con la curva de calibración para el consumo de azúcares reductores (Anexo 1), ambas cepas mostraron un consumo de sustrato parcial, además, la cepa RNC.1 mostró fenotipo de floculación, lo que dificultó las mediciones de conteo celular en la cinética.

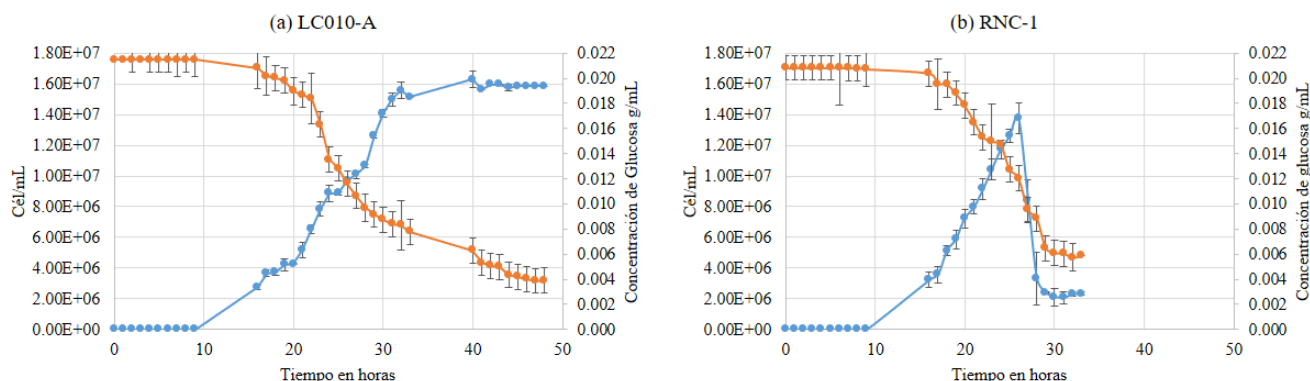


Figura 4. Curva de crecimiento de las cepas *S. cerevisiae* LC010A (a) y NCYC 660 (b). La línea azul se refiere a la concentración celular y la línea naranja representa la concentración de glucosa, ambos valores vs el tiempo en horas.

Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento se determinó la velocidad específica de crecimiento $\mu_{max} = 0.119 \text{ h}^{-1}$ ($\approx 0,12 \text{ h}^{-1}$) (Anexo 4) y un tiempo de duplicación de 2.51 horas para la cepa LC010-A. La velocidad específica se ve influenciada por factores ambientales y los endógenos, tales como la estructura celular, su morfología y su control intracelular, dependiendo de su complejo en el sistema celular y del tipo de microorganismo; en el caso de las levaduras por ser un microorganismo más complejo, su tiempo de duplicación será un poco más lento que las bacterias, pero con el resultado obtenido en el experimento se puede decir que la levadura está dentro del rango de duplicación que oscila de 1,15 a 3 horas y el μ_{max} que oscila 0,2 a 0,6 h^{-1} . Entre menor sea su complejidad mayor será su μ_{max} e irá disminuyendo a medida que aumente la complejidad celular [42-44].

3.4 Evaluación de LC010-A & RNC.1 en medios con vinaza y miel B

El pH inicial del medio de vinaza con miel B diluida, fue de $5,0 \pm 0,2$, por lo que no se presentó la necesidad de realizar ajustes; de acuerdo a otras investigaciones la fermentación es un proceso no estéril que favorece pH bajos, dado que a nivel industrial los procesos fermentativos a base de melazas o jugos de caña, emplean valores de pH cercanas a 4 con la finalidad de evitar la contaminación microbiana [31]. Teóricamente, fermentar con pH bajos ocasiona la inhibición de los microorganismos contaminantes, que no toleran estas condiciones [31, 32, 33]. Sin embargo, con base a lo anterior, difiere con otros estudios que evalúan las especies *Lactobacillus spp.* y *Leuconostoc spp.*, encontradas en procesos de producción de etanol a partir de melazas y vinazas; los cuales presentan una alta tolerancia a pH bajos y son a su vez, responsables de la problemática de consumir el 0,02% a 0,07% de la sacarosa por hora [34]. En este estudio no se identificaron los microorganismos presentes en los sustratos, con la finalidad de evaluar el rendimiento en presencia de estos contaminantes, aunque fueron observados en el microscopio en la caracterización inicial, previo a la preparación del medio de cultivo.

