



CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

***“Análisis teórico-experimental de la ruta metabólica fermentativa de
Saccharomyces cerevisiae en la obtención de etanol”***

T E S I S

Que presenta

LUZ MARIANA PÉREZ MONTOYA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

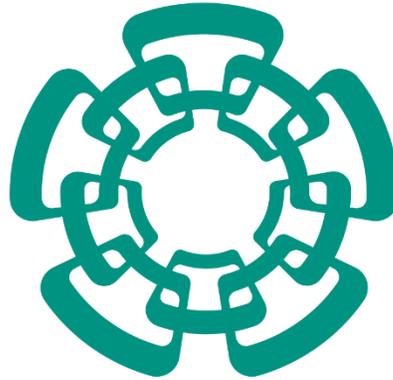
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis:

DR. RICARDO AGUILAR LÓPEZ

México D.F.

Agosto, 2016



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV) UNIDAD ZACATENCO CON EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR EL DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su gran aporte han colaborado en la realización de este trabajo.

Quiero agradecer en primer lugar a la institución que ha hecho posible la realización de este proyecto de investigación, al **CINVESTAV IPN ZACATENCO** muy particularmente al **Departamento de Biotecnología y Bioingeniería** y al **Laboratorio de Análisis Dinámico y Control de Bioprocesos**.

Así también, quiero agradecer al **CONACyT** por la beca de maestría otorgada.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis: Al **Dr. Ricardo Aguilar López**. Gracias Dr. Ricardo por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza, por las enseñanzas brindadas, por su enorme paciencia y su gran apoyo durante toda mi estancia en el laboratorio.

A la **Dra. Alma Rosa Domínguez Bocanegra**. Gracias Dra. Alma por el aporte científico brindado para la realización de este proyecto, por su paciencia desde mis primeros inicios en el laboratorio, por su confianza, consejos y apoyo.

A mi asesor, el **Dr. Pablo Antonio López Pérez**. Gracias Dr. Pablo por brindarme su gran apoyo, por ser siempre un maestro para mí, por sus enseñanzas, su orientación, por creer en mí y por su valiosa amistad.

A mi asesora, la **Dra. Ma. del Carmen Montes Horcasitas**. Gracias Dra. Carmita por el apoyo brindado, por sus consejos y la motivación de cada plática en ser cada vez mejor. Gracias por inspirarme a nunca desistir.

A la **Profesora Elvirita** y a **Gustavo**. Gracias por el apoyo brindado en la Central Analítica, que sin duda es un soporte experimental importante de este proyecto de investigación.

A mis compañeros de laboratorio: **Huguito, Rigel, Fer Cuevas, Fer Grijalva, Yisus, Juan, Karen**. Gracias a todos por su amistad, por las atenciones, consejos y su valioso apoyo. De cada uno de ustedes me llevó un excelente recuerdo.

A los estudiantes de servicio social: **Bere, Viri, Fer Eddy**. Gracias por su amistad y por su apoyo durante la realización experimental de este proyecto.

A mis compañeros de maestría: **Martín, Isra, Citla, Yose, Brendis, Bruno, Jess, Jaime, Cyn, Lalo**. Gracias chicos por todo su apoyo, por sus enseñanzas y por su maravillosa amistad. Es un placer haberlos conocido en esta etapa profesional de mi vida.

Finalmente, pero no por eso menos importante, a mis hermanos **Karla, César y Gilberto**, por ser quienes me han impulsado a ser cada vez mejor. Gracias hermanos por su amor, apoyo, paciencia y por nunca dejar de creer en mí.

DEDICATORIA

A mis padres: Ana María⁺ y Gilberto⁺

Mis ángeles de luz

*“Vive como si fueras a morir mañana.
Aprende como si fueras a vivir siempre.”*

— Mahatma Gandhi
(1869 – 1948)

ÍNDICE

GLOSARIO	13
RESUMEN	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. METABOLISMO CELULAR	18
2.1.1. REDES METABÓLICAS	19
2.1.2. SOBREFLUJO METABÓLICO	20
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.2.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	20
2.2.2. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES	21
2.2.2.1. Carbono	21
2.2.2.2. Nitrógeno	21
2.2.2.3. Fósforo	21
2.2.2.4. Azufre	21
2.2.2.5. Elementos traza	22
2.2.2.5.1. <i>Potasio</i>	22
2.2.2.5.2. <i>Magnesio</i>	22
2.2.2.6. Microelementos	22
2.2.2.7. Inhibidores	22
2.2.2.8. Otros compuestos.....	22
2.2.3. APLICACIONES INDUSTRIALES	23
2.2.3.1. Bioetanol	23
2.2.4. FACTORES LIMITANTES EN SU PROCESO DE FERMENTACIÓN	25
2.2.4.1. Concentración de alcohol.	25
2.2.4.2. pH.....	26
2.2.4.3. Concentración de Azúcares.	26
2.2.4.4. Temperatura.	26
2.2.4.5. Oxígeno.....	26
2.2.5. METABOLISMO CELULAR DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.2.6. EFECTOS METABÓLICOS	28
2.2.6.1. Efecto Pasteur	29
2.2.6.2. Efecto Crabtree.....	30

2.2.7. CAMBIO POST-DIAÚXICO	32
2.3. MODELADO MATEMÁTICO	33
2.3.1. VISIÓN GENERAL EN BIOPROCESOS	34
2.3.2. MODELADO DE BIOPROCESOS	34
2.3.2.1. Descripción y aplicación de modelos	35
2.3.2.1.1. Modelos descriptivos y predictivos.....	35
2.3.2.1.2. Modelos estructurados y no estructurados.....	36
2.3.2.1.3. Modelos distribuidos y segregados.....	36
2.3.2.1.4. Modelos determinísticos y estocásticos.....	36
2.3.2.1.5. Modelos continuos y discretos	37
2.3.3. MODELOS MATEMÁTICOS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR <i>S. cerevisiae</i>	38
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	42
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1. METODOLOGÍA GENERAL.....	43
6.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA 1: ANÁLISIS EXPERIMENTAL	44
6.1.1.1. Microorganismo.....	44
6.1.1.2. Preparación del inóculo	44
6.1.1.3. Comparación de procesos de fermentación	44
6.1.1.4. Fermentaciones bajo condiciones del efecto Crabtree	45
6.1.1.5. Métodos de análisis.....	46
6.1.1.5.1. Determinación de peso seco.....	46
6.1.1.5.2. Determinación de número de células.....	47
6.1.1.5.3. Densidad óptica	48
6.1.1.5.4. Determinación de sustrato.....	48
6.1.1.5.5. Determinación de etanol.....	50
6.1.1.6. Análisis estadístico	50
6.1.2. DESARROLLO DE LA ETAPA 2: MODELADO MATEMÁTICO.....	51
6.1.2.1. Desarrollo de la estructura matemática.....	51
6.1.2.2. Simulación	51
6.1.2.3. Validación	51
6.1.2.4. Evaluación del modelo.....	52

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	52
7.1. ANÁLISIS EXPERIMENTAL	52
7.1.1. PRODUCCIÓN DE ETANOL EN DIFERENTES PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	52
7.1.2. ANÁLISIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE FUENTE DE CARBONO DE LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN DONDE SE PRESENTA EL EFECTO CRABTREE.....	55
7.2. MODELADO MATEMÁTICO	60
7.2.1. ESTRUCTURA MATEMÁTICA.....	60
7.2.1.2. Velocidades de reacción:	62
7.2.1.3. Balances:.....	63
7.3.2. AJUSTE PARAMÉTRICO.....	63
7.3.3. VALIDACIÓN DEL MODELO	65
7.3.4. EVALUACIÓN DEL MODELO.....	66
8. CONCLUSIONES	69
10. RECOMENDACIONES	69
11. PRODUCTOS DE TRABAJO	70
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
13. ANEXOS	83
SECCIÓN A. <i>Descripción de los fermentadores utilizados</i>	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características metabólicas de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes condiciones.	32
Tabla 2. Parámetros de <i>S. cerevisiae</i> cambio diaúxico de procesos fermentativos	33
Tabla 3. Modelos matemáticos de <i>S. cerevisiae</i> en la obtención de etanol.	40
Tabla 4. Parámetros experimentales obtenidos de cada proceso de fermentación.....	55
Tabla 5. Parámetros experimentales obtenidos para cada condición inicial de glucosa en fermentaciones con el efecto Crabtree.	59
Tabla 6. Resultado de la identificación paramétrica para el modelo no estructurado mediante el método de Levenberg-Marquardt en base a datos experimentales a [So: 20 gL ⁻¹]......	64
Tabla 7. Coeficientes de correlación de los datos experimentales a [So: 40 y 60 g/L] con respecto a los datos simulados.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 2. Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figura 3. Proceso de obtención de bioetanol a partir de diferentes sustratos.	24
Figura 4. Principales factores de influencia sobre levaduras silvestres	27
Figura 5. Ruta metabólica de la glicólisis en <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 6. Ruta metabólicas anaerobias y aerobias del catabolismo de azúcar en levaduras	30
Figura 7. Enzimas reprimidas por glucosa en la ruta metabólica de la glicólisis en <i>S. cerevisiae</i> (Efecto Crabtree)	31
Figura 8. Fase postdiaúxica de <i>S. cerevisiae</i> en un cultivo aerobio operado en lote	33
Figura 9. Clases de modelos matemáticos	35
Figura 10. Elección de modelo matemático	37
Figura 11. Proceso para el desarrollo de modelos metabólicos	38
Figura 12. Metodología general del proyecto de investigación	43
Figura 13. Desarrollo preparación del inóculo.....	44
Figura 14. Esquema experimental de la comparación de procesos fermentativos.....	45
Figura 15. Esquema experimental de fermentaciones a condiciones del efecto Crabtree	46
Figura 16. Esquema experimental de la determinación de biomasa por peso seco.....	47
Figura 17. Esquema experimental de la determinación de biomasa por conteo celular.....	47
Figura 18. Espectrofotómetro utilizado para determinación de biomasa por DO.....	48
Figura 19. Esquema experimental de la determinación de sustrato por la técnica de Miller (1959) modificada.	49
Figura 20. Refractómetro (a) y Cromatógrafo de gases (b).....	50
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en diferentes procesos de fermentación (aerobio, anaerobio y con el efecto Crabtree).	52
Figura 22. Cinética del consumo de sustrato por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en diferentes procesos de fermentación (aerobio, anaerobio y con el efecto Crabtree).	53
Figura 23. Producción de etanol [g/L] a 24 horas de operación bajo los diferentes procesos de fermentación: aerobio, anaerobio y con el efecto Crabtree (α : 0.05).	54
Figura 24. Cinética de crecimiento a diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono en medio YM, 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%	56
Figura 25. Cinética de consumo de sustrato a diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono por <i>S. cerevisiae</i> en medio YM, 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.....	57

Figura 26. Producción y consumo de etanol a diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono por <i>S. cerevisiae</i> en medio YM, 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%	58
Figura 27. Producción de etanol a las 24 horas de operación.	58
Figura 28. Esquema ruta metabólica simplificada de la producción de etanol por <i>S. cerevisiae</i>	61
Figura 29. Comparación de datos simulados (línea continua) por el modelo no estructurado fenomenológico y datos experimentales (x■●) reportados en este trabajo, por <i>S. cerevisiae</i> bajo las siguientes condiciones: medio YM, [So: 20 gL^{-1}], 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.	64
Figura 30. Comparación de datos simulados (línea continua) por el modelo no estructurado fenomenológico y datos experimentales (x■●) reportados en este trabajo, por <i>S. cerevisiae</i> bajo las siguientes condiciones: medio YM, [So: 40 gL^{-1}], 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.	65
Figura 31. Comparación de datos simulados (línea continua) por el modelo no estructurado fenomenológico y datos experimentales (x■●) reportados en este trabajo, por <i>S. cerevisiae</i> bajo las siguientes condiciones: medio YM, [So: 60 gL^{-1}], 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.	66
Figura 32. Comparación de datos simulados por el modelo y concentraciones a tiempo final reportadas en este trabajo y por Arellano et al. (2007) a 60 g/L de sustrato.....	67
Figura 33. Comparación de datos simulados por el modelo no estructurado y concentraciones a tiempo final reportadas por Arellano et al. (2007) a A) 90 y B) 180 g/L de sustrato.	67
Figura 37. Biorreactores APPLIKON® de 3 litros (izquierda) y 1 litro (derecha)	85

GLOSARIO

- ✓ **x**: biomasa [gL^{-1}]
- ✓ **g**: glucosa [gL^{-1}]
- ✓ **e**: etanol [gL^{-1}]
- ✓ **g_x**: gramos de biomasa [g]
- ✓ **g_g**: gramos de glucosa [g]
- ✓ **g_e**: gramos de etanol [g]
- ✓ **P_x**: producción de biomasa a las 24 h [$\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$]
- ✓ **P_e**: producción de etanol a las 24 h [$\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$]
- ✓ **k_{se}**: constante de producción de etanol [gL^{-1}]
- ✓ **k_{se2}**: constante de afinidad al consumo de etanol [gL^{-1}]
- ✓ **k_{sg}**: constante de afinidad al consumo de glucosa [gL^{-1}]
- ✓ **r_e**: velocidad de producción de etanol [h^{-1}]
- ✓ **r_{maxe}**: velocidad máxima de producción de etanol [h^{-1}]
- ✓ **μ_{e2}**: velocidad de crecimiento por consumo de etanol [h^{-1}]
- ✓ **μ_{maxe2}**: velocidad máxima de crecimiento por consumo de etanol [h^{-1}]
- ✓ **μ_g**: velocidad de crecimiento por glucosa [h^{-1}]
- ✓ **μ_{maxg}**: velocidad máxima de crecimiento por glucosa [h^{-1}]
- ✓ **Y_(x/e)**: rendimiento biomasa-etanol [g_x/g_e]
- ✓ **Y_(x/g)**: rendimiento biomasa-glucosa [g_x/g_g]
- ✓ **Y_(e/g)**: rendimiento etanol-glucosa [g_e/g_g]

RESUMEN

El estudio del metabolismo celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo, enfocado en el campo de Bioprocesos, ha tenido gran importancia para la producción de ciertos metabolitos de interés, particularmente del etanol, el cual puede tener varias aplicaciones industriales dentro de las cuales se prevé que destinarlo al sector de combustibles puede ser una alternativa viable. Por ello, el interés de desarrollar estrategias para lograr incrementar la producción de etanol. En el presente trabajo se planteó una estrategia experimental basada en la comparación de tres procesos de fermentación operados en lote en bioreactores STR: proceso aerobio, anaerobio y un proceso de fermentación en condiciones tales que se presentara el efecto Crabtree, en este último se encontró que bajo estas condiciones los rendimientos de etanol eran superiores (0.49 g/g) a los procesos de fermentación aerobio y anaerobio. Posteriormente se realizó un análisis experimental de las fermentaciones donde el efecto Crabtree es inducido. Este análisis se desarrolló bajo un umbral de diferentes concentraciones de glucosa ($20, 40$ y 60 gL^{-1}), donde se encontró que a concentraciones iniciales de 60 gL^{-1} de glucosa y a saturación de oxígeno se obtiene la mayor concentración de etanol (29 gL^{-1}). Con los datos experimentales anteriores se desarrolló un modelo matemático de tres estados el cual describe el cambio postdiaúxico que *S. cerevisiae* presenta cuando se trabaja a condiciones de operación para presentar el efecto Crabtree en su metabolismo. Con el modelo desarrollado se obtuvo un R^2 global superior a 0.94 , lo que indica que el modelo tiene una buena capacidad predictiva para representar este fenómeno metabólico.

ABSTRACT

Study the cellular metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism, focused in the bioprocesses field, has had great importance for the production of certain interesting metabolites, particularly ethanol, which can have various industrial applications within which is expected that destined it in the fuel sector may be a viable alternative. Therefore, the interest to develop strategies for increasing ethanol production. In this work was developed an experimental strategy based on comparison of three fermentation processes in bioreactors STR operated in batch cultures: aerobic and anaerobic processes, and a fermentation process under conditions such that the Crabtree effect is present. In the latter it was found that under these conditions, ethanol yields were higher (0.49 g_e/g_s) than in aerobic and anaerobic processes. Subsequently an experimental analysis of this effect under a range of different initial glucose concentrations (20, 40 and 60 gL⁻¹) was performed. It was found that at initial glucose concentrations of 60 gL⁻¹ and saturation oxygen, the highest ethanol concentration (29 gL⁻¹) is obtained. With previous experimental data a mathematical model of three states which describes the post diauxic change present during the operational conditions to represent the Crabtree effect was developed. The model showed the ability to be predictive to represent this metabolic phenomenon because a higher overall R² to 0.94 was obtained.

1. INTRODUCCIÓN

Durante aproximadamente 8.000 años, los seres humanos han aprovechado los microorganismos para producir alimentos y bebidas fermentadas. Más recientemente, los microorganismos se han utilizado para producir sustancias químicas que han tenido una amplia gama de aplicaciones. Mediante la utilización de la ingeniería genética se hace posible la modificación del metabolismo para algunos microorganismos. Sin embargo, la mayoría de los procesos industriales actuales hacen uso de cepas silvestres debido a que el proceso es económicamente más factible (Nielsen, 2001). A finales de 1980 y principios de 1990 surgieron nuevos conocimientos sobre los complejos mecanismos internos del metabolismo celular que alimentados por la bioinformática y métodos de modelización matemática permitieron el desarrollo de un análisis cuantitativo en el estudio del metabolismo celular de ciertos microorganismos.

El metabolismo celular se define como el conjunto de las reacciones químicas que se producen en el interior de una célula, para que estas reacciones puedan llevarse a cabo se requiere de una interacción entre los mecanismos celulares internos de un organismo con las condiciones ambientales del entorno presente (Nielsen *et al.*, 2016). La importancia de estudiar el metabolismo celular en el campo de la Biotecnología, se refleja en el desarrollo de una gran cantidad de productos relacionados con medicina como vacunas y antibióticos, el mejoramiento de la agricultura a partir de la alteración genética de ciertas especies, en el campo de la biorremediación con la degradación de hidrocarburos, y demás aplicaciones de índole industrial.

En el campo de los Bioprocesos, el estudio del metabolismo celular de ciertos microorganismos ha logrado el establecimiento de procesos sostenibles y la mejora de procesos ya existentes con el incremento de productividades de algún metabolito de interés.

Dentro de los microorganismos más estudiados, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual debido a sus características fisicoquímicas es ampliamente utilizada a nivel industrial (Noor *et al.*, 2003). Por ejemplo, para la elaboración de pan, obtención de bebidas fermentables como el vino y la cerveza, y en los últimos años se ha destinado hacia el sector de los biocombustibles (Sarkar *et al.*, 2012).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. METABOLISMO CELULAR

Se conoce como metabolismo celular al proceso de asimilación y descomposición de nutrientes en una serie de metabolitos; este proceso se encuentra mediado por diversas enzimas, las cuales son reguladas por diversos mecanismos (Canales, 2014). Es posible clasificar las vías metabólicas en dos tipos: *vías anabólicas*, que corresponden a cadenas de reacciones en las que los metabolitos son reducidos, produciendo los distintos componentes asimilados por la célula; y las *vías catabólicas*, en las que los metabolitos son oxidados con el objetivo de generar energía para las demás reacciones. De esta manera la célula debe alcanzar un equilibrio entre la cantidad de nutrientes destinados a formar productos secundarios y la cantidad de energía generada (Noor *et al.*, 2010). La energía química utilizada en los procesos de la célula es almacenada en forma de adenosin trifosfato (ATP), otros compuestos importantes son la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADP) y la nicotinamida adenín dinucleótido (NAD), que junto a sus respectivas versiones reducidas, NADPH y NADH, actúan como co-factores en una gran cantidad de las reacciones metabólicas.

Dentro de la ingeniería metabólica, el metabolismo central del carbono es uno de los más estudiados. Además, es una vía común en la mayoría de los organismos conocidos debido a que es la manera más eficiente, bioquímicamente hablando, de formar los precursores de la biomasa y mantener un balance energético positivo (Fell, 2010; Noor *et al.*, 2010).

El metabolismo central del carbono está formado principalmente por la vía de la glicólisis, la de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs, entre algunos otros. La **Figura 1** muestra el metabolismo de *S. cerevisiae*, resaltando de rojo las rutas involucradas en el metabolismo central del carbono.

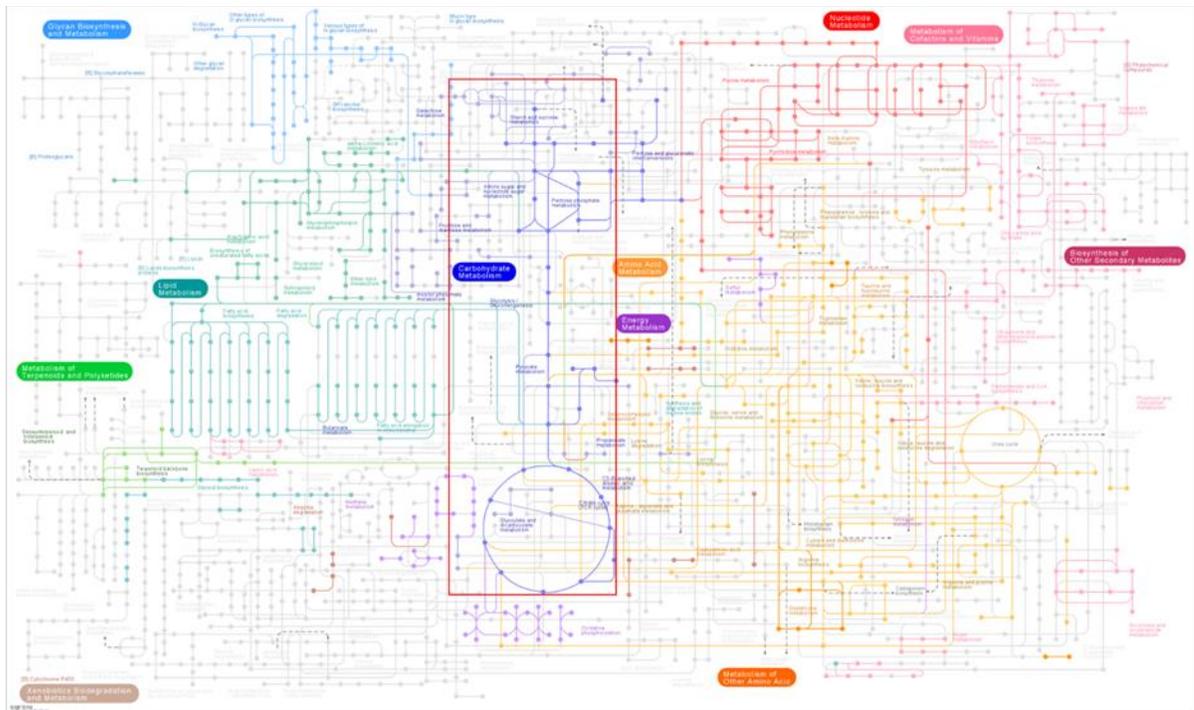


Figura 1. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* (KEGG, 2016)

Para muchos de los organismos modelo estudiados, la glucosa es la fuente de carbono que permite el crecimiento más rápido y es, por lo general, el primer nutriente consumido en presencia de una mezcla de ellos (Monod, 1949).

2.1.1. REDES METABÓLICAS

Los set de reacciones, o vías metabólicas, forman y funcionan como una red a través de las cuales los distintos metabolitos reaccionan de manera sucesiva hasta transformarse en componentes de biomasa, aceptores finales de electrones u otros productos. Las reacciones que componen esta red son mediadas por enzimas, que son a su vez reguladas por metabolitos de la misma u otras vías, logrando un grado de interconexión entre los metabolitos que alcanza varias dimensiones. A las interconexiones formadas por los metabolitos de un organismo se les denomina redes metabólicas. Las redes metabólicas se construyen a partir del estudio del genoma de los organismos, identificando las enzimas que catalizan las reacciones de la red. Existen bases de datos en las que esta información se organiza de manera de construir redes que den cuenta de la mayor parte de las vías metabólicas de los diferentes organismos.

En particular, las redes metabólicas de *S. cerevisiae* han sido ampliamente estudiadas y documentadas (KEGG, 2016).

2.1.2. SOBREFLUJO METABÓLICO

Se ha encontrado que la producción de algunos metabolitos como etanol o acetato bajo condiciones aerobias se atribuye a un desbalance entre los flujos de carbono proveniente de glucosa en la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo que conduce a una acumulación de acetil coenzima A, la cual se transforma en acetato o en algunos otros casos en etanol, que se transporta hacia afuera de la célula. Este fenómeno de producción de acetato o etanol es conocido como *sobreflujo metabólico* (Lara, 2011). Para evitar el sobreflujo metabólico, debe mantenerse una tasa de consumo de glucosa menor al valor umbral que dispara el sobreflujo metabólico (Eiteman *et al.*, 2006).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos y es capaz de utilizar altas concentraciones de azúcar (menor a 200 gL⁻¹) (Carballo, 2000).

2.2.1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

- ▶ Reino: *Fungi – Mycetozoa*
- ▶ División: *Amastigomycota – Eumycota*
- ▶ Subdivisión: *Ascomycotina*
- ▶ Clase: *Ascomycetes – Hemiascomycetes*
- ▶ Subfamilia: *Saccharomycetaceae*
- ▶ Género: *Saccharomyces*
- ▶ Especie: *cerevisiae*

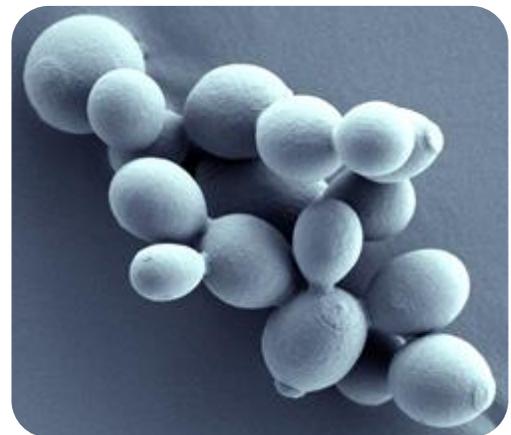


Figura 2. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.2. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

2.2.2.1. Carbono

Los compuestos carbonados son utilizados a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono por *Saccharomyces cerevisiae*, necesita D-azúcares como hexosas, glucosa, fructuosa, manosa, etc., los L-azúcares pueden ser considerados no fermentables por esta levadura (Tuite & Oliver, 1991).

2.2.2.2. Nitrógeno

Este elemento es un constituyente importante en los medios de cultivos para promover el crecimiento ya que representa alrededor del 10% de peso seco de las levaduras. *S. cerevisiae* es capaz de utilizar el nitrógeno en forma de ion amonio. Los iones amonio pueden ser aportados en el medio por el Cloruro de Amonio que provee además una fuente de azufre asimilable ((NH₄)₂SO₄). Otra fuente de nitrógeno son los aminoácidos, los dipéptidos, tripéptidos y la urea en asociación con biotina y las bases púricas y pirimídicas (Carballo, 2000).

2.2.2.3. Fósforo

Es esencial para el crecimiento, regula la síntesis de los lípidos y los carbohidratos y mantiene la integridad de la pared celular. El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones ortofosfato (PO₄⁻), formado por fósforo y oxígeno. Las fuentes de fósforo en el medio de cultivo están constituidas por el dihidrógenofosfato (KH₂PO₄) o por el hidrógenofosfato disódico (NA₂HPO₄) en una concentración de 0.6 mMg⁻¹ de células para una fermentación óptima (Carballo, 2000).

2.2.2.4. Azufre

Constituye el 0.4 % del peso seco de las levaduras. La fuente de azufre más utilizada por *Saccharomyces cerevisiae* es el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfato; la metionina puede ser utilizada como fuente única de azufre y permite un crecimiento más rápido que los iones sulfatos (Carballo, 2000).

2.2.2.5. Elementos traza

En [0.1–1 mM] de macronutrientes: K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl. (Carballo, 2000).

2.2.2.5.1. Potasio

A pH ácidos estimula la fermentación y la respiración, actúa como efector de numerosas enzimas: *piruvatoquinasas*, *aldolasa*, *aldehído deshidrogenasa* y *permeasa* e interviene en la estructura de los ARN. Las fuentes de potasio son el cloruro potásico y los fosfatos mono y di potásico (Carballo, 2000).

2.2.2.5.2. Magnesio

Es utilizado como activador de las enzimas glicolíticas, estimula la síntesis de ácidos grasos, regula las ATPasas de las membranas y participa con el potasio en la introducción del fosfato. El magnesio es obtenido en los medios de cultivo en forma de sulfato o de Cloruro de Magnesio (Carballo, 2000).

2.2.2.6. Microelementos

Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, Va, en [0.1 – 100 µM] (Carballo, 2000).

2.2.2.7. Inhibidores

Los inhibidores como Hg, Ag, Ar, Ba, Li, Ni, Os, Pb, pueden afectar el crecimiento de la levadura cuando se encuentran en [$> 100\mu\text{M}$] (Tuite & Oliver, 1991).

2.2.2.8. Otros compuestos

Existen otros compuestos como el inositol el cual juega un papel importante en la síntesis de lípidos de membranas; el pantotenato es un factor de crecimiento para *Saccharomyces* y debe adicionarse al medio de cultivo en forma de Pantotenato de Calcio a una concentración de alrededor de 6.25 mgL^{-1} . La vitamina B6 o piridoxina la cual es transformada en Fosfato de Piridoxial y en piridoxamina, que actúan como coenzimas implicadas en la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos. La tiamina (vitamina B1) tiene un papel en el metabolismo respiratorio, el metabolismo de los lípidos, la glucólisis y la fermentación alcohólica.

Las necesidades para *S. cerevisiae* son alrededor de 5 mgL⁻¹ en Tiamina-HCl. La biotina es un factor de crecimiento para levaduras, está implicada en numerosas reacciones anabólicas como la carboxilación del piruvato, síntesis de las bases puricas y pirimidicas, de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, síntesis de las proteínas, de los polisacáridos y de los ácidos grasos. Las necesidades de biotina son del orden de 1 mgL⁻¹ para *S. cerevisiae*. Las otras vitaminas, ácido fólico, ácido p-amino benzoico y riboflavina son normalmente sintetizadas por las levaduras (Carballo, 2000).

2.2.3. APLICACIONES INDUSTRIALES

S. cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia a nivel industrial en el proceso de panificación, elaboración de bebidas fermentadas (vino, cerveza, licores, sake, etc.) y en la producción de etanol; además de ser utilizada en la elaboración de complementos nutricionales, saborizantes, vitaminas, extractos, etc. (Damas, 2010).

2.2.3.1. Bioetanol

Una de las principales aplicaciones del uso de *S. cerevisiae* es en la obtención de etanol el cual es producido por la fermentación de los azúcares presentes en biomasa vegetal. Según el tipo de carbohidrato que contengan, las materias primas pueden ser divididas en biomasa rica en sacarosa, almidón o celulosa. Los cultivos ricos en sacarosa más utilizados son la remolacha (Europa) y la caña de azúcar (Brasil). Entre los cultivos ricos en almidón, el más común es el maíz (sobre todo en EEUU) (Balat, 2011). Se estima que el uso de biomasa lignocelulósica podrá concretarse en 7-10 años, por lo que el bioetanol proveniente de esta fuente se considera un biocarburante de segunda generación lo que incluye el aprovechamiento de residuos agroindustriales (Aimaretti *et al.*, 2012; Martínez-Alcalá, 2012; Sakar *et al.*, 2012; Tayeh *et al.*, 2014; Domínguez *et al.*, 2015).

El proceso de obtención de bioetanol puede llevarse a cabo por diferentes sustratos. Cuando se recurra a las biomasa rica en sacarosa (caña de azúcar, melaza, jugo de frutas), la fermentación se lleva a cabo de manera directa.

Si se emplean materias primas ricas en almidón (maíz, trigo, cebada, sorgo), se debe llevar un proceso de licuefacción y sacarificación que dará lugar a los azúcares fermentables. Si la materia prima empleada son compuestos celulósicos (madera, bagazo de caña) se debe llevar a cabo un proceso de hidrólisis previo a la etapa de fermentación. En la **Figura 3** se presenta un diagrama del proceso de obtención de bioetanol, partiendo de las materias primas mencionadas anteriormente. Normalmente, el proceso involucra tres etapas: i) los sustratos poliméricos son descompuestos a monosacáridos, ii) involucra la fermentación microbiana (por bacterias o levaduras) para convertir los azúcares a alcoholes y iii) el alcohol el cual es recuperado por destilación, es purificado en pasos subsecuentes.

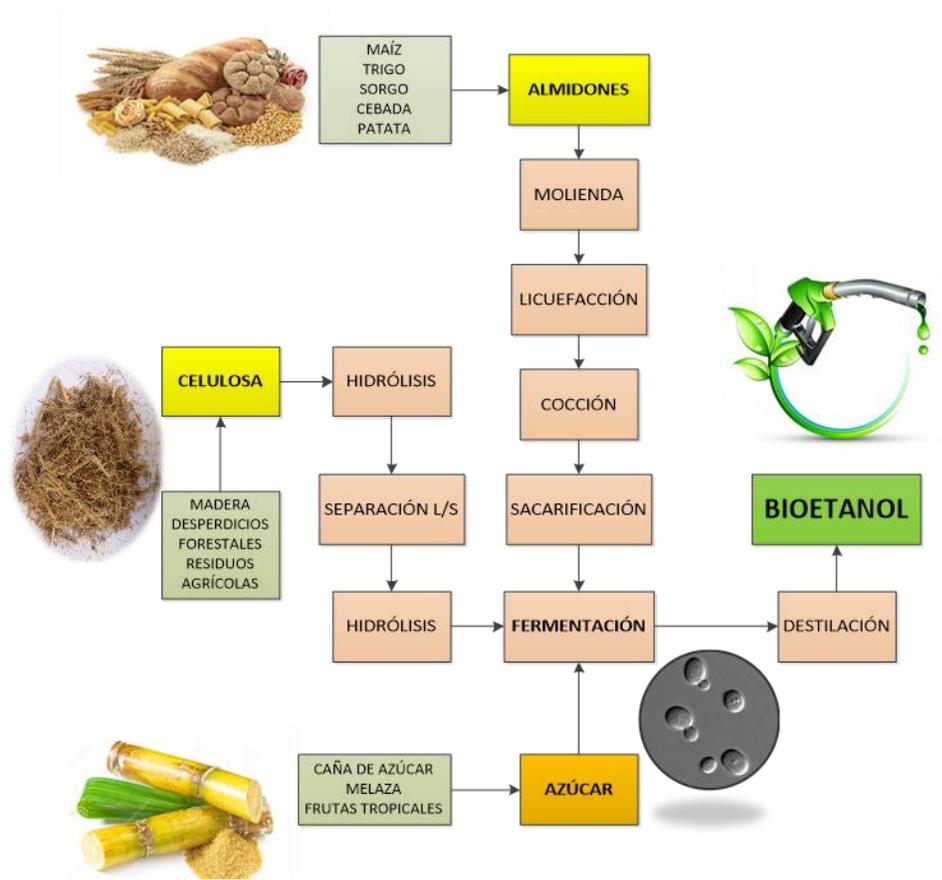


Figura 3. Proceso de obtención de bioetanol a partir de diferentes sustratos.

2.2.4. FACTORES LIMITANTES EN SU PROCESO DE FERMENTACIÓN

2.2.4.1. Concentración de alcohol.

No todas las levaduras presentan la misma sensibilidad a etanol. Las más resistentes son las especies de *Saccharomyces sp.* que se presentan en los procesos de fermentación alcohólica para elaboración de bebidas o la producción industrial de etanol. Según las cepas y el estado fisiológico del cultivo, el etanol es tóxico en concentraciones de 8% (p/v) al 18% (p/v). La tolerancia al etanol depende de la composición en ácidos grasos de las membranas citoplasmáticas. Las células cultivadas en presencia de ácido linoleico toleran mejor el etanol añadido al medio que las células en presencia del ácido oleico (Carballo, 2000).

El etanol intracelular es más tóxico para las células que el etanol extracelular. La viabilidad de los cultivos puede incrementar por la eficiencia de la excreción del etanol, debido a esto, hay una influencia de la presión osmótica: cuando la presión osmótica aumenta en el medio, la secreción del etanol se disminuye considerablemente. En un medio que contiene 30 % (p/v) de sorbitol y 10 % (p/v) de sacarosa, no hay prácticamente ninguna secreción del etanol durante 24 horas mientras que en un medio con presión osmótica baja, el etanol difunde rápidamente. Es así que, la presión osmótica elevada de los medios representa un problema importante en la fermentación alcohólica, que debe ser tenido en cuenta en el procedimiento (Carballo, 2000).

En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma. La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácidos grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso, 2004).

2.2.4.2. pH

El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5.

En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Ríos *et al* 2005).

2.2.4.3. Concentración de Azúcares.

Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos *et al* 2005).

2.2.4.4. Temperatura.

Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar los 50 °C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C (Tuite *et al*, 1991).

2.2.4.5. Oxígeno

El metabolismo de la levadura durante la fermentación depende del oxígeno disuelto en el medio, que es rápidamente consumido. Su disminución provoca una inhibición en la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, disminuyéndose así la biomasa producida y la glicólisis (Alexandre *et al.*, 1995).

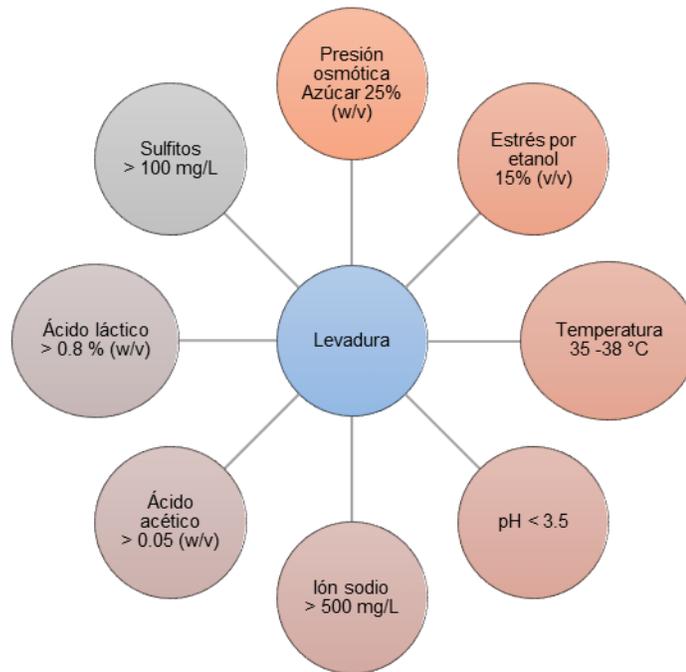


Figura 4. Principales factores de influencia sobre levaduras silvestres (Bai et al., 2008)

2.2.5. METABOLISMO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es un microorganismo que puede llevar a cabo un metabolismo respiratorio o fermentativo (Noor et al., 2003). Este microorganismo convierte la glucosa a etanol a través de la ruta de la glicolisis. (Figura 5). La glicólisis es una vía ubicua para el catabolismo de los monosacáridos. Por cada molécula de hexosa que se convierte a piruvato, hay una producción neta de dos moléculas de ATP a partir de ADP + Pi y dos moléculas de NAD⁺ se reducen a NADH. La glicolisis se puede dividir en dos etapas: una de hexosas, en la cual el ATP es consumido, y una etapa de triosas, en la cual se obtiene una ganancia neta de ATP.

En la fermentación alcohólica la producción de etanol el acetaldehído es descarboxilado a etanol por la enzima *alcohol deshidrogenasa*, con liberación de NAD⁺ proveniente de la etapa de la glucolisis. El etanol y CO₂ son productos finales de la fermentación alcohólica y su ecuación general es la siguiente:



La conversión de glucosa en etanol y CO₂ produce 2 moles de ATP por mol de glucosa transformada (Pfeiffer *et al.*, 2014).