En la Tabla 3, se muestra la producción de etanol para las cepas *S. cerevisiae* LC010-A y RNC.1 por dos medios con vinaza; el primer medio consistió en suplementar la vinaza con Miel B, para llegar a la concentración del medio control de 20° Brix. Sin embargo, no se presentó crecimiento de ninguna de las cepas. Por lo tanto, se buscó una alternativa diluyendo el medio 1, ayudando a disolver los cristales de azúcar de la miel B, evaluando el desempeño e igualmente ajustando a 20° Brix, en este medio alternativo la concentración de etanol para *S. cerevisiae* LC010-A fue de 6,7% v/v versus la presente en el medio control de GYP 9,8% v/v. Por otro lado, la cepa RNC.1 con el medio 2, transcurrido 48 horas, ya presentaba una concentración de etanol de 4,5% v/v, versus la presente en el medio control de GYP de misma cepa de 7,5% v/v.

Tabla 3. Promedio del etanol obtenido de los tratamientos con vinaza, como control GYP. En un periodo de 7 días.

Medios	Concentración de azúcares g/L	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 660 (RNC.1)			LC010-A (<i>S. cerevisiae</i>)		
		Etanol% v/v	Rendimiento Yp/s (g/g)	Eficiencia %	Etanol% v/v	Rendimiento Yp/s (g/g)	Eficiencia %
Control (48 h)	20	7,5 ± 0,10	0,30	58,8	9,8 ± 0,12	0,38	74,4
2 (48 h)	17,23	4,5 ± 0,05	0,21	40,3	1,2 ± 0,73	0,05	0,1
2 (120 h)					6,7 ± 0,80	0,30	58,8
Productividad (g/g) / h		0,004 (48 h)			0,001 (48 h)		0,0025 (120 h)

Medio control: Caldo GYP.

Medio 2: Vinaza y Miel B diluida en agua destilada estéril.

Composición: 30% Miel B y 200 ml Vinaza (200 ml de agua).

Con los resultados mencionados anteriormente, se evidencia que utilizar estos microorganismos con capacidad de producción de sustancias orgánicas a gran escala, es una excelente estrategia, no solo por su capacidad de producción en ambientes extremos; sino porque es un método económico. Una de las áreas en las cuales se implementan los microorganismos con esas características, es la industria dedicada a la fermentación y producción de etanol con diversos fines, especialmente para las industrias de destilación de alcohol. Ahí radica la trascendencia de la selección de levaduras, que tengan la capacidad de producir etanol a gran escala [2, 24]. Por esta razón, para la producción de etanol; es importante el sustrato como fuente esencial para alcanzar un buen rendimiento. Del mismo modo, se debe tener presente las condiciones ideales para el desarrollo del microorganismo y así este produzca el metabolito deseado. En el caso de la fermentación de etanol a partir de levaduras, algunas investigaciones manifiestan que la melaza de caña de azúcar es un excelente sustrato para la producción de biomasa con la implementación de *Saccharomyces cerevisiae* [38]. En esta investigación se diseñó un medio de cultivo como sustrato; el cual contenía vinaza suplementado con miel B, a este se le determinó la concentración de azúcares reductores totales y la acidez volátil. En el medio de cultivo se utilizó miel B, como sustrato ideal.