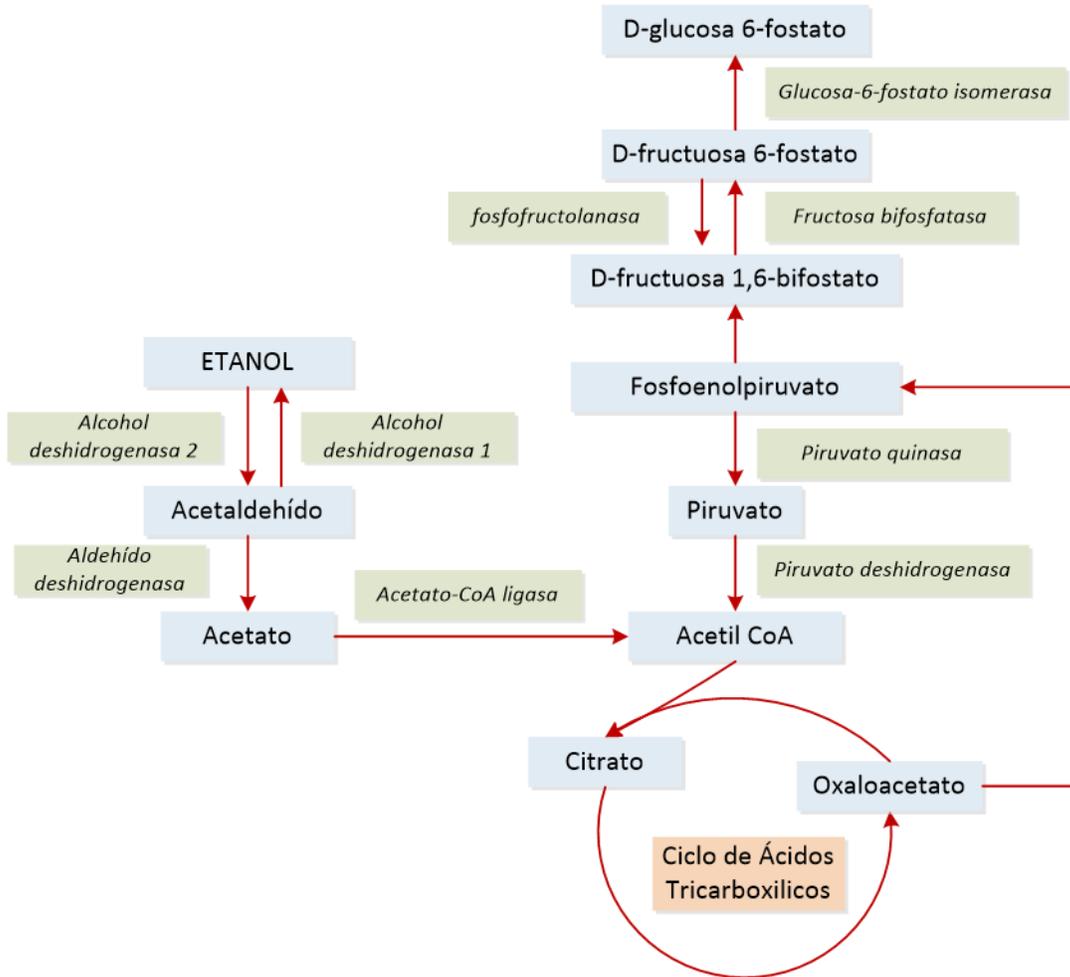


Figura 5. Ruta metabólica de la glicólisis en *S. cerevisiae* (Barnett *et al.*, 2005 modificado)

2.2.6. EFECTOS METABÓLICOS

En su metabolismo, *S. cerevisiae* presenta dos efectos metabólicos principales. Por un lado se encuentra el efecto Pasteur, el cual es el responsable de regular el metabolismo de *S. cerevisiae* hacia un proceso respiratorio o fermentativo dependiendo si hay presencia o no de oxígeno (Pasteur, 1861). Por muchos años, el efecto Pasteur tuvo gran importancia debido a que según ciertas condiciones ambientales permitía orientar un proceso hacia un proceso respiratorio para la generación de biomasa (condiciones aeróbicas) o hacia fermentación alcohólica (condiciones anaerobias).

Sin embargo, poco tiempo después se descubrió que cuando *S. cerevisiae* se encontraba en fase de crecimiento exponencial, en presencia de altas concentraciones de glucosa, el efecto Pasteur no tenía oportunidad de trabajar porque a estas condiciones la degradación de glucosa procedía solamente vía fermentativa (Deken, 1966). A este fenómeno se le conoce como “contra-efecto Pasteur” o “*Efecto Crabtree*”.

2.2.6.1. Efecto Pasteur

En condiciones aerobias aumenta la biomasa y se produce poco alcohol, pero en anaerobiosis el crecimiento celular es lento y la producción de etanol es alta. Por esta razón, la oxidación completa de la fuente de carbono a CO₂ y H₂O presenta una producción celular óptima, donde el oxígeno es el aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa durante la respiración. Es así, que en concentraciones altas de oxígeno disuelto la fermentación de azúcar a etanol es inhibida. Esta situación fue observada por Pasteur en 1861, y se denomina efecto Pasteur.

En el efecto Pasteur, la velocidad de consumo de glucosa es mucho mayor en condiciones anaerobias que en condiciones aerobias (Pasteur, 1861). Como se mencionó anteriormente, el efecto Pasteur es un indicativo del metabolismo de muchos microorganismos hacia un proceso respiratorio o fermentativo (**Figura 6**).

Sin embargo, en *S. cerevisiae* no es del todo estricto, debido a que esta levadura se considera del tipo respirofermentativo porque tiene la capacidad de adaptarse a ambientes en ausencia o presencia de oxígeno para la generación de biomasa y producción de etanol (Barnett et al., 2005).

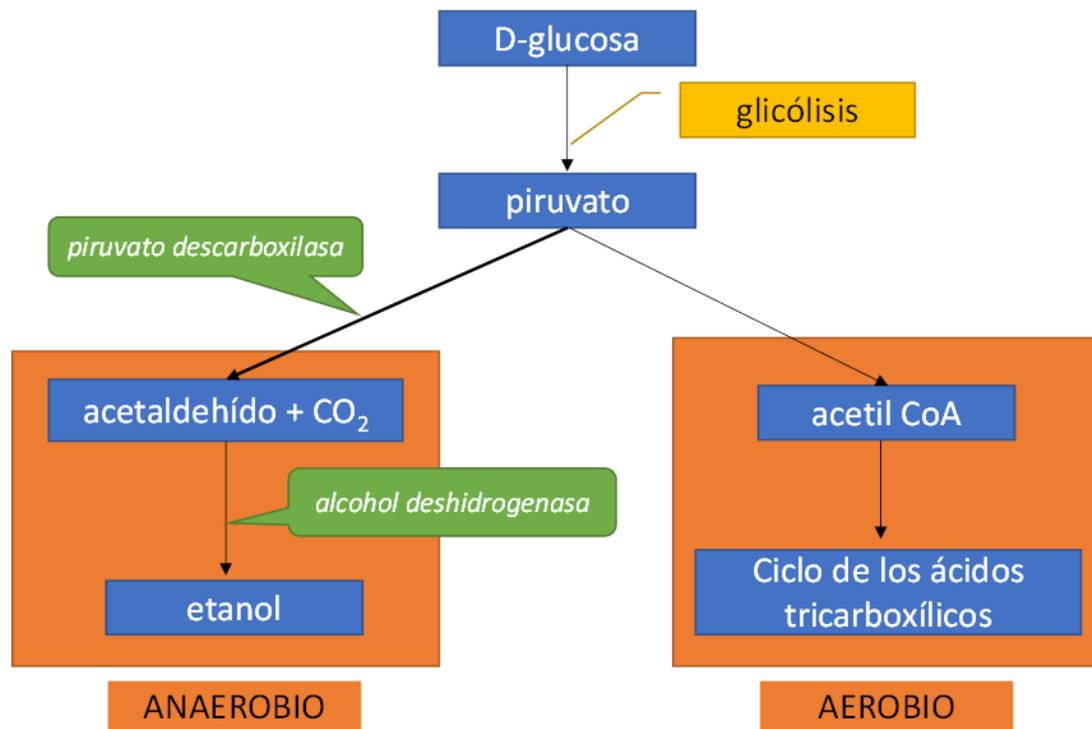


Figura 6. Rutas metabólicas anaeróbicas y aeróbicas del catabolismo de azúcar en levaduras.

(Barnett et al., 2005)

2.2.6.2. Efecto Crabtree

Mientras que la capacidad de degradar los azúcares a través de la fermentación permite a las levaduras adaptarse a ambientes anóxicos, el uso de la fermentación no se limita a tales condiciones. Algunas especies de levadura como *S. cerevisiae* llevan a cabo procesos de fermentación incluso en presencia de oxígeno, cuando las concentraciones de glucosa son suficientemente altas. El proceso de fermentación en presencia de oxígeno y a altas concentraciones de glucosa se conoce como efecto Crabtree (Crabtree, 1929). El efecto Crabtree es también conocido como un “efecto glucosa”, fue descubierto en 1929 por Herbert Crabtree; en este efecto la mayor parte del piruvato formado en la glicólisis es convertido a etanol, en lugar de ser utilizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, esto se da porque las enzimas respiratorias como la *piruvato deshidrogenasa* son reprimidas y el flujo metabólico se dirige hacia la producción de etanol (**Figura 7**). Se incluyen enzimas respiratorias, enzimas del ciclo glioxilato, enzimas gluconeogénicas y muchas otras.

Dentro del grupo de las levaduras denominadas Crabtree positivas, se encuentra *S. cerevisiae*, la cual, lleva a cabo un proceso fermentativo aún en presencia de oxígeno pero con muy bajo rendimiento de ATP en comparación con la respiración (2 ATP vs 18 ATP por glucosa) (Pfeiffer *et al.*, 2014)

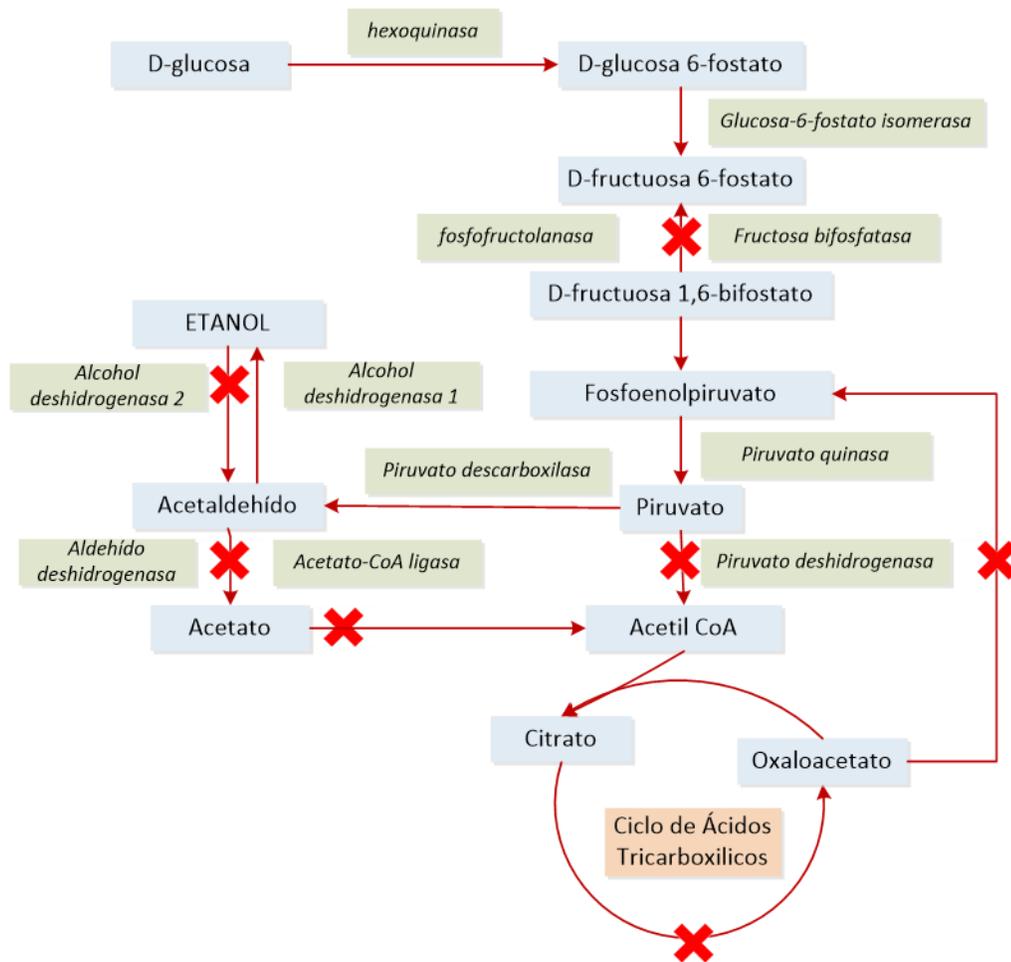


Figura 7. Enzimas reprimidas por glucosa en la ruta metabólica de la glicólisis en *S. cerevisiae* (Efecto Crabtree)

En la **Tabla 1**, se muestra el comportamiento del metabolismo de *S. cerevisiae* a diferentes condiciones ambientales y nutricionales, observándose la diferencia entre el efecto Pasteur y el efecto Crabtree.

Tabla 1. Características metabólicas de *S. cerevisiae* a diferentes condiciones.

	BAJA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA	ALTA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA
BAJO NIVEL DE OXÍGENO DISUELTTO	<p>Bajo Y_{ATP}</p> <p>Bajo $Y_{x/s}$</p> <p>Alto Y_{etanol}</p>	<p>Bajo Y_{ATP}</p> <p>Bajo $Y_{x/s}$</p> <p>Alto Y_{etanol}</p>
ALTO NIVEL DE OXÍGENO DISUELTTO	<p>Alto Y_{ATP}</p> <p>Alto $Y_{x/s}$</p> <p>Bajo Y_{etanol}</p>	<p>Alto Y_{ATP}</p> <p>Bajo $Y_{x/s}$</p> <p>Alto Y_{etanol}</p>

2.2.7. CAMBIO POST-DIAÚXICO

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la **fase lag**, la **fase logarítmica**, el cambio diáuxico, la **fase postdiáuxica** y la **fase estacionaria**. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente (**Figura 8**); en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por litica (Werner *et al.*, 1993).

En la **Tabla 3** se muestran parámetros cinéticos durante el crecimiento postdiaúxico de *S. cerevisiae*.

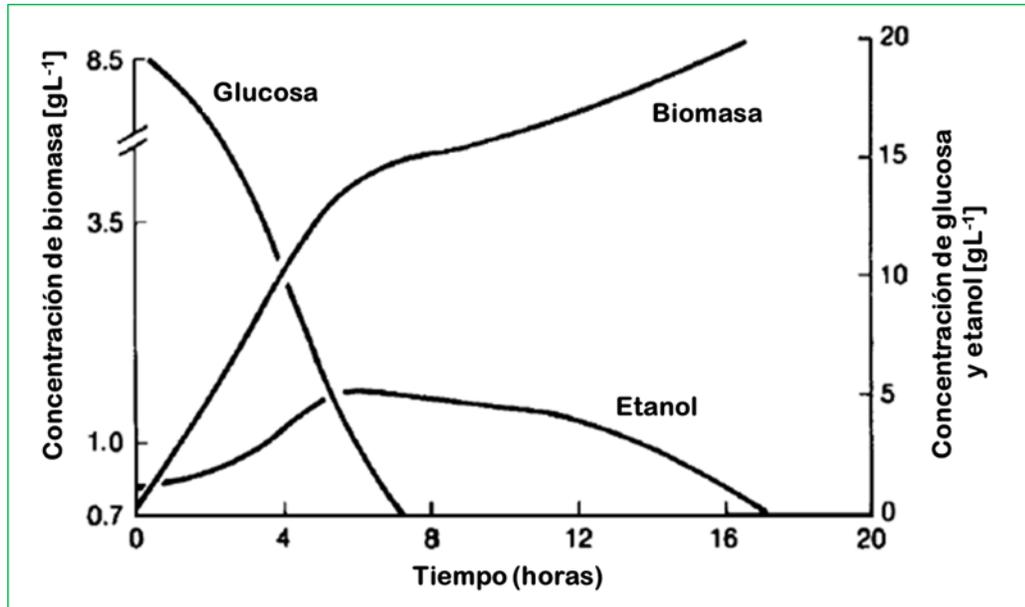


Figura 8. Fase postdiaútica de *S. cerevisiae* en un cultivo aerobio operado en lote (Von Meyerburg, 1968)

Tabla 2. Parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en cambio diaúxico de procesos fermentativos (Von Meyerburg, 1968)

PARÁMETRO / PROCESO	CONSUMO GLUCOSA	CONSUMO ETANOL
μ_{max} [h^{-1}]	0.45	0.20
$Y_{(x/s)}$ [g \times /g g]	0.5	0.65

2.3. MODELADO MATEMÁTICO

La modelación matemática de procesos es una herramienta de gran utilidad para el ingeniero ya que le permite conocer, entender e interpretar el mundo físico en el proceso de toma de decisiones (Villamazar, 2010; Gómez, 2008). Los avances de la computación han permitido el desarrollo de modelos matemáticos cada vez más detallados y precisos que luego se utilizan en el diseño, escalado, optimización y control de procesos de una forma rápida y económica, al reducir los costos por la eliminación de parte del trabajo experimental en la industria (Rivera, 2006).

Un modelo matemático de un proceso se define como *un conjunto de ecuaciones matemáticas que expresan las características esenciales de un fenómeno o proceso*. Estos modelos se caracterizan por su universalidad, empleo de lenguaje preciso y facilidad de manipulación analítica e implementación computacional. Todo modelo posee estructura y parámetros; la primera se refiere a la descripción cualitativa del proceso mediante ciertas ecuaciones y los parámetros son valores constantes que modifican la estructura (Ruíz, 2010).

2.3.1. VISIÓN GENERAL EN BIOPROCESOS

En un reactor biológico se llevan a cabo una serie de procesos, los cuales en su interacción determinan el comportamiento de la fermentación. Tales procesos pueden dividirse en dos clases (Galíndez, 1994):

- Procesos de transferencia (*Transporte*)
- Procesos de transformación (*Conversión*)

Ambos están descritos mediante ecuaciones de velocidad, de transporte o de conversión, respectivamente. Los procesos de transporte se describen mediante ecuaciones que contienen términos de concentración (para transporte a través de los límites de un sistema homogéneo) o bien de gradientes de concentración (para transporte en el interior de un sistema homogéneo). Los procesos de conversión de nutrientes a masa celular, energía y otros productos de reacción, se efectúan por el metabolismo microbiano y son descritos mediante ecuaciones cinéticas. Generalmente los procesos de transferencia y conversión se combinan en las ecuaciones de balance de masa o de energía y tienen la forma general:

$$\text{Transferencia} + \text{Conversión} = \text{Acumulación}$$

2.3.2. MODELADO DE BIOPROCESOS

Una poderosa herramienta para el análisis cinético de procesos, para el diseño de reactores biológicos y en general para el diseño y la evaluación de bioprocesos lo constituye la simulación del comportamiento microbiano dentro de un sistema de reacción.

La predicción de eventos, basados en el uso de modelos matemáticos, se está convirtiendo rápidamente en un importante componente del método científico que permite analizar el comportamiento de un fenómeno bajo diversas perspectivas y condiciones experimentales. La simulación de bioprocesos, basada en modelos matemáticos, permite ahondar en la comprensión de fenómenos complejos poniendo a prueba las hipótesis formuladas y visualizando las trayectorias descritas matemáticamente por el modelo bajo condiciones extremas, o incluso experimentalmente impracticables con resultados a menudo sorprendentes. Mediante la simulación de bioprocesos, basada en modelos biocinéticos, es factible reducir marcadamente la duración y el costo de la investigación para el desarrollo de un proceso biológico.

2.3.2.1. Descripción y aplicación de modelos

Las diversas clases de modelos matemáticos existentes pueden agruparse en pares contrastantes (**Figura 9**) (Galíndez, 1994). Sin embargo, un modelo puede pertenecer a más de una clase.



Figura 9. Clases de modelos matemáticos

2.3.2.1.1. Modelos descriptivos y predictivos

Un modelo **descriptivo** es un sistema que solo da información del comportamiento dentro de los límites experimentales bajo los cuales fue obtenido y no hay garantía que el modelo sea válido en condiciones diferentes a las experimentales. Por otra parte, un modelo **predictivo** permite su utilización bajo condiciones distintas a las experimentales (extrapolación).

Usualmente este tipo de modelo considera algunos mecanismos de funcionamiento del microorganismo y sus constantes poseen significado físico o biológico.

2.3.2.1.2. Modelos estructurados y no estructurados

Los modelos **no estructurados** no toman en consideración la estructura interna de la célula, en tanto que los **estructurados** o *compartimentalizados* si lo hacen. Dado que una población celular cambia su composición macromolecular (RNA, DNA, proteínas, materiales de reserva, enzimas, etc.,) como una respuesta a cambios ambientales, es de esperarse que un modelo no estructurado presente fallas al tratar de describir un proceso fermentativo transitorio en el que las condiciones ambientales se modifican en el tiempo, y con ello la velocidad de síntesis y la concentración de los diversos componentes que constituyen la biomasa. Dada la complejidad estructural de una célula, no es posible definirla sino superficialmente, por lo que es común considerar en el modelo solo un número relativamente pequeño de componentes clave.

2.3.2.1.3. Modelos distribuidos y segregados

En biología, las células han de considerarse como unidades discretas. Sin embargo, en un gran número de modelos tal naturaleza discreta no es tomada en consideración y una población celular en un cultivo es considerada como homogénea. Un modelo **segregado** considera al número de células como una variable que describe a la cantidad de biomasa, en tanto que uno **distribuido** maneja términos de concentración celular como si estas células se encontrasen disueltas en el medio de cultivo.

2.3.2.1.4. Modelos determinísticos y estocásticos

La gran mayoría de modelos utilizados en biología son **determinísticos**. Tales modelos son aplicables cuando se manejan poblaciones con un gran número de individuos. Si se trabaja con poblaciones pequeñas, las diferencias entre organismos pueden tener tal influencia en el comportamiento general de la población que se requiere recurrir a términos probabilísticos para describir su variación. En este caso se estaría manejando un modelo **estocástico**.