El proceso industrial de preparación de los tanques de fermentación inicia con un crecimiento aeróbico, permitiendo que la levadura se centre en solo crecer y reproducirse hasta la concentración deseada, una vez alcanzada la concentración requerida se transfiere a unos tanques en condiciones de restricción de oxígeno, donde la levadura absorbe los azúcares fermentables (glucosa y fructosa), produciendo por medio de reacciones bioquímicas, etanol, CO₂ entre otros [2, 4, 24]; en relación con la producción de etanol este producto va a depender de la capacidad fermentativa durante el proceso en los tanques de fermentación industriales, manteniendo condiciones propicias para el crecimiento [25], pasando por alto el potencial de las cepas nativas para superar ambientes hostiles con altos niveles de producción de etanol [14]. Varios estudios han publicado el desempeño metabólico de las levaduras nativas ante sustratos específicos como la glucosa, fructosa, maltosa, melazas de caña de azúcar, entre otras [31, 26]. Con base en las condiciones de la presente investigación, la levadura comercial a pesar de no llegar a producir la misma concentración de etanol que la nativa en el medio 2, demuestra cómo el comportamiento de estas cepas ante diversos componentes del medio, son factores que comúnmente la levadura comercial debe soportar; tales como: altas concentraciones de etanol, presencia de metabolitos inhibidores y la capacidad de floculación, entre otros [31], siendo representadas en la Tabla 3, donde el medio 2 con respecto a la cepa comercial, mantuvo un rendimiento de 0,26 g/g y desviación estándar menor sin transferencias a un medio fresco. A diferencia de la nativa que su rendimiento de 0,39 g/g y desviación estándar es mayor incluso con varias transferencias a medio fresco, demostrando que su producción no es estable a pesar de tener el promedio de etanol alto. Siendo necesario seguir evaluando la nativa en medio con vinaza y melazas, ya que en otros estudios demostraron que las cepas nativas de *S. cerevisiae* en medio con melazas de caña de azúcar, presentan un rendimiento de 0,55 g/g [26, 32, 37]. En este trabajo se implementaron condiciones similares

para cada una de las etapas de aislamiento e incubación, en comparación con los resultados anteriores se considera que la fermentación de levaduras a partir de bagazo de caña, genera un buen rendimiento, del mismo modo, en la presente investigación se evaluó cómo era la producción de etanol en cepas nativas de *S. cerevisiae*, sometidas a condiciones de estrés por los inhibidores de metabolismos presentes en la vinaza, condiciones que permitieron rendimiento relativamente cercanos en la producción de alcohol, en comparación con el estudio anterior [26, 32, 35].

Las cepas evaluadas se vieron inhibidas al medio 1 que era una mezcla de vinaza con miel B, con análisis de acidez volátil altos, provenientes principalmente de la miel B. Los compuestos volátiles como los ácidos lácticos, acéticos y butíricos son los principales componentes tóxicos de la vinaza, con estudios que demuestran que los ácidos acéticos y lácticos atraviesan la membrana celular para luego disociarse en el citoplasma, debido a un pH promedio interno de 5,8. Las cepas de levaduras por lo general son tolerantes a los componentes tóxicos de la vinaza cuando los niveles de estos ácidos son menores a 3000 ppm aproximadamente, ya que si se supera este rango conlleva a bajos rendimientos, e incluso la inactivación de la levadura [14, 24]. Vale la pena resaltar que en esta investigación se utilizó la cepa de referencia RNC.0 como parámetro de comparación respecto a la concentración de etanol, es decir, se buscaba cepas que produjeran una concentración de etanol mayor o cercano a 7,9% v/v, a partir de ahí la cepa de referencia seleccionada fue RNC.1 con 7,5% v/v [20]. En comparación con las cepas aisladas en otros trabajos [18, 19], en esta investigación se evidenció que la cepa LC010-A en el medio 2 produjo alcohol de 6,7% v/v, mientras que la cepa RNC.1 tuvo una concentración de alcohol de 4,5% v/v mostrando un rendimiento en la producción de etanol con una diferencia de 0,10 g/g en ambas cepas. Lo que indicaría que estos resultados son de vital importancia para las industrias dedicadas a la producción de etanol, debido a que se logró aislar cepas que tienen la capacidad de fermentar en medio de sustratos que contienen vinaza e inhibidores, confirmando lo que en otras investigaciones se ha reportado.

4. CONCLUSIONES

Utilizar levaduras nativas con capacidad fermentativa para la producción de etanol, se convierte en una excelente estrategia, debido a que presentan utilidades que traen consigo muchos beneficios económicos. Sin embargo, la baja estabilidad de producción de etanol de la cepa nativa LC010-A traería pérdidas productivas si se aplica a gran escala, ya que en la industria se necesita una mayor cantidad de biomasa para así producir un alto porcentaje de etanol, incluyendo el control de temperatura y los nutrientes que se necesita para obtener una producción óptima. Al resaltar que la práctica fue a escala de laboratorio, es necesaria la evaluación en biorreactores para igualar las condiciones industriales. Por otro lado, se recomienda someter estas levaduras a diferentes condiciones de temperatura, para así evaluar su potencial y capacidad de fermentar etanol (si se hiciera uso de la cepa seleccionada LC010-A en la industria) cabe aclarar que la temperatura no se tuvo en cuenta para la realización de este proyecto, debido a que se trabajó en un cuarto donde no había presente un termohigrómetro que nos indicará la temperatura y tampoco hubo la necesidad de controlar ese factor. Finalmente, se logró el objetivo de la investigación, el cual fue seleccionar cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* que tuviera la capacidad de producir etanol a partir de vinaza. La cepa nativa demostró que tiene la capacidad para la conversión de azúcares a etanol con una eficiencia de 0,39 g/g vs el esperado en la literatura de 0,51 g/g. Por lo tanto, se recomienda seguir trabajando con ella en próximos procesos de mejora, con la finalidad de evaluar si se aproxima al teórico.

Se comprobó que la vinaza con melaza de caña por sí sola, no es un medio propicio al crecimiento microbiano por la concentración que está por encima del umbral de tolerancia de 3000 ppm, provenientes principalmente de las meladuras, por lo que es necesario invertir agua al proceso, a nivel industrial podría ser cambiado por jugo de caña clarificado. Es recomendable utilizar técnicas analíticas más exactas como (HPLC) implementando métodos cualitativos y cuantitativos para determinar los azúcares reductores y el porcentaje de alcohol de las muestras.

5. AGRADECIMIENTOS

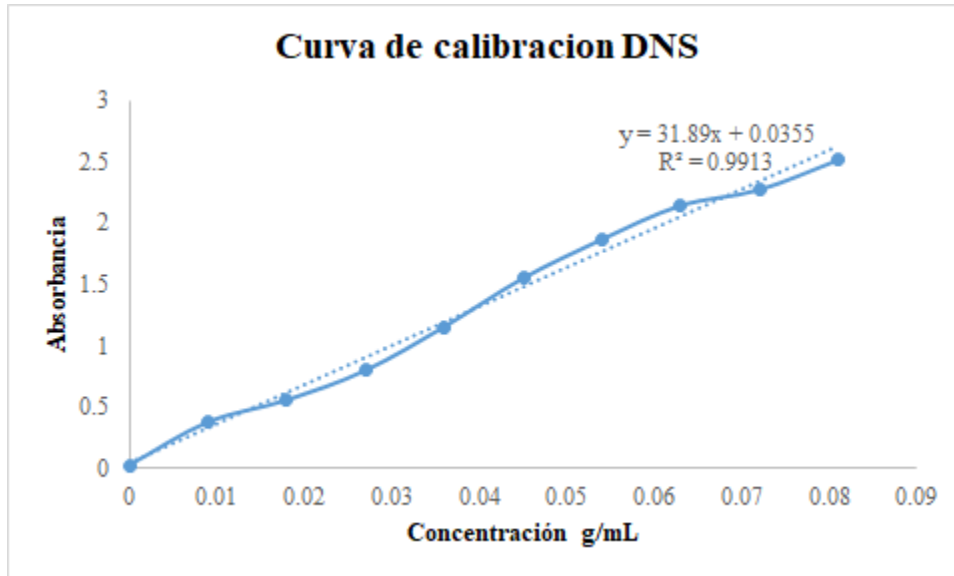
Agradecemos a nuestros tutores Mauricio Ramírez & Yesid Zambrano, a toda la docencia de Microbiología de la universidad que en el transcurso de estos años nos formaron como profesionales, a nuestras familias por brindarnos su apoyo incondicional y sobre todo a Dios por otorgarnos resistencia. Y finalmente al almacén del Bloque 4, por la disposición de las áreas y equipos necesarios para culminar este trabajo.