2.3.2.1.5. Modelos continuos y discretos

En los modelos **continuos**, las variables cambian continuamente con el tiempo. Aunque muchos sistemas biológicos son **discretos**, al manejarse una gran cantidad de individuos en una población ocurre una dispersión de eventos en el tiempo, por ejemplo la multiplicación celular, lo que permite considerar al fenómeno como si ocurriese de manera continua.

Muchos de los modelos diseñados en biotecnología han sido basados en la hipótesis de la ruta bioquímica. La mayoría de estos enfoques utilizan ecuaciones diferenciales ordinarias (**Figura 10**) para representar la dinámica a nivel intracelular y extracelular, modelando las posibles reacciones bioquímicas mediante balances de masa.

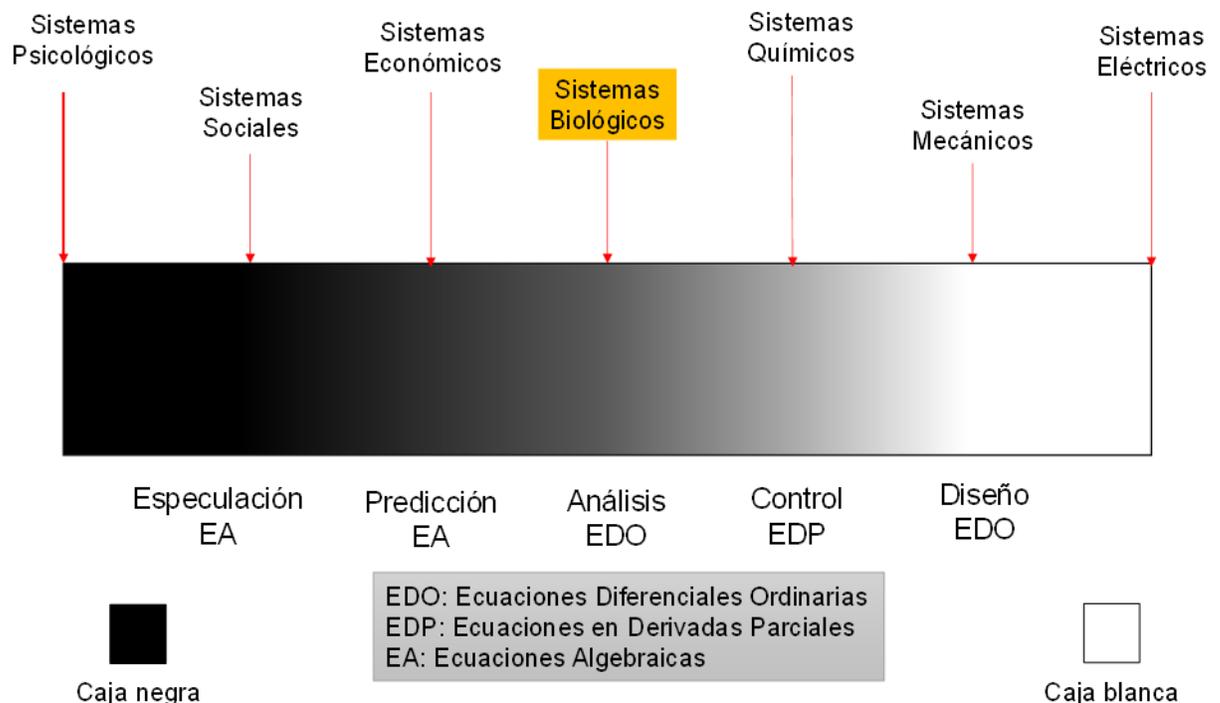


Figura 10. Elección de modelo matemático (López, 2013)

El proceso de para el desarrollo de modelos metabólicos parte de datos experimentales, con los cuales se desarrolla una estructura matemática, la cual, mediante simulaciones lleva a cabo un proceso de ajuste de datos teóricos arrojados por el modelo simulado, con respecto a los datos experimentales (**Figura 11**).

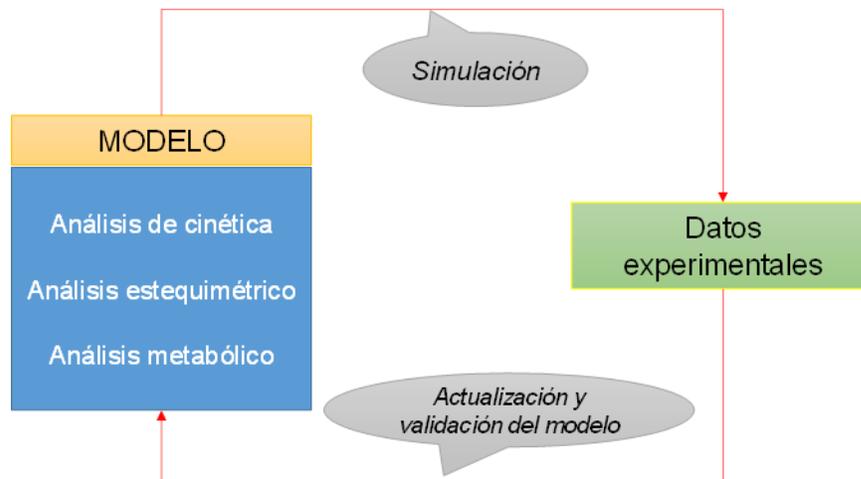


Figura 11. Proceso para el desarrollo de modelos metabólicos (Borodina & Nielsen, 2005)

2.3.3. MODELOS MATEMÁTICOS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *S. cerevisiae*

Hoy en día es común encontrar modelos matemáticos desarrollados para describir procesos de fermentación por *S. cerevisiae* (Tabla 4). La mayoría de los modelos involucran entradas y salidas del sistema de fermentación en diferentes modos de operación, y son pocos los que involucran el desarrollo de modelos estructurados (Kesten *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el modelo de Caro y col. (1991) se desarrollaron dos ecuaciones diferenciales para describir la dinámica de producción de etanol y el consumo del mosto como única fuente de carbono. A diferencia de este, en el modelo de Cramer y col. (2002), se desarrollaron cuatro ecuaciones diferenciales para describir la dinámica de biomasa, etanol, fuente de carbono y fuente de nitrógeno, ellos observaron que una vez que se alcanza la máxima concentración de células viables, la predicción del modelo pasa a través de los datos experimentales, pero no se logra exhibir el comportamiento general del sistema.

Por otro lado, Sainz y col. (2003), desarrollaron un modelo con cinco ecuaciones diferenciales para describir la dinámica de biomasa, etanol, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y glicerol; los resultados experimentales comparados con las simulaciones desarrolladas en base al modelo construido tienen una diferencia del 3% y 14% en los rendimientos totales de producción de etanol y glicerol respectivamente, mejorando la predicción del modelo con los ya reportados anteriormente.

Finalmente, el modelo desarrollado por Kesten y col. (2015), abarca la ruta metabólica de la glicolisis y la ruta del ciclo de TCA, con un total de 49 reacciones, 42 metabolitos, e involucra reacciones enzimáticas y de transporte. La diferencia entre este sistema y los anteriores radica en las consideraciones para establecer las ecuaciones diferenciales utilizadas en el desarrollo de la estructura matemática propuesta.

Sin embargo, pese a la robustez que este tipo de modelos van desarrollando con el paso del tiempo, no se ha logrado una explotación en el desarrollo de modelos matemáticos que involucren aspectos “básicos” e importantes dentro del metabolismo de *S. cerevisiae* como por ejemplo, el cambio diauxico presente durante uno de los efectos metabólicos de esta levadura (Pasteur y Crabtree), los cuales se sabe tienen un impacto considerable en la producción de etanol.

Por lo anterior, la presente investigación se basa en comparar dos procesos de fermentación tradicionales (aerobio y anaerobio) con un tercer proceso de fermentación que opere a condiciones necesarias para reproducir el efecto Crabtree. Como se mencionó anteriormente, una característica importante de este fenómeno metabólico, es que se presenta cuando existen altas concentraciones de azúcar. Se sabe que los medios de cultivo en los que *Saccharomyces cerevisiae* puede crecer presentan concentraciones de azúcar de [10 a 20 gL⁻¹]. Sin embargo ¿qué sucederá a concentraciones mayores a [20 gL⁻¹]?, ¿Son concentraciones suficientes como para que se presente el fenómeno conocido como efecto Crabtree? Dado estas incógnitas, se plantea una estrategia experimental para evaluar este efecto bajo un umbral de altas concentraciones de glucosa inicial, considerando como “altas concentraciones” mayores a [20 gL⁻¹], por lo que dicho umbral de concentraciones será de [20 a 60 gL⁻¹]. Datos que permitirán el desarrollo de una estructura matemática que sirva como base para el análisis de este fenómeno en concentraciones mayores a los [60 gL⁻¹].

Tabla 3. Modelos matemáticos de *S. cerevisiae* en la obtención de etanol.

SISTEMA	MODELO	OPERACIÓN	R ²	REFERENCIA
Fermentación alcohólica de mosto	MNE: 2 ecuaciones	CL	NR	Caro <i>et al.</i> , 1991
Crecimiento de la levadura	MNE: 2 ecuaciones	CL, CC	NR	Keenneth <i>et al.</i> , 1999
Crecimiento por pH-auxostat	MNE: 3 ecuaciones	CL, CC	NR	Pham <i>et al.</i> , 1999
Fermentación del vino con limitación de N ₂	MNE: 4 ecuaciones	CL	NR	Cramer <i>et al.</i> , 2002
Metabolismo de la levadura	MNE: 5 ecuaciones	CL	NR	Sainz <i>et al.</i> , 2003
Crecimiento en Vino	MNE: 4 ecuaciones	CL	NR	Del Nobile <i>et al.</i> , 2003
Efectos de N ₂ asimilable y T en fermentación	MNE: 4 ecuaciones	CL	NR	Malherbe <i>et al.</i> , 2004
Sistema Dispersión Polifásica	MNE: 2 ecuaciones	CL	0.96	Jacques, 2004
Sacarificación y fermentación simultánea, cepa recombinante	MNE: 3 ecuaciones	CL	NR	Kroumov <i>et al.</i> , 2006
Fermentación del tequila	MNE: 3 ecuaciones	CL	0.98	Arellano-Plaza <i>et al.</i> , 2007
Efectos de T, pH y [S] en los parámetros de crecimiento	MNE: 3 ecuaciones	CC	0.81	Arrollo-López <i>et al.</i> , 2009
Producción de etanol a partir de jugo de remolacha roja bajo condición de estrés térmico y ácido.	MNE: 3 ecuaciones	CL	0.98	Jiménez-Islas <i>et al.</i> 2014
Metabolismo aeróbico durante pulso de glucosa	ME: 49 ecuaciones	CL	NR	Kesten <i>et al.</i> , 2015
Fermentación a partir de jugo de sorgo dulce en sistema inmovilizado	MNE: 3 ecuaciones	CL, CC	0.98	Ariyajaroenwong <i>et al.</i> , 2016

CL: Cultivo por lote, CL: Cultivo Continuo

MNE: Modelo no estructurado, ME: Modelo estructurado

NR: No reportado

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una gran cantidad de procesos industriales enfocados en la producción de etanol con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Existe incluso, una gran cantidad de estrategias biotecnológicas desarrolladas para incrementar la productividad de este metabolito (por ejemplo modificación genética, mutagénesis, evaluación de diferentes sustratos, etc.), las cuales, la mayoría de las veces resultan económicamente poco viables para desarrollarse en un proceso industrial. Por otra parte, se ha dejado de lado la factibilidad que tiene el estudio y la aplicación de los efectos metabólicos presentes en *S. cerevisiae* para la producción de etanol; de los cuales se ha encontrado que el efecto Crabtree es el que mayor impacto tiene para incrementar la producción de este metabolito dentro de un proceso. Sin embargo, a pesar de ser un efecto metabólico conocido por más de una década, no se ha aplicado como estrategia industrial para incrementar la producción de etanol. Es por ello que resultará interesante realizar una evaluación a diferentes condiciones iniciales de fuente de carbono que permitirá tener un criterio más amplio de este efecto en la producción de etanol.

4. HIPÓTESIS

Los procesos de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se lleven a cabo bajo condiciones para inducir el efecto Crabtree tendrán un incremento en la producción de etanol.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un análisis teórico y experimental del metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para encontrar las mejores condiciones de operación en las cuales se logre un incremento en la producción de etanol.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Comparar la producción de etanol en un proceso aerobio, anaerobio y un proceso bajo condiciones del efecto Crabtree.
- ii. Analizar el comportamiento cinético que *Saccharomyces cerevisiae* tiene bajo condiciones del efecto Crabtree dentro de un umbral de diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono en un cultivo por lote.
- iii. Desarrollar un modelo matemático de tres estados, que integre los datos experimentales obtenidos y que comprenda el cambio postdiauxico presente durante el efecto Crabtree.

6. METODOLOGÍA

6.1. METODOLOGÍA GENERAL.

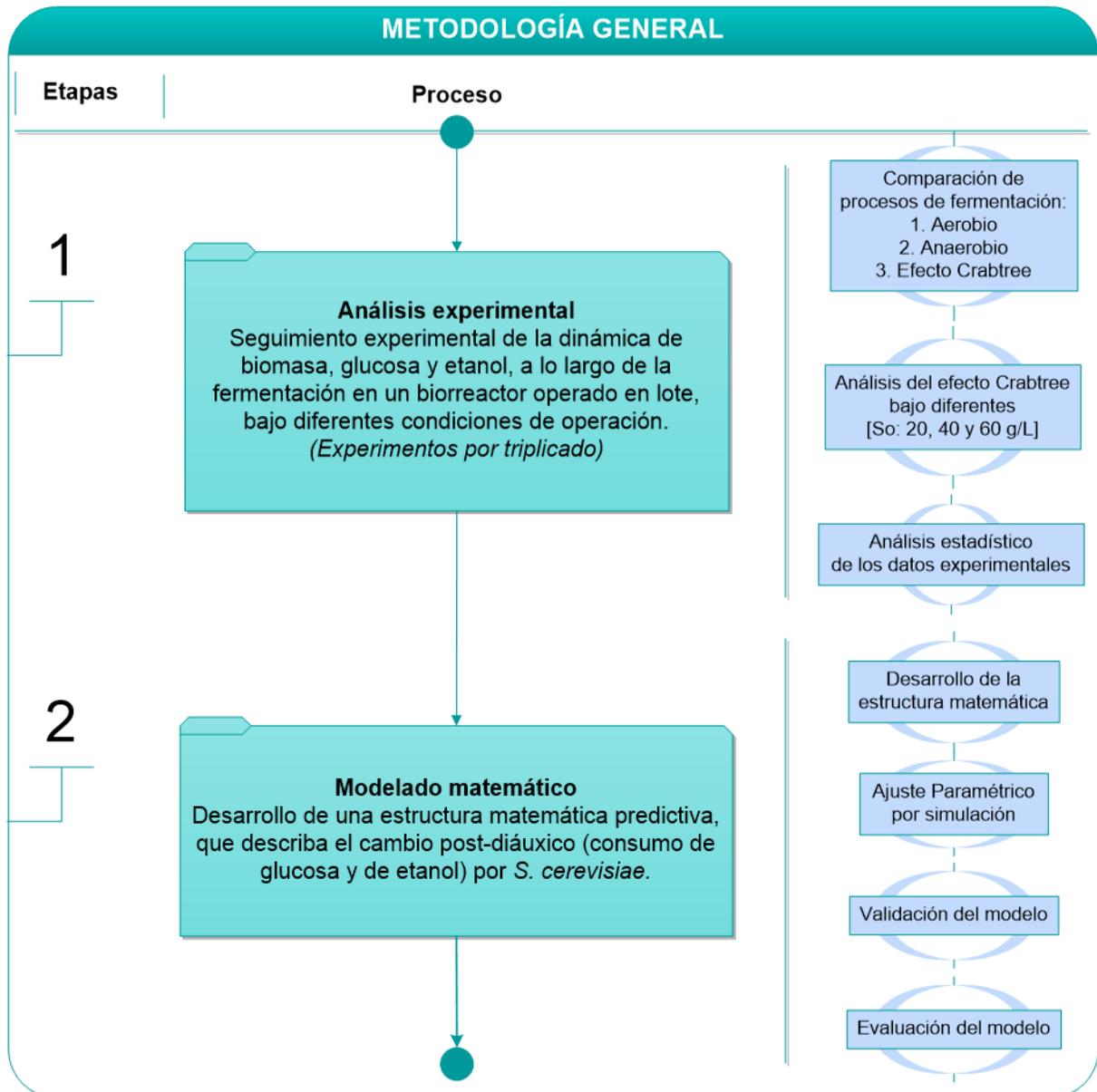


Figura 12. Metodología general del proyecto de investigación

6.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA 1: ANÁLISIS EXPERIMENTAL

6.1.1.1. Microorganismo

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CDBB790 obtenida de la Colección de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN.

6.1.1.2. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 250 mL de medio de cultivo YM (10 gL⁻¹ de glucosa, 3 gL⁻¹ de extracto de malta, 5 gL⁻¹ de peptona de caseína y 3 gL⁻¹ de extracto de levadura), a temperatura constante de 30 °C y con una velocidad de agitación de 150 rpm durante 24 h. Después de las 24 h el medio en fase de crecimiento exponencial fue inoculado a una concentración del 10% v/v en el biorreactor con un volumen de operación de 2.5 L de medio de cultivo YM.

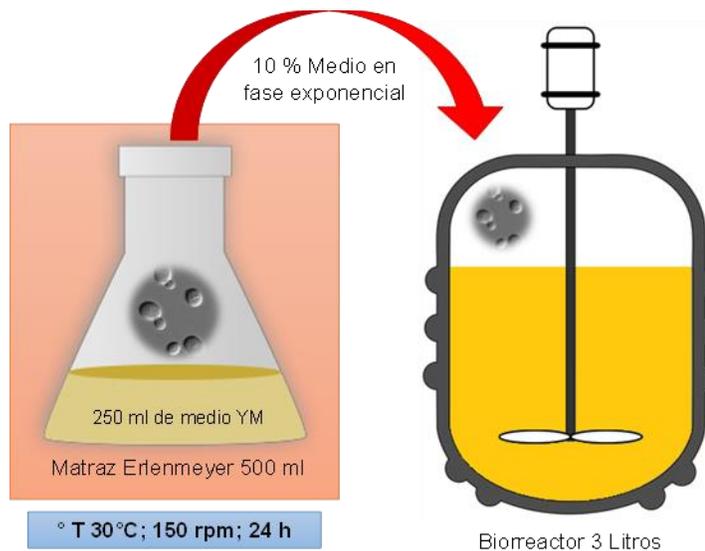


Figura 13. Desarrollo preparación del inóculo

6.1.1.3. Comparación de procesos de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en un biorreactor STR marca APPLIKON® de 3 L de capacidad total. Las condiciones de operación para cada fermentación fueron (**Figura 14**):

- a. **Fermentación aerobia:** aireación al 70 %, temperatura de 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 150 rpm y concentración inicial de glucosa (S_0) de 10 gL^{-1} .
- b. **Fermentación anaerobia:** aireación al 0%, temperatura de 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 150 rpm y $S_0 = 10 \text{ gL}^{-1}$.
- c. **Fermentación bajo el efecto Crabtree:** aireación al 100%, temperatura de 30 ± 0.2 °C, pH de 5 y $S_0 = 60 \text{ gL}^{-1}$.

Se tomaron muestras cada dos horas durante 48 h y en cada muestra se determinó biomasa total, consumo de sustrato y producción de etanol.

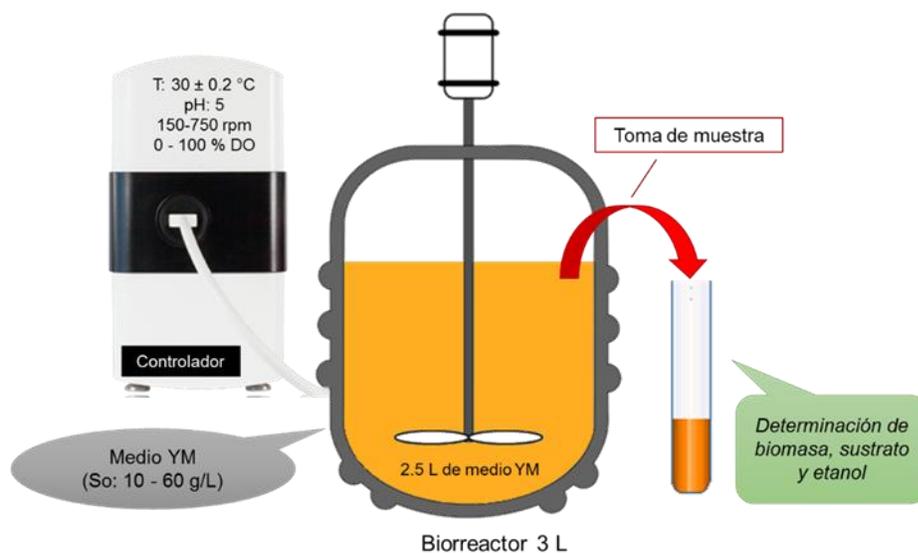


Figura 14. Esquema experimental de la comparación de procesos fermentativos

6.1.1.4. Fermentaciones bajo condiciones del efecto Crabtree

Las condiciones de operación con las cuales trabajo el biorreactor* fueron: temperatura de 30 ± 0.2 °C, pH de 5, agitación de 750 rpm para asegurar la saturación de oxígeno y concentraciones iniciales de glucosa de 10 (control), 20, 40 y 60 gL^{-1} , se tomaron muestras cada dos horas durante las primeras 48 h y posteriormente cada 12 h hasta los 5 días y en cada muestra se determinó biomasa total, consumo de sustrato y producción de etanol. (**Figura 15**).