6. REFERENCIAS

- [1] C. Kurtzman, J. Fell, & T. Boekhout. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5a edición. El Sevier, 2011.
- [2] C. Suárez, A. Garrido, & A. Guevara. "Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol". Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Vol. 50, No 1. pp. 20-28. 2016.
- [3] A. Arumugam & V. Ponnusami. "Ethanol Production from Cashew Apple Juice Using Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells on Silica Gel Matrix Synthesized from Sugarcane Leaf Ash, *Chemical Engineering Communications*.", vol. 202, No 6, pp. 709-717, 2015.
- [4] A. Ramos, *Procesos de Elaboración del Azúcar y Etanol de la Caña*. 2ª Edición. Cali, Valle del Cauca, Colombia. Universidad del Valle, 2009.
- [5] Cenicaña (2016, diciembre del 30). Etanol: más de 10 años de producción [en línea] Disponible en: <https://www.cenicana.org/etanol-mas-de-10-anos-de-produccion/> [fecha de consulta: 22-Septiembre de 2021].
- [6] P. Ahmed, "Biorremediación de vinazas de destilerías de alcohol, por microorganismos autóctonos aislados de ambientes contaminados", tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. 2016.
- [7] Conadesuca. (septiembre de 2016). Nota informativa sobre innovaciones en materia de productividad del sector. VINAZAS: ALTERNATIVAS DE USO. [en línea]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/171932/Nota_Informativa_Septiembre_Vinazas.pdf [fecha de consulta: 22-Septiembre de 2021]
- [8] I. Leal, E. Chirinos, M. Leal, H. Morán & W. Barrera. "Caracterización fisicoquímica de la vinaza del Agave cocui y su posible uso agroindustrial". *Multiciencias*., Vol. 3, No 2. Diciembre, 2003.
- [9] Manuelita S.A (2017, septiembre del 11) Manuelita inicia producción de vinaza seca en polvo de origen orgánico en Colombia. [en línea]. Disponible en: <https://manuelita.com/manuelita-noticias/manuelita-inicia-produccion-vinaza-seca-polvo-origen-organico-colombia/> [fecha de consulta: 22-Septiembre de 2021]
- [10] B. Monteiro, P. Ferraz, M. Barroca, S. da Cruz, T. Collins & L. Cândida. "Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation", *Biotechnol Biofuels*., Vol. 11, No. 251, 2018.
- [11] R. Ibarra, & L. León. "Caracterización químico-física de vinazas de destilerías". *Ciencia en su PC.*, Vol. 1, No 2, pp. 1-13, 2018.
- [12] D. Estrada, N. Carralero, O. Pérez & L. Zumalacarregui. "Alternativas tecnológicas para reducir el volumen de las vinazas de la industria alcoholera y su tratamiento". *Centro Azúcar*. Vol. 43, pp.70-79. marzo de 2016.
- [13] C. Suarez, A. Garrido, C. Guevara. "Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol", Revisión bibliográfica *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. Vol. 50, No 1, pp. 20-28. abril, 2016.
- [14] K. Tortoló, I. Peña, D. Castro, A. Bell, R. García & M. Morais. "Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors". *3 Biotech*. Vol. 6. Enero 2019.
- [15] N. Becerra. "Clarificación de vinazas de caña de azúcar por tratamientos fisicoquímicos y filtración con membranas", Trabajo fin de máster. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, 2014.
- [16] E. Olivas. (2012). Manual de prácticas laboratorio de microbiología, Universidad autónoma Ciudad de Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas. [en línea]. Disponible en: <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011296.pdf> [fecha de consulta: 2-Mayo de 2020]