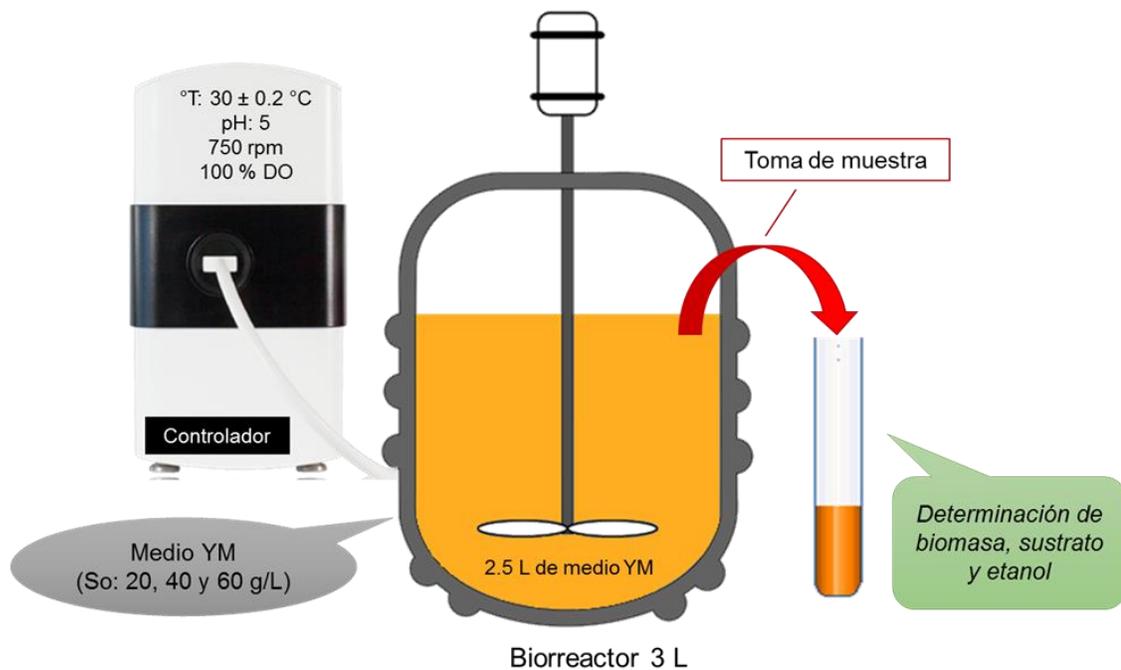


Figura 15. Esquema experimental de las fermentaciones a condiciones del efecto Crabtree

* Las características generales del biorreactor marca APPLIKON®, se describen en el apartado de ANEXOS (Sección A)

6.1.1.5. Métodos de análisis

6.1.1.5.1. Determinación de peso seco

La determinación de biomasa se llevó a cabo por el método de peso seco, para ello se tomaron 5 mL de muestra, la cual fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 min en una centrífuga clínica marca SOLBAT, el paquete celular se re-suspendió, se lavó con 3 mL de agua destilada y se centrifugó nuevamente, esta operación se realizó 2 veces más; posteriormente el paquete celular se filtró en membranas de acetato de celulosa MilliporeMR con 0.45µm de diámetro de poro puestas previamente a peso constante, las membranas que contienen el paquete celular se dejaron secar por 24 h a 60°C.

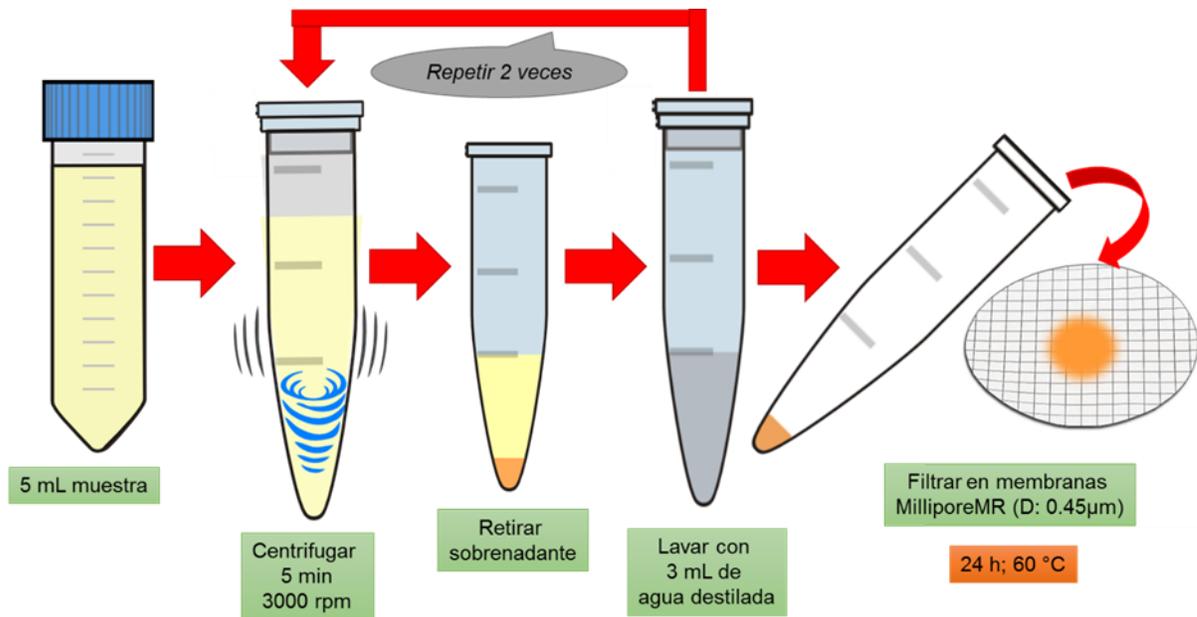


Figura 16. Esquema experimental de la determinación de biomasa por peso seco

6.1.1.5.2. Determinación de número de células.

Se toma 1 mL de muestra, esta se lleva a 10 mL de volumen total con agua destilada. De la dilución previamente preparada, con una pipeta Pasteur se toma una pequeña muestra la cual se coloca en la *cámara de Neubauer* y se realiza el conteo celular en la cuadrícula central de la cámara, el conteo se realiza de ambos pozos y se promedia. Se utiliza un microscopio óptico de luz para realizar el conteo celular.

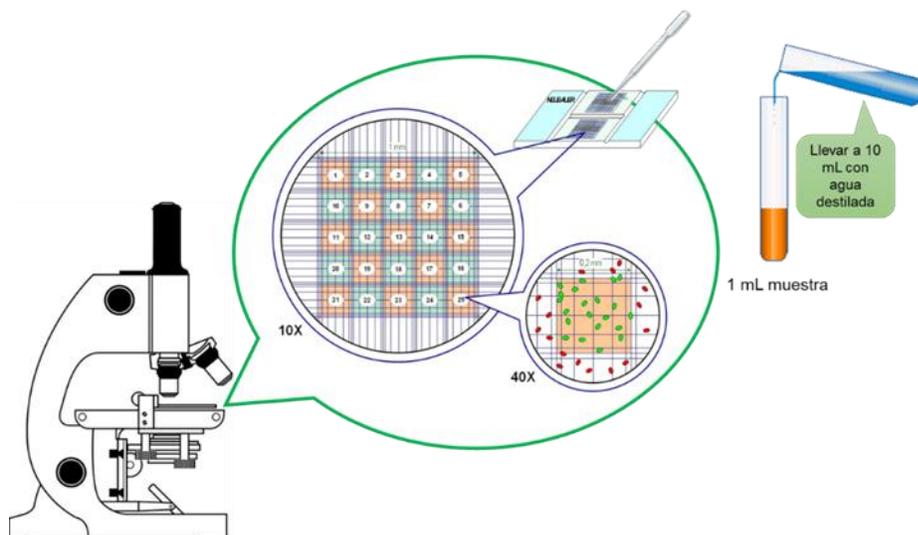


Figura 17. Esquema experimental de la determinación de biomasa por conteo celular

6.1.1.5.3. Densidad óptica

Se toman 3 mL de muestra, se coloca en las celdas de cuarzo y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm para *Saccharomyces cerevisiae*. Como blanco se utiliza medio YM estéril.

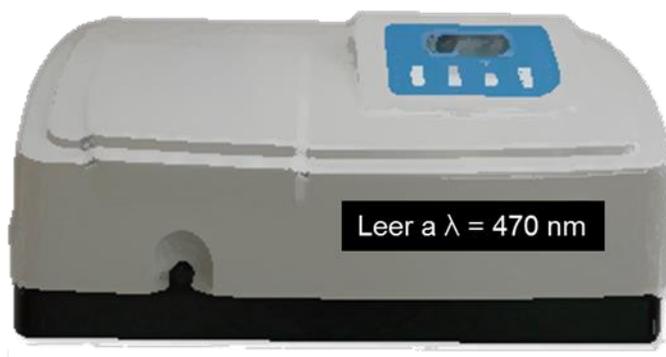


Figura 18. Espectrofotómetro utilizado para la determinación de biomasa por densidad óptica

6.1.1.5.4. Determinación de sustrato.

Para determinar los azúcares reductores residuales en las diferentes muestras tomadas a lo largo de la fermentación, se llevó a cabo la técnica del ácido 2,3-dinitrosalicílico (DNS), también conocida como técnica de Miller (Miller, 1959).

El procedimiento consiste en tomar 2 mL de muestra, se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga, se separa el sobrenadante de la biomasa, se toma 1 mL del sobrenadante y se coloca en un tubo de centrifuga de 15 mL, posteriormente se le adiciona 1 mL del reactivo DNS.

Posteriormente los tubos de centrifuga se tapan y se calientan a ebullición durante 5 min, pasados los 5 min, los tubos se enfrían rápidamente en un baño de hielo por 5 min y se les adicionan 8 mL de agua destilada, finalmente se agitan con un vortex (modelo G-560 Scientific, Inc. MR NY. EEUU) y se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La lectura de densidad óptica se interpola en una curva estándar previamente realizada para conocer la concentración de glucosa de cada muestra.

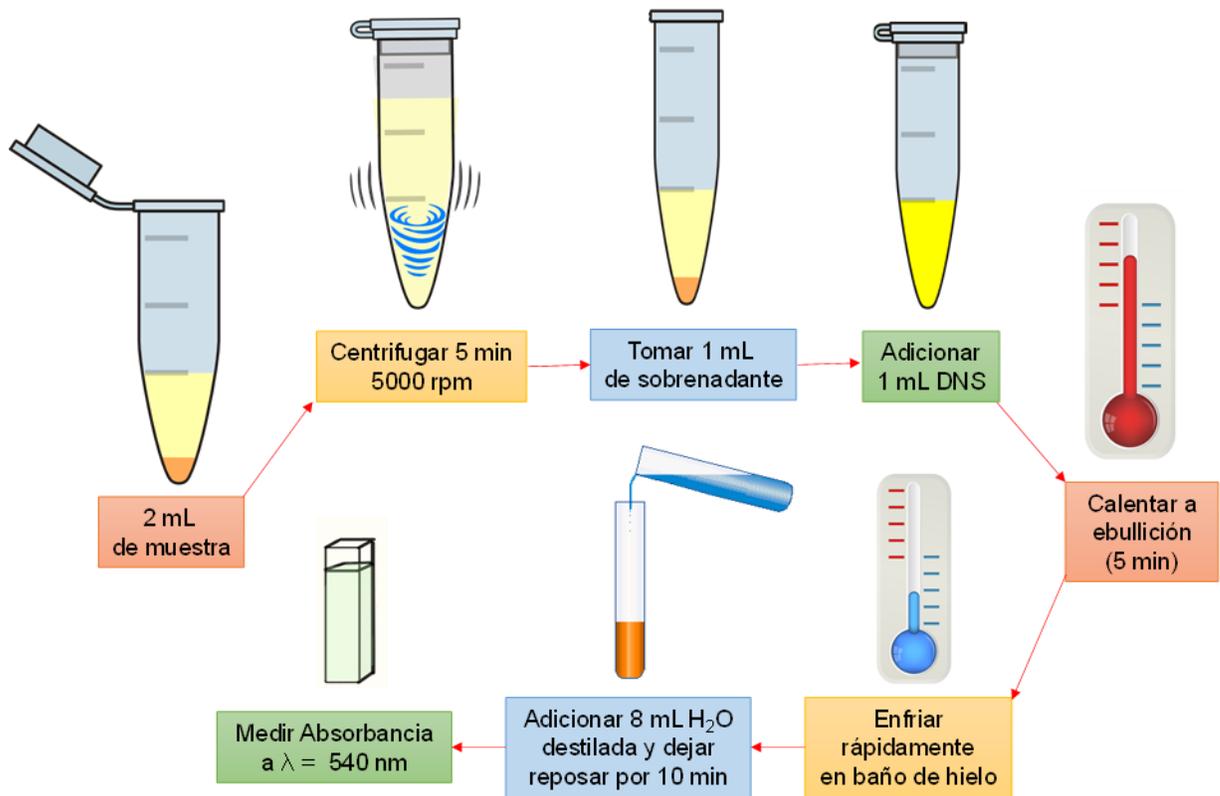


Figura 19. Esquema experimental de la determinación de sustrato por la técnica de Miller (1959) modificada.

Otro método de determinación para los azúcares es por la determinación de °Brix (NMX-F-436-SCFI-2011). Un grado Brix es un sistema de medición específico, el cual representa el porcentaje en peso de azúcar pura en solución. En muestras con alta concentración de azúcar, se deben diluir con agua y la lectura refractométrica debe multiplicarse por el factor de dilución. El procedimiento general consiste en calibrar el refractómetro (**Figura 20, a**) con agua destilada, posteriormente se toma una gota de la solución y se coloca en el refractómetro, se observa la escala del refractómetro y se anota la lectura indicada. La lectura indicada por el refractómetro es igual al °Brix de la muestra.

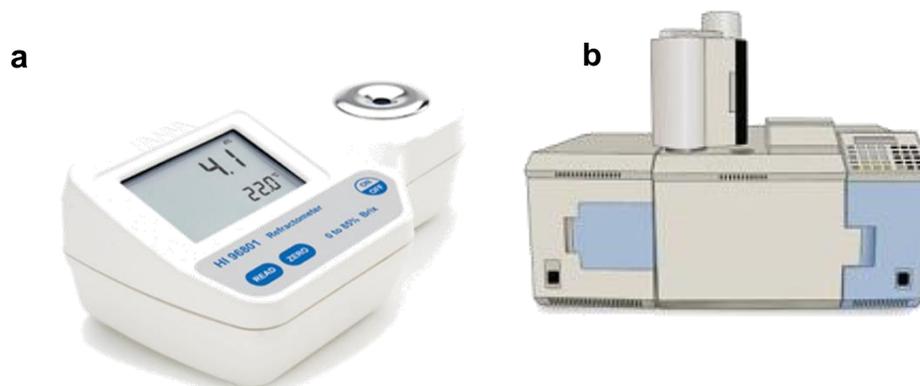


Figura 20. Refractómetro (a) y Cromatógrafo de gases (b).

6.1.1.5.5. Determinación de etanol

El etanol contenido en las muestras se determinó con un cromatógrafo de gases (**Figura 20, b**) Perkin Elmer Autosystem, con una columna de etanol grado HPLC Zebron FFAP-30m, marca 0-25 min, temperatura del detector de 250 °C, temperatura del inyector de 30 °C, temperatura de la columna 60°C durante 9 min-10 °C /min 200 °C - 20 min.

6.1.1.6. Análisis estadístico

Cada fermentación se realizó por triplicado, con estos datos experimentales, se calculó la *desviación estándar* de cada punto, con la finalidad de saber el grado de confiabilidad estadística de los datos experimentales. Además se llevó a cabo un *análisis de ANOVA* y una *prueba estadística de Tukey* para saber si existe o no un impacto estadísticamente significativo en cada una de las fermentaciones bajo las diferentes condiciones ambientales y nutricionales con las cuales se trabajó; tanto para el estudio comparativo de los procesos de fermentación, así como para el análisis del efecto Crabtree bajo un umbral de concentraciones iniciales de fuente de carbono.

6.1.2. DESARROLLO DE LA ETAPA 2: MODELADO MATEMÁTICO

6.1.2.1. Desarrollo de la estructura matemática.

Para el desarrollo de las estructuras matemáticas candidatas a convertirse en el modelo cinético deseado, se parte de considerar la ruta metabólica fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* reportada en literatura por Barnett y col. en 2005. A partir de esta ruta se procede a realizar los balances de masa correspondientes a los compuestos bioquímicos determinados experimentalmente (biomasa, sustrato y producto), los cuales son representados como un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias. El modelo propuesto es del tipo *no estructurado fenomenológico*, el cual considera una velocidad de reacción específica de cada metabolito o compuesto bioquímico determinado de manera experimental.

6.1.2.2. Simulación

Una vez generado el sistema de ecuaciones, y con un conjunto de datos experimentales, se procede a realizar la caracterización paramétrica del mismo, que corresponde a encontrar el valor de cada una de las constantes de ajuste, mediante la técnica de regresión no lineal de Levenberg-Marquardt. Lo anterior se lleva a cabo con simulaciones en el software ModelMaker® 3.0.3 de Cherwell Scientific©. Para discriminar entre los diversos conjuntos de parámetros generados se efectuó un análisis de regresión global contra el conjunto de datos experimentales con el cual se llevó a cabo el ajuste.

6.1.2.3. Validación

Para llevar a cabo la validación del modelo, se considera la versión final del modelo construido y se evaluó su capacidad predictiva al realizarse análisis *in silico* bajo condiciones diferentes a las utilizadas para desarrollar la identificación paramétrica. Estas condiciones corresponden a los otros dos juegos de datos obtenidos experimentalmente.

6.1.2.4. Evaluación del modelo.

La evaluación del modelo se llevó a cabo con un análisis comparativo de los resultados predichos por el modelo cinético construido a partir de un análisis *in silico* a diferentes condiciones iniciales [60, 90 y 180 gL⁻¹] contra datos experimentales reportados en literatura por Arellano y col. (2007).

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. ANÁLISIS EXPERIMENTAL

7.1.1. PRODUCCIÓN DE ETANOL EN DIFERENTES PROCESOS DE FERMENTACIÓN.

El desarrollo experimental realizado en esta etapa consistió en analizar la producción de etanol de tres procesos de fermentación diferentes: proceso aerobio, anaerobio y el proceso fermentativo a condiciones de operación para inducir el efecto Crabtree. La **Figura 21** muestra la cinética de crecimiento. Se puede observar que en el proceso aerobio se llega al estado estacionario a las 24 h de operación, ocurre diferente para el proceso anaerobio, en el cual se llega a la fase estacionaria a las 16 h de operación. Finalmente se observa que en la fermentación a condiciones de operación para inducir el efecto Crabtree existe un incremento de biomasa después de las 48 h de operación.

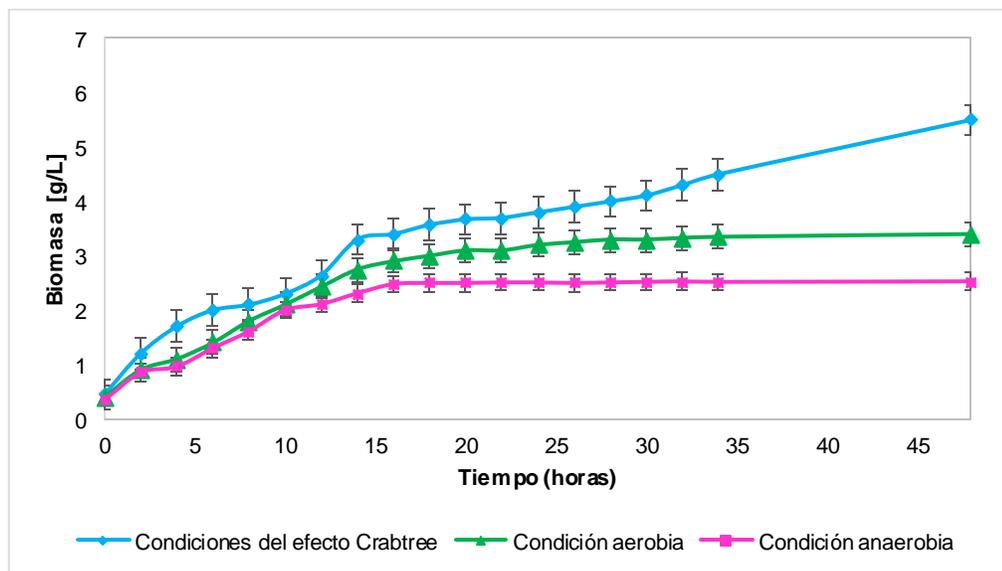


Figura 21. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes procesos de fermentación: aerobio, anaerobio y a condiciones de operación para inducir el efecto Crabtree.

La **Figura 22** muestra el comportamiento del consumo de sustrato en cada uno de los procesos de fermentación, observándose que el consumo de sustrato es más rápido en el proceso anaerobio, seguido del proceso aerobio y finalmente del proceso a condiciones del efecto Crabtree, en donde a las 48 h de operación se llega a un 80 % de consumo de sustrato aproximadamente.

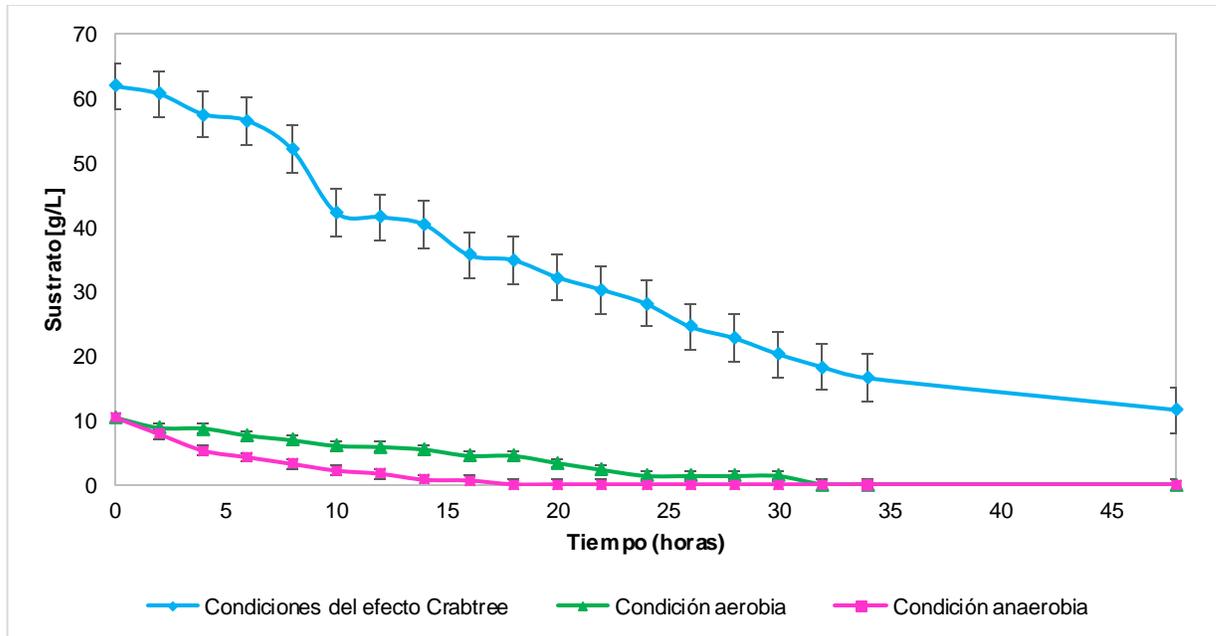


Figura 22. Cinética del consumo de sustrato por *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes procesos de fermentación: aerobio, anaerobio y a condiciones de operación para inducir el efecto Crabtree..

La siguiente figura (**Figura 23**) muestra la producción de etanol a las 24 horas de operación en cada uno de los procesos de fermentación, donde es notorio la capacidad productora de etanol bajo condiciones del efecto Crabtree en comparación a los procesos de fermentación tradicionales para la obtención de este metabolito de interés.

Se muestra que la producción de etanol en condiciones de operación para inducir el efecto Crabtree es de un 85 a 88 % mayor que en los procesos de fermentación aerobio y anaerobio.

Con base en lo anterior se llevó a cabo un análisis estadístico de ANOVA, en el cual se obtiene un valor en el factor $p < 0.05$ (5.96×10^{-24}) indicando que efectivamente existe una diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los procesos de fermentación antes descritos. Con la prueba estadística de Tukey se obtuvo un índice de significancia **a** para el proceso llevado a cabo bajo condiciones el efecto Crabtree; y un índice de significancia **b** para los procesos aerobio y anaerobio, lo cual indica que para los procesos aerobio y anaerobio no existe una diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, para el proceso bajo el efecto Crabtree si existe una diferencia estadísticamente marcada en cuanto a la producción de etanol.

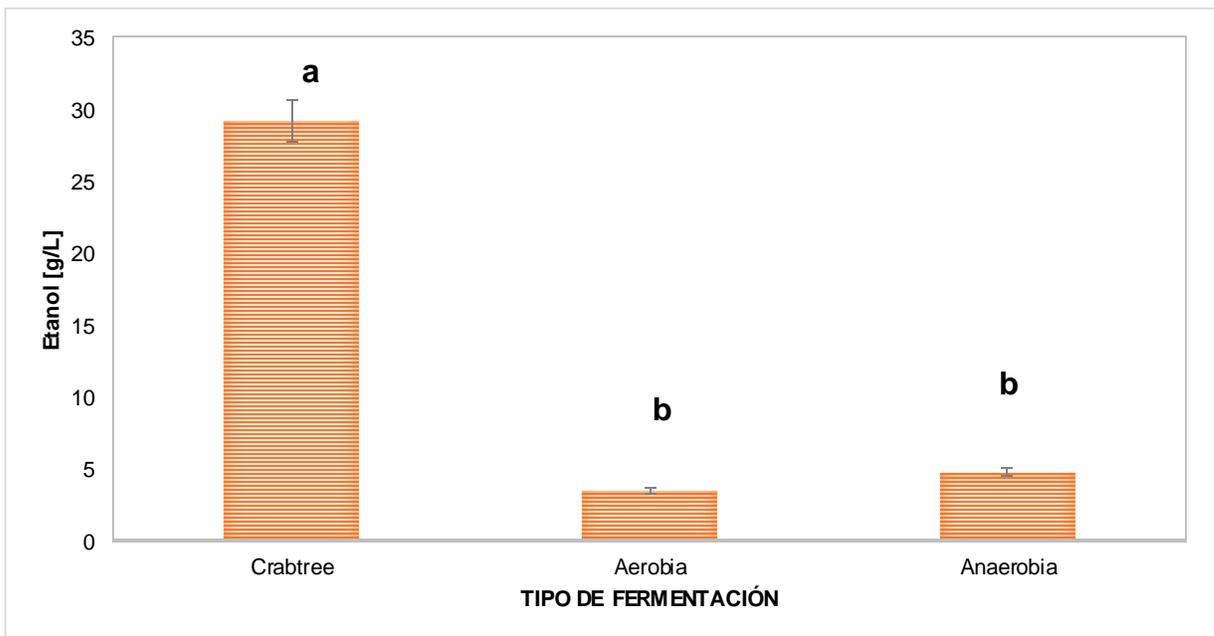


Figura 23. Producción de etanol [g/L] a 24 horas de operación bajo los diferentes procesos de fermentación: aerobio, anaerobio y a condiciones de operación para inducir el efecto Crabtree ($\alpha: 0.05$).

Cuando se trabajó a condiciones anaerobias, se alcanzó un crecimiento máximo de 2.5 gL^{-1} a las 24 h con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.10 h^{-1} ; el consumo del sustrato fue del 100 % aproximadamente con una producción máxima de etanol de 4.7 gL^{-1} . Por otro lado, a condiciones aerobias, se alcanzó un crecimiento máximo de 3.2 gL^{-1} a las 24 h con una μ de 0.12 h^{-1} ; el consumo del sustrato fue del 97 % aprox. y con una producción máxima de etanol de 3.4 gL^{-1} .

Para la fermentación en donde se lleva a cabo el efecto Crabtree, se alcanzó un crecimiento de 3.8 gL^{-1} a las 24 h con una μ de 0.13 h^{-1} ; el consumo del sustrato fue del 80 % aprox., con una producción máxima de etanol de 29.1 gL^{-1} (**Tabla 4**).

En literatura se ha encontrado que en procesos de fermentación aerobios, la producción máxima de etanol ha llegado a 12.8 gL^{-1} a partir de una $[\text{So}: 20 \text{ gL}^{-1}]$ (Kappeli *et al.*, 1986) y para procesos de fermentación anaerobios, la producción máxima de etanol ha llegado a 4 gL^{-1} a partir de una $[\text{So}: 10 \text{ gL}^{-1}]$ (Domínguez *et al.*, 2015).

Tabla 4. Parámetros experimentales obtenidos de cada proceso de fermentación.

Parámetros	Unidades	Aerobio	Anaerobio	Crabtree
$Y_{(x/s)}$	$[\text{g}_x/\text{g}_g]$	0.37	0.25	0.12
$Y_{(e/s)}$	$[\text{g}_e/\text{g}_g]$	0.39	0.45	0.49
$P_{x(24 \text{ h})}$	$[\text{g}_x/\text{Lh}]$	0.13	0.10	0.16
$P_{e(24 \text{ h})}$	$[\text{g}_e/\text{Lh}]$	0.14	0.20	1.21

De la **Tabla 4**, un punto importante a resaltar en los parámetros experimentales es la producción de biomasa y etanol que se tiene a las 24 horas de operación; la producción de biomasa (P_x) a condiciones del efecto Crabtree tiene el valor más alto ($0.16 \text{ g}_x/\text{Lh}$), lo mismo sucede en la producción de etanol (P_e), el valor más alto en un 500 % ($1.21 \text{ g etanol/ Lh}$) se tiene a condiciones del efecto Crabtree.

4.1.2. ANÁLISIS A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE FUENTE DE CARBONO DE LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN DONDE SE PRESENTA EL EFECTO CRABTREE

El desarrollo experimental realizado en esta etapa consistió en analizar la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*, la cinética de consumo de sustrato y de producción de etanol en un intervalo de concentraciones iniciales de fuente de carbono $[\text{So}: 20, 40, 60 \text{ gL}^{-1}]$, con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de operación donde se logra la mayor producción de etanol dentro de este umbral de concentraciones.

En los datos experimentales se observó que a una concentración inicial de glucosa de [20 gL⁻¹] se alcanzó un crecimiento máximo de 3.4 gL⁻¹ a las 24 h, con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.12 h⁻¹ y una producción máxima de etanol de 10.8 gL⁻¹. Por otro lado, a una concentración inicial de glucosa de [40 gL⁻¹] se alcanzó un crecimiento máximo de 3.6 gL⁻¹ a las 24 horas, a una μ de 0.12 h⁻¹ y una producción máxima de etanol de 16.5 gL⁻¹. Finalmente, a una concentración inicial de glucosa de [60 gL⁻¹] se obtuvo un crecimiento máximo de 3.8 gL⁻¹ a las 24 h, una μ de 0.13 h⁻¹ y una producción máxima de etanol de 29.1 gL⁻¹.

En la **Figura 24**, se observa que en cada una de las fermentaciones un comportamiento muy similar. Posterior a 24 horas de operación, en las fermentaciones donde se trabajó a concentraciones iniciales de glucosa de [60 y 40 gL⁻¹], se observa que la biomasa sigue en crecimiento. A diferencia de ello, en las fermentaciones a bajas concentraciones iniciales de glucosa [20 y 10 gL⁻¹] se observa que posterior a 24 h, se llega a la fase estacionaria. Es importante resaltar que en cada una de las fermentaciones realizadas se observó una fase lag muy corta, incluso nula para algunos casos.

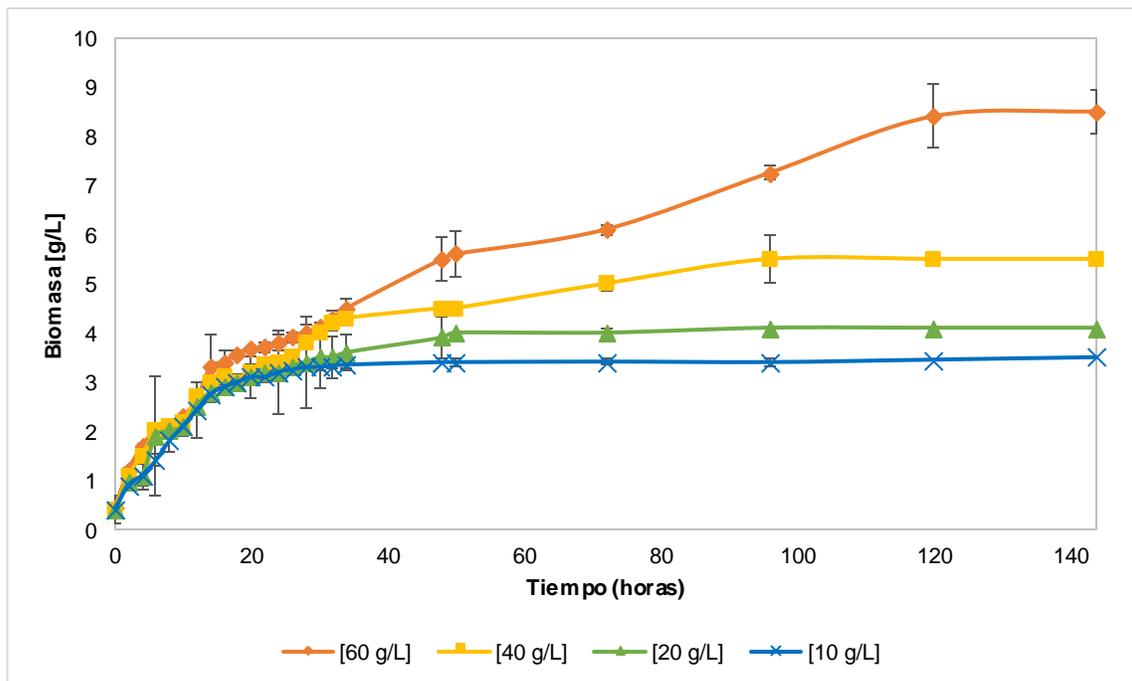


Figura 24. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono en medio YM, 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%

En la **Figura 25** se observa un comportamiento similar. En la fermentación a $[So: 10 \text{ gL}^{-1}]$ el consumo de sustrato al 100% se observa a las 32 h de operación. Para las fermentaciones cuyas concentraciones iniciales de glucosa superan los 10 gL^{-1} el consumo de sustrato total se presenta después de las 72 h de operación.

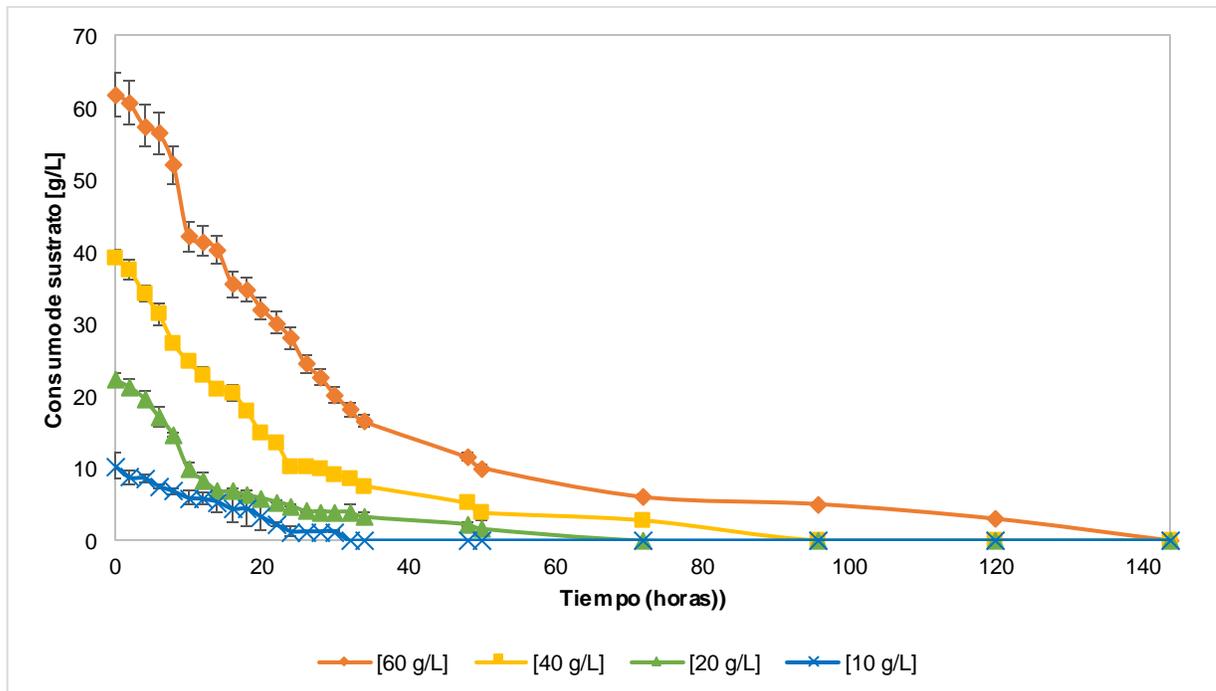


Figura 25. Cinética del consumo de sustrato por *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones iniciales de fuente de carbono en medio YM, $30 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, pH de 5, 750 rpm, DO 100%

En la **Figura 26**, se observa la producción y consumo de etanol para cada una de las fermentaciones a diferentes concentraciones iniciales de glucosa. A concentraciones iniciales de $[60, 40 \text{ y } 20 \text{ gL}^{-1}]$ el consumo de etanol inicia después de 24 h de operación y a una concentración de glucosa inicial de $[10 \text{ gL}^{-1}]$ el consumo de etanol se observa posterior a las 30 h de operación.

Analizando el comportamiento de cada fermentación en esta gráfica con respecto a la gráfica del consumo de sustrato (**Figura 25**), se aprecia que para la fermentación a una concentración inicial de glucosa de $[10 \text{ gL}^{-1}]$, el consumo de etanol inicia cuando la fuente de carbono principal (glucosa) se agota por completo.

En fermentaciones a concentraciones de glucosa superior a los $[10 \text{ g/L}]$, se observa que antes de ser agotada la fuente de carbono principal (glucosa), *S. cerevisiae* utiliza una segunda fuente de carbono (etanol) para mantener su metabolismo.

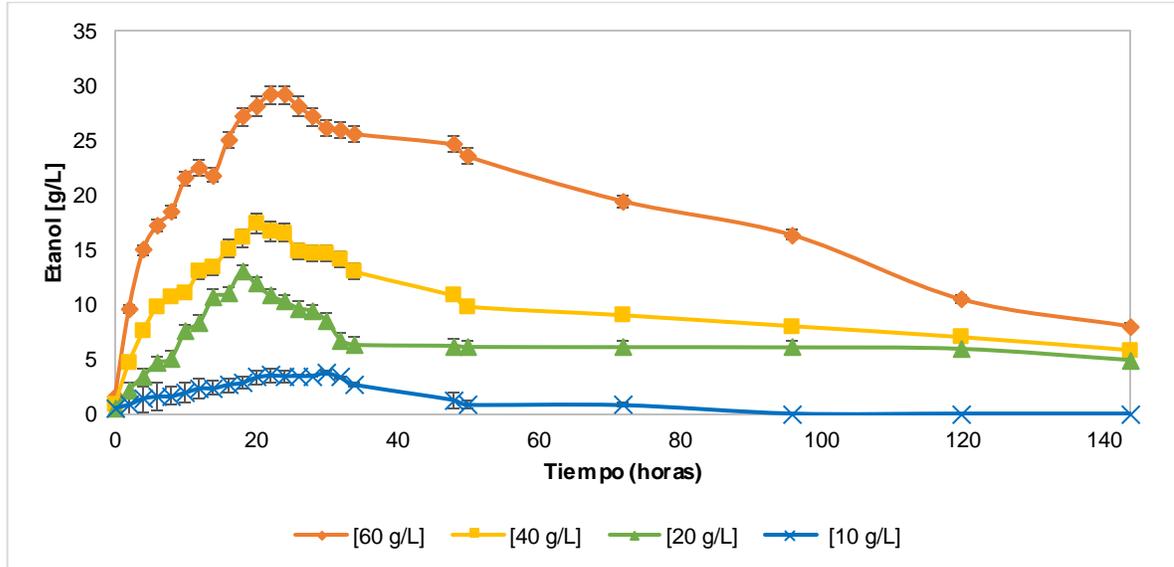


Figura 26. Cinética de la producción y consumo de etanol a diferentes concentraciones iniciales de glucosa por *S. cerevisiae* en medio YM, $30 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, pH de 5, 750 rpm, DO 100%

En la **Tabla 5** y **Figura 28** se muestra la producción de etanol a las 24 h de operación para cada tratamiento, así como rendimiento $Y_{(e/s)}$ y productividad $P_{e(24h)}$. Se observa que las mejores condiciones se dieron con una concentración inicial de glucosa de $[60 \text{ g/L}]$ ya que bajo estas condiciones el $Y_{(e/s)}$ y $P_{e(24h)}$ también fueron mayores.