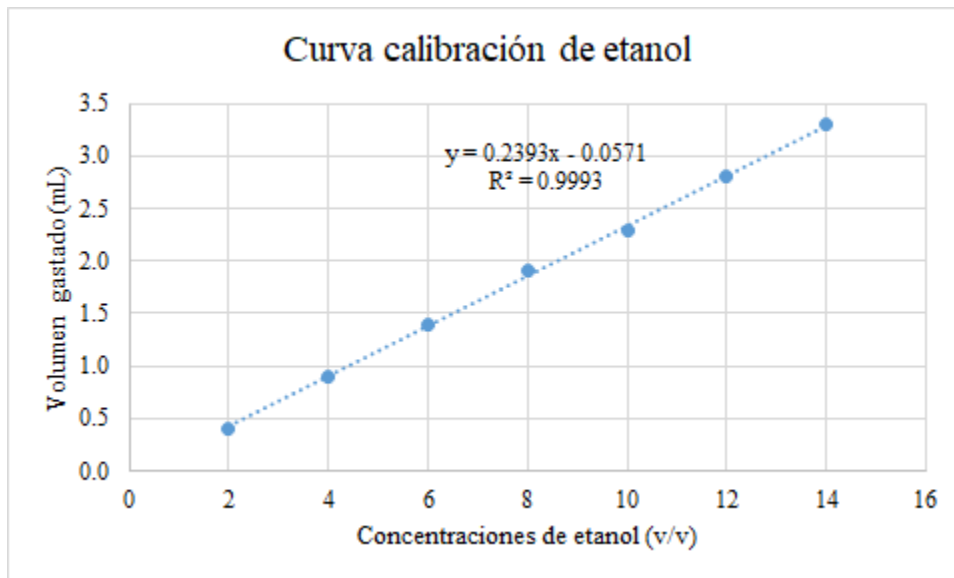
- [17] P. Guzmán, G. García, & E. Larios. (2013). Determinación de azúcares reductores método DNS, Fundación Universidad de América. [en línea]. Disponible en: https://www.academia.edu/4403544/DETERMINACION_DE_AZUCARES_REDUCTORES_METODO_DNS <http://www.redalyc.org/pdf/2231/> [fecha de consulta: 2-Mayo de 2020]
- [18] L. Silva, M. Ramírez & E. Osorio. "Yeast diversity associated sediments and water from two Colombian artificial lakes". *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 45, No 1, pp. 135-142. 2014.
- [19] W. López, M. Ramírez, L. Mambuscay & E. Osorio. "Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia". *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 12, No. 2, pp. 176-186. 2010.
- [20] National Collection of Yeast Cultures. [En línea] Disponible en: <https://www.ncyc.co.uk/catalogue/saccharomyces-cerevisiae-660>. [fecha de consulta: 18-Septiembre de 2021].
- [21] Colección Española de Cultivos Tipo. [En línea] Disponible en: <https://www.cect.org/vstrn.php?lan=es&cect=1685> [fecha de consulta: 18-Septiembre de 2021].
- [22] Westerdijk Fungal Bio Diversity Institute. [En línea] Disponible en: <https://wi.knaw.nl/details/80/2037> [fecha de consulta: 18-Septiembre de 2021].
- [23] A. Arcila, L. Amaíz & D. Pavone. "Evaluación de la aplicación de vinaza en suelo y su posible uso agrícola en plantas de cilantro (*Coriandrum sativum*)" Tesis. Universidad de Carabobo, Venezuela, 2017.
- [24] C. Gallego. "Influencia de la acidez volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del ingenio Risaralda S.A.". Tesis. Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira., Colombia, 2007.
- [25] J. Castillo, J. Laguado, J. López, & N. Gil. "New sources and methods to isolate vinasse-tolerant wild yeasts efficient in ethanol production". *Ann Microbiol* Vol. 66, pp. 187-195. 2016.
- [26] F. Argote. R. Cuervo, E. Osorio, J. Delgado & H. Villada. "Evaluación de la producción de etanol a partir de melazas con cepas nativas *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 13, No. 2, pp. 40 -48. diciembre 2015.
- [27] J. Gutiérrez. "El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino". *Dialnet*. No. 10, pp. 169-198. 2018.
- [28] T. González. "Estudio de la dinámica poblacional de microorganismos silvestres degradadores y/o fermentadores de carbohidratos para la producción de bioetanol" Tesis Doctoral. CIATEC, Mérida, Yucatán, México, 2017.
- [29] E. Waldir. M. Rychtera. K. Melzoch. F. Torres. R. Cotros. N. Bravo. M. Memenza. & Y. Chávez. "Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces Intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra". *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. Vol. 17, No. 1, pp. 5-14. junio 2014.
- [30] I. Granadilla. G. Tarantino. R. Hernández. H. Morás. "Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de *Agave cocui*" *Multiciencias*. Vol. 14, No 4, pp. 375-381. diciembre 2014.
- [31] Z. Daza "Evaluación a escala laboratorio de la producción de etanol en presencia de vinaza a partir de levaduras nativas". Tesis fin de máster. Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia, 2011.
- [32] S. Rodríguez "Evaluación del potencial fermentativo de levaduras nativas para la producción de etanol a partir de mieles de caña de azúcar" Tesis fin de máster. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, 2015.

- [33] J. Hurtado "Evaluación del uso potencial de las vinazas de melaza como aguas de reúso en procesos de fermentación alcohólica" Tesis fin de máster. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2015.
- [34] J. Gómez "Evaluación de antibióticos para el control de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en el proceso de producción de alcohol carburante en el Valle del Cauca". Tesis. Universidad Santiago de Cali, Santiago de Cali, Colombia, 2020.
- [35] A. González, J. Del Angel, J. González, N. Rodríguez & G. Bustos. "Evaluation of producing ethanol native yeasts present in sugar cane bagasse," *Biotechnol. y Ciencias Agropecu.*, vol. 2, no. 2, pp. 80–92, 2017
- [36] L. Favaro, T. Jansen & W. Heber. "Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol.," *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2019.
- [37] O. Deesuth & P. Laopaiboon. "High ethanol production under optimal aeration conditions and yeast composition in a very high gravity fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae*," *Ind. Crops Prod.*, vol. 92, pp. 263–270, 2016.
- [38] J. Aguilar, M. Espinoza, J. Cabanillas, I. Avila, A. García, J. Julca, D. Tacanga, I. Zuta & G. Linares. "Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo," *Agroindustrial Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 37–47, 2015.
- [39] L. Velasco. "Caracterización y validación del lodo generado en el tratamiento electrolítico de vinazas". Tesis. Valle del Cauca, Universidad del Valle, Santiago de Cali. 2018.
- [40] E. Fajardo & S. Sarmiento. "Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C, 2007.
- [41] Y. Martínez. "Estudio preliminar de la mezcla agua-vinaza-flemazas y su impacto en la etapa de fermentación en la producción de etanol" *Tecnología Química*, Vol. XXXIII, No. 3, pp. 206-211, 2013.
- [42] S. Cepeda, "Evaluación a escala de laboratorio del proceso de obtención de bioetanol a partir de sorgo dulce" Tesis. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2009.
- [43] J. Hernandez. "Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con *Saccharomyces cerevisiae* y simulación del proceso a escala industrial" Tesis, Caldas, Universidad de Manizales, Manizales, 2015.
- [44] M. Castañeda, M.T. Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano. Documento presentado en la Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, Argentina, 2019.
- [45] W.A., Tapie, D., Prato Garcia, H., Sánchez Guerrero. "Biodegradación de vinazas de caña de azúcar mediante el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* en un reactor de lecho empacado". *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Vol. 19, núm.2, pp.145-150, 2016.



Anexo 1 . Curva de calibración de glucosa (Absorbancia vs concentración)

Anexo 2: Ecuación de la recta empleada para determinar la concentración de alcohol.



Anexo 2. Curva de calibración del método Winnick.

Anexo 3: DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DE WINNICK

1. INTRODUCCIÓN:

La determinación de la cantidad de etanol en los productos obtenidos a partir de la fermentación alcohólica es una de las principales preocupaciones del biotecnólogo; ya que éste es un análisis que requiere de una dotación adecuada de equipos de medición o, por otro lado, de una cantidad considerable de volumen de muestra, como en el caso del método de destilación.

El método de Winnick permite determinar bajas concentraciones de alcohol etílico a través de la acción oxidante de la solución 0,4 N de dicromato de potasio en ácido sulfúrico 10 N, posterior valoración con Tiosulfato de sodio.

Se diluye la muestra de forma que la cantidad de dicromato utilizada sea suficiente para oxidar todo el etanol, formando acetaldehído; de otra manera debe repetirse la prueba usando una mayor dilución de la muestra. El exceso de dicromato se elimina con yoduro de potasio, el volumen de Tiosulfato de sodio gastado en titulación se emplea para determinar el porcentaje de etanol en la muestra teniendo en cuenta la respectiva dilución.

OBJETIVO:

Aplicar una técnica rápida y sencilla para la determinación de alcohol etílico en caldos de fermentación alcohólica que pueda ser usado en determinaciones de velocidad de reacción.