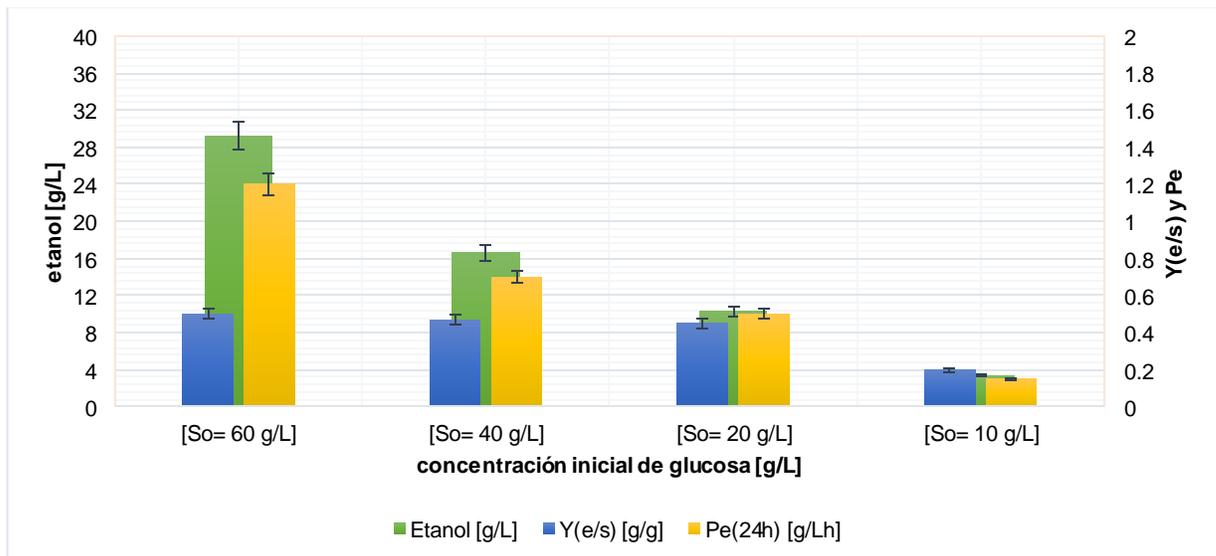


Figura 27. Producción de etanol a las 24 horas de operación.

Para corroborar el dato anterior, se llevó a cabo un análisis de ANOVA, en el cual se obtuvo un valor p de $8.03638E^{-25} < 0.05$ lo que indica que al menos un proceso de fermentación es diferente respecto a los otros. Para validar esta aseveración, se realizó una prueba estadística de Tukey, donde se encontró que cada tratamiento muestra ser estadísticamente diferente, o dicho de otro modo, la concentración inicial de glucosa bajo las condiciones de operación trabajadas tiene un impacto estadísticamente significativo en la producción de etanol.

Tabla 5. Parámetros experimentales obtenidos para cada condición inicial de glucosa en fermentaciones con el efecto Crabtree.

[S ₀]		[10 gL ⁻¹]		[20 gL ⁻¹]	[40 gL ⁻¹]	[60 gL ⁻¹]	
Parámetros	Unidades	Díaz, 2006	González, 2001	González et al., 1996	Este trabajo		
Y _(x/s)	[g _x /g _g]	0.32	0.26	0.14	0.22	0.12	0.12
Y _(e/s)	[g _e /g _g]	0.40	0.20	0.44	0.46	0.47	0.49
P _{x(24 h)}	[g _x /Lh]	0.10	0.12	0.17	0.14	0.15	0.16
P _{e(24 h)}	[g _e /Lh]	0.15	0.11	0.52	0.45	0.69	1.21

De la **Tabla 5**, es importante resaltar que la producción de biomasa y etanol que se tiene a las 24 horas de operación en cada una de las concentraciones iniciales de fuente de carbono. La producción de biomasa (P_x) a condiciones iniciales de glucosa de [60 gL⁻¹] bajo el efecto Crabtree tiene el valor más alto (0.16 g_x/Lh), lo mismo sucede para la producción de etanol (P_e), donde el valor más alto (1.21 g_e/Lh) se tiene a estas mismas condiciones iniciales. A pesar de que el efecto Crabtree fue descubierto hace poco más de 50 años, son muy pocos los reportes experimentales que se tienen al respecto. Ejemplo de ello es que en literatura el reporte de la evaluación del efecto Crabtree a las concentraciones iniciales de glucosa propuestas en ese trabajo de investigación, se encontró solo para una concentración de [20gL⁻¹]. En este trabajo, *González y col.* (1989) trabajaron sus fermentaciones a las mismas condiciones de operación, ellos obtuvieron un rendimiento Y_(e/s) de 0.44 g_e/g_g, valor cercano a lo obtenido en este trabajo (0.46 g_e/g_g).

Lo mismo pasa con el valor de la productividad de etanol a las 24 h ($P_{e(24)}$), González y colaboradores obtuvieron una productividad de 0.17 g_e/L, el valor obtenido en ese trabajo fue de 0.14 g_e/Lh. Lo anterior, permite establecer la cercanía de los datos experimentales con lo reportado en literatura.

Por otro lado, para descartar la idea de que la glucosa es el único factor responsable de incrementar la producción de etanol, se compararon los parámetros experimentales obtenidos en este trabajo con parámetros reportados por *González (2001)* y *Díaz (2006)*. En ambos reportes se trabajaron a condiciones de operación similares a las de este trabajo, pero a una concentración baja de glucosa [10 gL⁻¹]. Como se muestra en la **Tabla 5**, los rendimientos $Y_{(e/s)}$ y $P_{e(24)}$ obtenidos fueron de 0.20 g_e/g_g y 0.11 g_e/Lh respectivamente para *González (2001)* y $Y_{(e/s)}$ de 0.4 g_e/g_g y $P_{e(24)}$ de 0.15 g_e/Lh para *Díaz (2006)*. Los valores anteriores, comparados con los valores obtenidos a concentraciones de glucosa de [20, 40 y 60 gL⁻¹], muestran que el efecto que tiene la concentración de glucosa no es el único factor responsable de aumentar la producción de etanol, de ser así los rendimientos para cada fermentación se hubieran mantenido iguales y sólo hubiera cambiado la producción máxima de etanol. Sin embargo, no ocurrió de esta manera, ya que el tener altos rendimientos y productividades de etanol, engloba tanto una concentración alta de glucosa como condiciones ambientales tales que sean factores de inducción del efecto Crabtree. Lo anterior se observa en los valores de $Y_{(e/s)}$ y P_e de la **Tabla 5**.

7.2. MODELADO MATEMÁTICO

7.2.1. ESTRUCTURA MATEMÁTICA

Para el planteamiento del conjunto de las ecuaciones diferenciales que conformaron el **modelo cinético no estructurado fenomenológico** primero se analizó la ruta metabólica de producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se presenta a continuación:

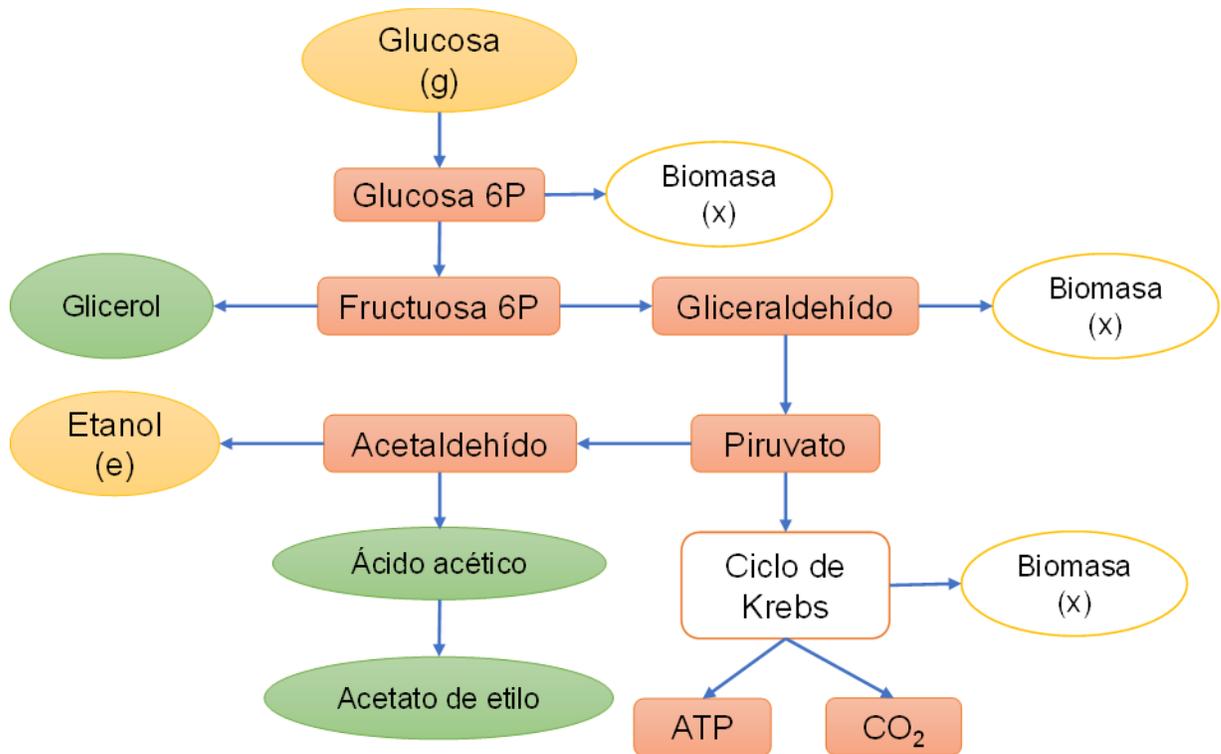


Figura 28. Esquema ruta metabólica simplificada de la producción de etanol por *S. cerevisiae*

En el esquema (**Figura 28**) se puede apreciar que el flujo de carbono proveniente de glucosa se concentra en dos nodos metabólicos importantes, por un lado se tiene la síntesis de *fructuosa 6P*, la cual es un compuesto precursor de dos productos principales: glicerol y glicerinaldehído.

El glicerinaldehído es un producto importante para la síntesis de biomasa y piruvato, quien es el segundo nodo metabólico importante, porque de él se desprenden muchos compuestos importantes para el metabolismo de *S. cerevisiae*, por un lado se tiene que el piruvato es un compuesto necesario para la síntesis de compuestos en el ciclo de Krebs; y por otro lado, del piruvato se sintetizan productos de interés como el ácido acético, acetato de etilo y etanol.

Con respecto a lo anterior, la ecuación de estado para la generación de biomasa se desarrolló bajo la consideración de que solo dependía del consumo de glucosa, además de considerar un crecimiento celular no segregado y con una dinámica poblacional uniforme.

Para la ecuación de estado de etanol, esta se planteó considerando que su formación dependía del consumo de glucosa, y que este solvente a su vez, funcionaba como sustrato para el mantenimiento celular cuando la glucosa se encontraba agotada. Finalmente, la ecuación de estado para el consumo de glucosa se planteó bajo la consideración de que esta es consumida para generar biomasa y producir etanol.

Debido a que en los datos experimentales no se observa inhibición por sustrato ni por producto, se consideró el **modelo de Monod** dentro de las estructuras matemáticas del modelo desarrollado.

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right)$$

Considerando lo anterior, a continuación se muestran las ecuaciones que conforman el modelo matemático desarrollado:

7.2.1.2. Velocidades de reacción:

Velocidad de crecimiento por glucosa:

$$\mu_{xg} = \mu_{maxg} \left(\frac{g}{K_{Sg} + g} \right)$$

Velocidad de crecimiento por consumo de etanol:

$$\mu_{e2} = \mu_{maxe2} \left(\frac{e}{K_{Se2} + e} \right)$$

Velocidad de producción de etanol:

$$r_e = r_{maxe} \left(\frac{g}{K_{S_e} + g} \right)$$

7.2.1.3. Balances:

Biomasa:

$$\left(\frac{dx}{dt}\right) = (\mu_{xg} + \mu_{e2})X$$

$$\left(\frac{dx}{dt}\right) = \mu_{maxg} X \left(\frac{g}{Ks_g + g}\right) + \mu_{maxe2} X \left(\frac{e}{Ks_{e2} + e}\right)$$

Glucosa:

$$\left(\frac{dg}{dt}\right) = - \left[\left(\frac{\mu_{xg} X}{Y_{x/g}} + \frac{r_e}{Y_{e/g}} \right) \right]$$

$$\left(\frac{dg}{dt}\right) = - \left[\left(\mu_{maxg} \left(\frac{X}{Y_{xg}} \right) \left(\frac{g}{Ks_g + g} \right) \right) + \left(r_{maxe} \left(\frac{e}{Y_{eg}} \right) \left(\frac{g}{Ks_e + g} \right) \right) \right]$$

Etanol:

$$\left(\frac{de}{dt}\right) = \left[(r_e - \mu_{e2}) \left(\frac{Y_x}{e} \right) \right]$$

$$\left(\frac{de}{dt}\right) = \left[\left(r_{maxe} \left(\frac{X}{Y_{x/e}} \right) \left(\frac{g}{Ks_e + g} \right) \right) - \left(\mu_{maxe2} \left(\frac{X}{Y_{x/e}} \right) \left(\frac{e}{Ks_{e2} + e} \right) \right) \right]$$

7.3.2. AJUSTE PARAMÉTRICO

El desarrollo del ajuste paramétrico se llevó a cabo por el método de Levenberg-Marquardt realizado con simulaciones en el software ModelMaker® 3.0.3, considerando como patrón el conjunto de datos experimentales obtenidos a [So: 20 gL⁻¹]. Para asegurar un buen ajuste se determinó el coeficiente de correlación global (R²), por el método de mínimos cuadrados, siendo éste último valor calculado como 0.98 para este proceso de fermentación operado en lote.

Tabla 6. Resultado de la identificación paramétrica para el modelo no estructurado mediante el método de Levenberg-Marquardt en base a datos experimentales a [So: 20 gL⁻¹].

Parámetro	Valor	Unidades
kse	0.95	gL ⁻¹
kse2	7.04	gL ⁻¹
ksg	0.88	gL ⁻¹
r _{maxe}	0.14	h ⁻¹
μ _{maxe2}	0.01	h ⁻¹
μ _{maxg}	0.13	h ⁻¹
Y _(e/g)	0.50	g _e /g _g
Y _(x/e)	0.25	g _x /g _e
Y _(x/g)	0.59	g _x /g _g
R ² (biomasa)	0.98	-
R ² (glucosa)	0.97	-
R ² (etanol)	0.98	-
R ² (global)	0.98	-

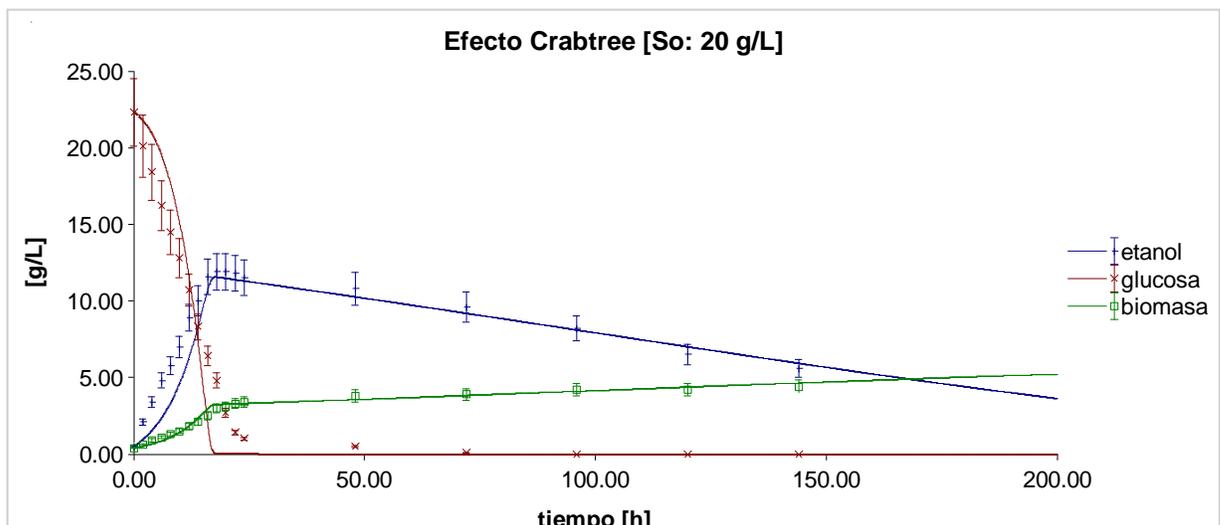


Figura 29. Comparación de datos simulados (línea continua) por el modelo no estructurado fenomenológico y datos experimentales (x●■) reportados en este trabajo, por *S. cerevisiae* bajo las siguientes condiciones: medio YM, [So: 20 gL⁻¹], 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.

7.3.3. VALIDACIÓN DEL MODELO

Una vez teniendo el valor de los parámetros, se procedió a realizar la validación del modelo propuesto. Esto se realizó con simulaciones en el software ModelMaker® 3.0.3 con los conjuntos de datos experimentales obtenidos a $[S_0: 40 \text{ y } 60 \text{ gL}^{-1}]$. Para asegurar el buen ajuste de los datos simulados con los obtenidos experimentalmente se determinó el coeficiente de correlación global (R^2), por el método de mínimos cuadrados, siendo estos valores de 0.94 y de 0.97 para los procesos de fermentación operados en lote de $[40 \text{ gL}^{-1}]$ y $[60 \text{ gL}^{-1}]$ respectivamente.

Tabla 7. Coeficientes de correlación de los datos experimentales a $[S_0: 40 \text{ y } 60 \text{ g/L}]$ con respecto a los datos simulados.

	$[40 \text{ gL}^{-1}]$	$[60 \text{ gL}^{-1}]$
R^2 (biomasa)	0.99	0.97
R^2 (glucosa)	0.88	0.96
R^2 (etanol)	0.95	0.97
R^2 (global)	0.94	0.97

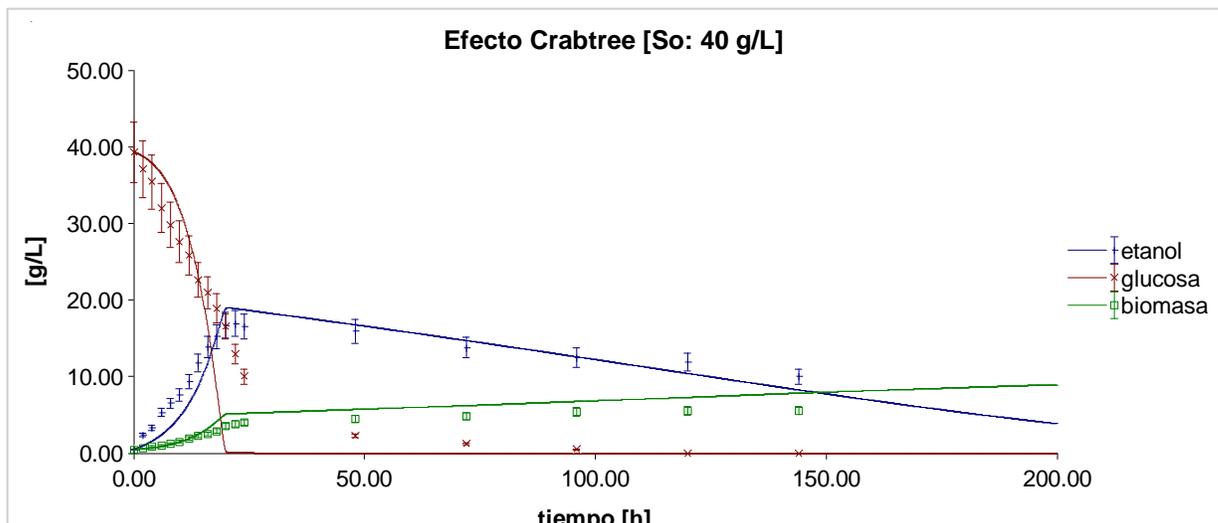


Figura 30. Comparación de datos simulados (línea continua) por el modelo no estructurado fenomenológico y datos experimentales (x, ●, ■) reportados en este trabajo, por *S. cerevisiae* bajo las siguientes condiciones: medio YM, $[S_0: 40 \text{ gL}^{-1}]$, $30 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.