2. MATERIALES Y REACTIVOS:

a) Materiales:

- ❖ Microburetas
- ❖ Soporte universal
- ❖ Erlenmeyers de 50 mL
- ❖ Balones aforados de 250 y 500 mL
- ❖ Pipetas de 1,5 y 10 mL
- ❖ Balanza
- ❖ Beakers
- ❖ Varillas de agitación

b) Reactivos:

- ❖ Ácido Sulfúrico 10 N
- ❖ Dicromato de potasio 0.4 N en H₂SO₄ 10 N
- ❖ Solución de Yoduro de potasio 3 N
- ❖ Solución reactivo de almidón soluble
- ❖ Tiosulfato de sodio 0,1 N

3. PROCEDIMIENTO:

a) Preparación de Reactivos:

ÁCIDO SULFÚRICO 10 N:

Disolver 138,9 mL de H₂SO₄ (densidad 1,84 g/mL y 96% de pureza) con agua destilada hasta aforar a 500 mL.

¡ADVERTENCIA! Se presenta una reacción altamente exotérmica; por lo que se debe adicionar lentamente el ácido al agua (nunca lo contrario). Hacer esto con el balón sumergido en un baño de agua con hielo. Al enfriarse la solución, se produce una contracción de volumen que se debe corregir adicionando más agua destilada hasta alcanzar el volumen final.

DICROMATO DE POTASIO 0.4 N EN H₂SO₄ 10 N:

Pesar 19,614 gr. de Dicromato de potasio previamente seco a 100°C durante 4-6 horas y disolverlo en el H₂SO₄ 10 N hasta completar un volumen de 1 L.

SOLUCIÓN DE YODURO DE POTASIO 3 N:

Disolver 49,8 gr. De yoduro de potasio (KI) en suficiente agua destilada y aforar en un balón de 100 mL.

SOLUCIÓN REACTIVO DE ALMIDÓN SOLUBLE:

Pesar 1 gr. de almidón soluble. Verter lentamente con agitación constante en 200 mL de agua destilada hirviendo. Hervir hasta obtener un líquido ligero y translúcido. Dejar decantar y usar únicamente el líquido sobrenadante.

En un recipiente limpio y bien tapado, esta solución puede durar hasta dos meses. El reactivo es propenso a contaminarse con hongos.

TIOSULFATO DE SODIO 0,1 N:

Preparar a partir de un stock comercial para 1 L de solución.

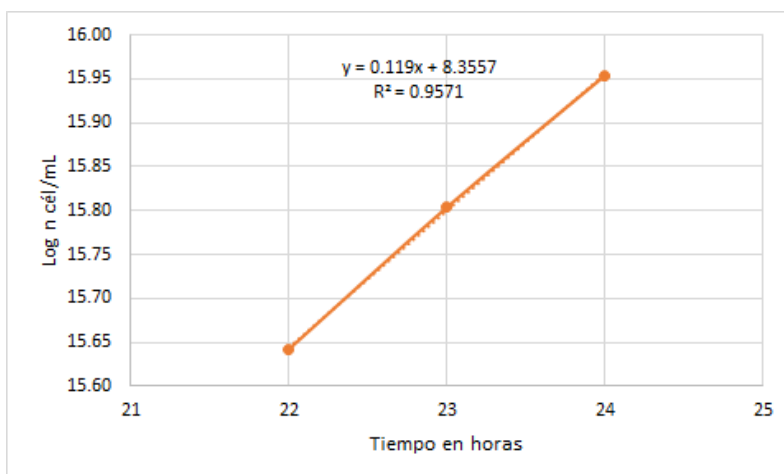
b) Determinación:

Realizar una curva patrón en tubos de ensayo con tapa que contenga 5 mL de las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14% de etanol. A éstas diluciones y a la muestra se someten al siguiente proceso:

Realizar una dilución 1:9 (muestra: agua) para cada tubo. Adicionar exactamente 1 mL de solución de Dicromato de potasio 0,4 N en H_2SO_4 10 N dentro de un erlenmeyer pequeño (20-50 mL).

Adicionar 2 ml de la solución a estudiar, Dejar en reposo durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, adicionar 1 mL de solución de yoduro de potasio 3 N y mezclar. Adicionar 2 gotas de solución de reactivo de almidón soluble. Titular con solución volumétrica de Tiosulfato de sodio 0.1 N con agitación cuidadosa hasta obtener un cambio nítido hacia un color azul marino. Restar el volumen de Tiosulfato gastado por el blanco al momento de construir la curva de calibración.

Anexo 4: Ecuación para determinar la tasa específica máxima de crecimiento.



Anexo 4. Tasa específica máxima de crecimiento de *S. cerevisiae* LC010-A