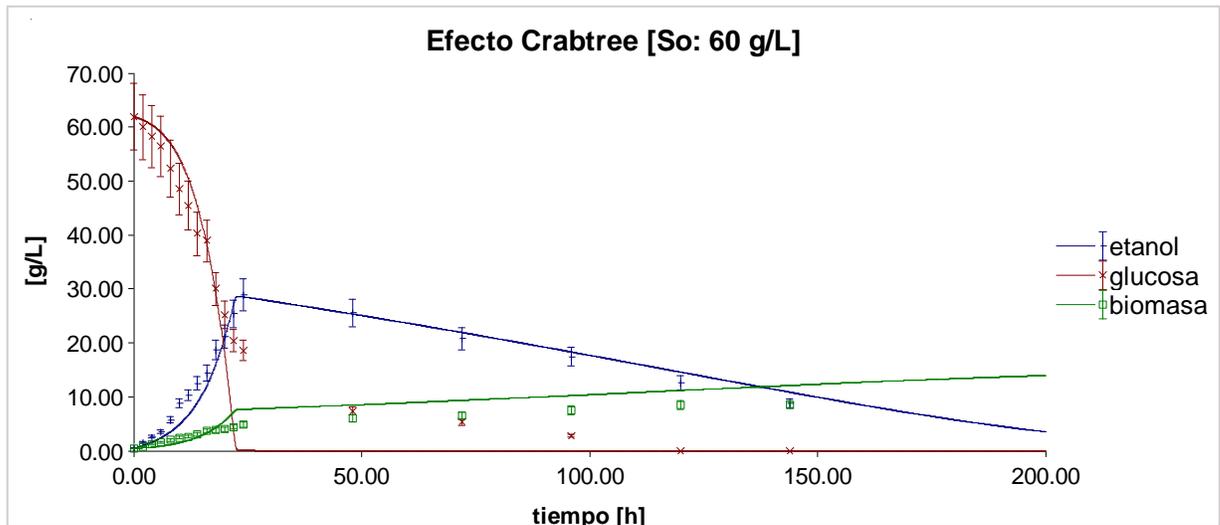


Figura 31. Comparación de datos simulados (línea continua) por el modelo no estructurado fenomenológico y datos experimentales (x, ■, ●) reportados en este trabajo, por *S. cerevisiae* bajo las siguientes condiciones: medio YM, [So: 60 gL⁻¹], 30 ± 0.2 °C, pH de 5, 750 rpm, DO 100%.

7.3.4. EVALUACIÓN DEL MODELO.

Para verificar la validez del modelo y su posible extrapolación a diversos sistemas de producción de etanol bajo el uso de cepas emparentadas bioquímicamente se procedió a realizar un análisis *in silico* bajo diferentes condiciones iniciales reportadas en literatura sobre el tema, con ello se procedió a realizar la comparación de los resultados predichos por el modelo cinético construido contra datos experimentales de fermentaciones llevadas a cabo bajo esas condiciones. Se propuso caracterizar el desempeño del modelo contra datos experimentales obtenidos por *Arellano y col.* (2007), los cuales inicia su fermentación a una concentración de sustrato inicial de 60 gL⁻¹ y un inóculo inicial de 0.25 gL⁻¹. Los resultados de dicha comparación se presentan a continuación:

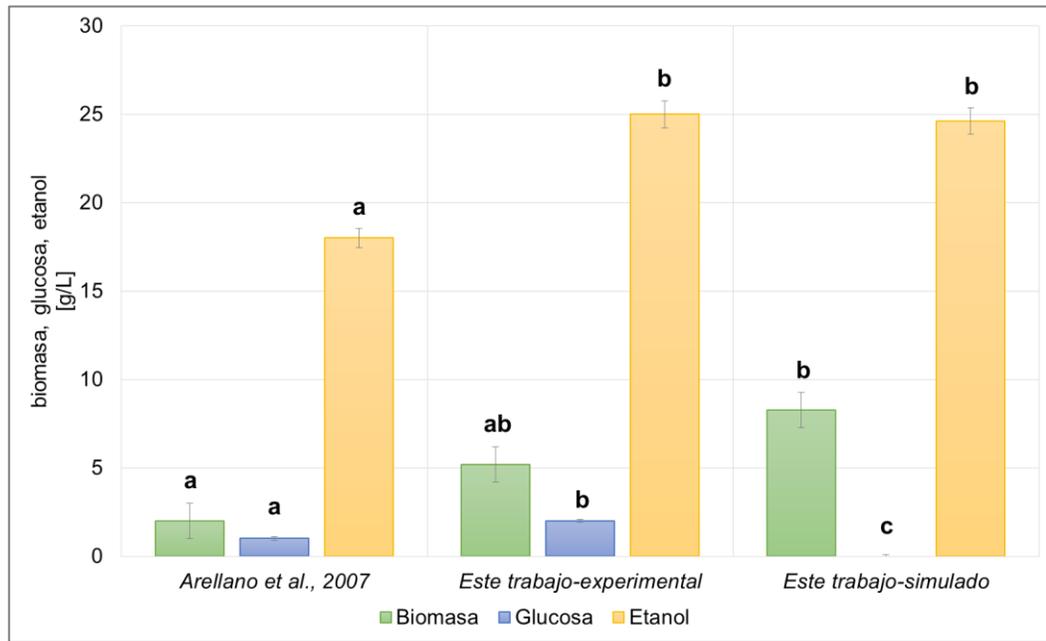


Figura 32. Comparación de datos simulados por el modelo y concentraciones a tiempo final reportadas en este trabajo y por Arellano et al. (2007) a 60 g/L de sustrato.

Letras iguales en los índices superiores significan igualdad estadística ($\alpha = 0.05$).

A su vez se realizaron simulaciones para corroborar la capacidad predictiva de la estructura propuesta bajo condiciones de “alta concentración de sustrato”, usando como base datos a tiempo final reportados por Arellano y col. (2007).

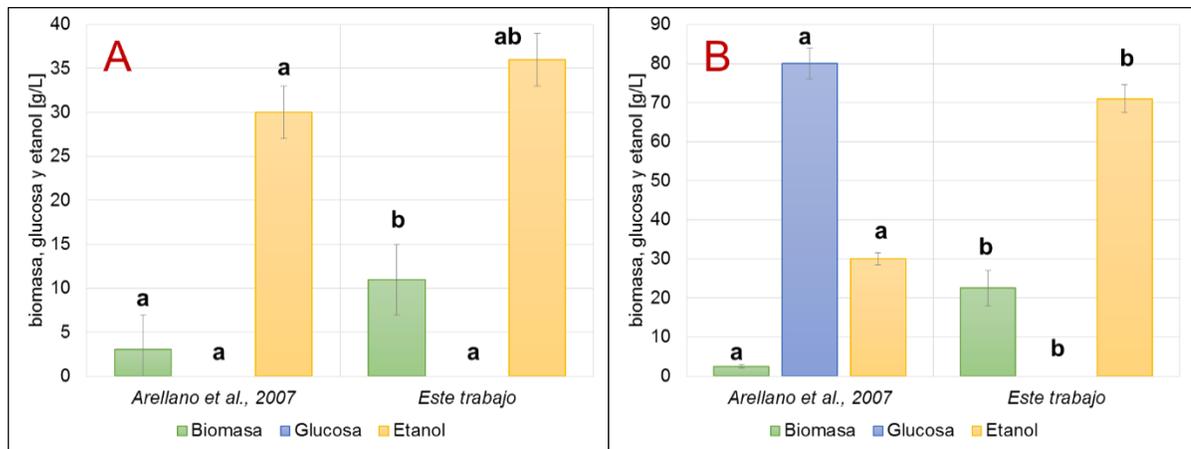


Figura 33. Comparación de datos simulados por el modelo no estructurado y concentraciones a tiempo final reportadas por Arellano et al. (2007) a A) 90 y B) 180 g/L de sustrato.

Letras iguales en los índices superiores significan igualdad estadística ($\alpha = 0.05$).

Con respecto a la prueba estadística de Tukey, la **Figura 32** presenta la comparación de concentraciones en el equilibrio en régimen por lote a concentraciones de sustrato inicial de $[60 \text{ gL}^{-1}]$ de datos experimentales obtenidos en este trabajo, datos simulados por el modelo propuesto y datos experimentales reportados por Arellano y col. (2007), donde los datos obtenidos por simulación utilizando el modelo fenomenológico presentan mayor similitud estadística con los datos experimentales reportados en este trabajo, que con los datos reportados en literatura; esto se observa al presentar mayores índices de significancia estadística con respecto a datos experimentales reportados en este trabajo.

Por otro lado, en la **Figura 33-A**, los índices de significancia obtenidos tras la prueba estadística de Tukey, muestran que la producción de glucosa y etanol, tienen una semejanza estadísticamente significativa, fenómeno que no ocurre con la generación de biomasa, ya que para este compuesto se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

La figura **33-B**, presenta la comparación de concentraciones en el equilibrio en régimen por lote a concentraciones de sustrato inicial de $[180 \text{ gL}^{-1}]$ de datos simulados por el modelo fenomenológico y datos experimentales reportados por Arellano y col. (2007). Dado que los índices de significancia son diferentes para cada caso, se determina que existe una diferencia estadísticamente significativa.

Es importante destacar que, al carecer en el término cinético de crecimiento celular un término de inhibición por producto y por sustrato, es evidente la predicción pierde fiabilidad una vez llegando al umbral de los 220 gL^{-1} de glucosa, que es donde se ha reportado inicia un proceso de inhibición por sustrato inicial.

Esta particularidad puede ser relevante al momento de considerar el uso de este modelo en sistemas de fermentación por *S. cerevisiae* que tengan como objetivo tratar soluciones muy saturadas de fuente de carbono, como lo puede ser la alimentación con melaza directa u otra fuente agroindustrial.

8. CONCLUSIONES

Con el desarrollo experimental previo se lograron establecer las condiciones de operación a las cuales se presenta el efecto Crabtree. Se observó la presencia del fenómeno metabólico conocido como “efecto Crabtree” bajo el umbral de concentraciones iniciales de glucosa propuesto, siendo la concentración inicial de glucosa de $[60 \text{ gL}^{-1}]$ la que mejor rendimientos de etanol arrojó.

El modelo matemático propuesto mostró tener una buena capacidad predictiva con respecto a los datos experimentales. Sin embargo, su evaluación a concentraciones iniciales de glucosa superiores a $[60 \text{ gL}^{-1}]$, permitió observar que el modelo no muestra tener reproducibilidad a condiciones diferentes a las trabajadas para inducir el efecto Crabtree.

9. RECOMENDACIONES

Con respecto al análisis experimental, se recomienda el desarrollo de fermentaciones a concentraciones de glucosa inicial superiores a los $[60 \text{ gL}^{-1}]$, para determinar si a concentraciones superiores, se observa una mejora en la producción de etanol. Además, para futuros trabajos relacionados a este mismo se recomienda la determinación experimental de especies metabólicas que permitan ampliar la robustez del modelo propuesto, así como el seguimiento de la dinámica del oxígeno disuelto a lo largo de la fermentación.

Incluso, para investigaciones futuras se recomienda la evaluación de este efecto con fuentes de carbono diferentes a glucosa, como melaza, residuos agroindustriales, etc., lo que permitiría que la aplicación de este proceso tenga mayor factibilidad a nivel industrial. Con respecto al modelo propuesto, se recomienda que la evaluación de este modelo se amplíe a regímenes de operación diferentes al cultivo por lotes, como por ejemplo cultivo continuo y semicontinuo.

10. PRODUCTOS DE TRABAJO

A lo largo del desarrollo de este proyecto de investigación, se presentaron trabajos a diferentes congresos mencionados a continuación:

“**Primer Congreso Nacional Propuestas para el Cuidado de la Vida del siglo XXI**”, con el tema “*Análisis de procesos metabólicos orientados a la producción de etanol*”.

PRIMER CONGRESO NACIONAL
PROPUESAS PARA EL CUIDADO DE LA VIDA EN EL SIGLO XXI

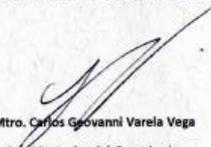
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Desarrollo Sostenible A.C.
y la Universidad Mexiquense del Bicentenario, a través de la
Unidad de Estudios Superiores Tultitlán.

otorga la presente:
CONSTANCIA
a:

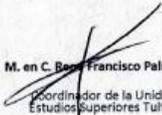
Luz Mariana Pérez Montoya, Alma Rosa Domínguez Bocanegra, María del Carmen Montes Horcasitas, Pablo Antonio López Pérez y Ricardo Aguilar López

Por su participación en la ponencia “Análisis de procesos metabólicos orientados a la producción de bioetanol” en el marco del **1^{er} CONGRESO NACIONAL PROPUESTAS PARA EL CUIDADO DE LA VIDA EN EL SIGLO XXI** realizado del 4 al 6 de Noviembre del 2015.


Q.F.B José Luis Torres Cuadros
Director ejecutivo AMIDDES A.C.


Mtro. Carlos Giovanni Varela Vega
Presidente Comité Organizador


Q.F.B Emmanuel Hammurabi Ruelas Ramírez
Presidente Comité Organizador


M. en C. Bsc. Francisco Palma Avendaño
Coordinador de la Unidad de Estudios Superiores Tultitlán


Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Desarrollo Sostenible A.C.


UNIVERSIDAD MEXIQUENSE DEL BICENTENARIO
UES
TULTITLÁN
UNIDAD DE ESTUDIOS SUPERIORES


UES
TLAXTEPEC
UNIDAD DE ESTUDIOS SUPERIORES


SINAM


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA


UVM
Universidad del Valle de México


UNIVERSIDAD
ETAC
Allial INVESTIGACIONES


INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
JAGUEY


Cinvestav

XXXVII Encuentro de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, AMIDIQ 2016, con los temas:

*“Estudio comparativo de procesos de fermentación orientados a la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*”*

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.
Nuevas tecnologías y tendencias en la Ingeniería Química

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

LUZ MARIANA PÉREZ MONTOYA, ALMA ROSA DOMÍNGUEZ BOCANEGRA, MARIA DEL CARMEN MONTES HORCASITAS, PABLO ANTONIO LÓPEZ PÉREZ Y RICARDO AGUILAR LÓPEZ

Por la presentación del trabajo:

“ESTUDIO COMPARATIVO DE PROCESOS DE FERMENTACIÓN ORIENTADOS A LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE”

Título: Cuetzalcóatl
Diseño: Aurelio Agustín Rojas Robledo, Pintor
Ejecución: Raúl Solís Medina, Escultor
Colaboradores: Macedonio López, Beatriz Adriana Rodríguez Andrade, Cecilia Rangel Mexicano, Dulce María Elizabeth Contreras Ortuño, Alejandro Lemus Ortiz
Fecha: 24 de Agosto de 2015
Mural ubicado en la Unidad de Convivencia Estudiantil del Campus II del Instituto Tecnológico de Celaya

XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
Puerto Vallarta, Jalisco, México, del 3 al 6 de mayo de 2016

Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ

Dr. Pedro Alberto Quintana Hernández
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

“Estudio del Efecto Crabtree a diferentes concentraciones de fuente de carbono en la producción de etanol”.



International-Mexican Congress on Chemical Reaction Engineering, IMCCRE 2016. Con el tema “*A comparative overview of bioethanol production from Saccharomyces cerevisiae under different environmental conditions*”



IMCCRE2016
Querétaro, México, June 5-9, 2016

The Organizing Committee of the

IMCCRE-2016
International-Mexican Congress on
Chemical Reaction Engineering

Certifies that
M. PÉREZ MONTOYA, R. AGUILAR LÓPEZ,
P. LÓPEZ PÉREZ, A. R. DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA
Contributed with the poster paper
**A Comparative Overview of Bio-ethanol Production from
Saccharomyces Cerevisiae Under
Different Environmental Conditions**



DR. JORGE ANCHEYTA
CHAIRMAN



11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Andaluza de la Energía AAE. (2011). Estudio Básico sobre el sector de los biocombustibles. *Consejería de Economía, Innovación y Ciencia*.
- Aimaretti, N., Ybalo, C., Escorcía, M. & Codevilla, A. (2012). Revalorización de descartes agroindustriales para la obtención de bioetanol. *Invenio*, 15 (28), 141-157.
- Alexandre, H., Rousseaux, I. & Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Microbiology Letters*, 124(1), 17-22.
- Arellano-Plaza, M., Herrera-López, E.J., Díaz-Montaña, D.M., Moran, A. & Ramírez-Córdova, J.J. (2007). Unstructured kinetic model for tequila batch fermentation. *International Journal of mathematics and computers in simulation*, 1(1), 1-6.
- Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Salakkam A., Srinophakun P. & Laopaiboon, L. (2016). Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.1-7.
- Arroyo-López, N., Orlic S., Querol A. & Barrio E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 120-127.
- Bai, F., Anderson, W., Moo-Young, M. (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* 26(1), 89-105.

- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.
- Barnett, J.A. & Entian, K.D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22 (11), 835-894.
- Becerra-Pérez, L.A. (2009). La industria del etanol en México. *Economía UNAM*, 6 (016), ISSN: 1665-952x.
- Borodina I., Nielsen J. (2005) From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Current Opinion Biotechnology*. 16(3), 350-355.
- Canales-Cádiz, J.A. (2014). Modelo continuo de flujos metabólicos y regulación génica: aplicaciones. *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Carballo, F. (2000). Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial. España: Ed. Acribia, 20-31.
- Caro, I., Pérez, L. & Cantero, D. (1991). Development of a kinetic-model for the alcoholic fermentation of must. *Biotechnol. Bioeng*, 38, 742-748.
- Colombié, S., Malherbe, S. & Sablayrolles, J.M. (2005). Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: feasibility and interest. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 238–245.
- Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23 (23), 536–545.
- Cramer, A.C., Vlassides, S. & Block, D.E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 49-60.

- Damas, L.C. (2010). Uso de levaduras industriales. GCM (.pdf)
- Deken, R.H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Microbiology*, 44, 149-156.
- Del Nobile, M.A., D'Amato, D., Altieri, C., Corbo, M.R. & Sinigaglia, M. (2003). Modeling the yeast growth-cycle in a model wine system. *J. Food Sci.*, 68, 2080-2085.
- Díaz-Oviedo, H.G. (2006). Análisis comparativo de una cepa nativa y otra recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el uso de datos de expresión génica (biochip de DNA) e ingeniería metabólica. *Tesis Doctoral*. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Domínguez-Bocanegra A.R., Torres-Muñoz, J.A. (2004). Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrohous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66, 249–52.
- Domínguez-Bocanegra, A.R., Torres-Muñoz, J.A. & Aguilar-López, R. (2015). Production of Bioethanol from agro-industrial wastes, *Fuel*, 149, 85–89.
- Eiteman, M.A., Altman, E. (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology.* 24, 530-536.
- Fell, D. (2010). Evolution of central carbon metabolism. *Mol. Cell.* 39 (5), 663–664.
- Fu, N., Peiris, P., Markham, J., Bavor, J. (2009). A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology.* 45, 210-217.

- Galíndez-Mayer, J., Ruíz-Ordaz, N. (1994). Bioingeniería: fundamentos biocinéticos, para el diseño de procesos fermentativos. *Informes técnicos Instituto Politécnico Nacional*.
- Gómez, C.A.; Calderón, Y.A.; Álvarez, H. (2008). Construcción de modelos semifísicos de base fenomenológica. Caso proceso de fermentación. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 6 (2).
- Gómez, L.D., Steele-King, C.G., Mc Queen-Mason, S.J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls. *New Phytologist*. 178, 473-485.
- González-Díaz, R. (2001). Uso de la ingeniería metabólica en el estudio de la producción de proteínas y etanol en cepas recombinantes. *Tesis Doctoral*. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- González-Siso, M.I. (1966). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme and Microbial Technology*. 18 (8), 585–591
- Grootjen, D.R.J., Meijlink, L.H.H.M., Van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M. (1990). Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 12, 860-864.
- <http://pathway.yeastgenome.org/>. (2015). Rutas Metabólicas de *S. cerevisiae*.
- IEA, *Internacional Energy Agency*, Oil Market Report, Septiembre 2013.
- Jacques, T. (2004). Modeling threshold phenomena, metabolic pathways switches and signals in chemostat-cultivated cells: the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Theoretical Biology*, 226, 483–501.

- Jeffries, T., Headman, J. (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Research*. 9, 793-807.
- Jiménez-Islas D., Páez-Lerma, J., Soto-Cruz, N.O. & Gracida, J. (2014). Ethanol Production from Red Beet Juice, *Food Technol. Biotechnology*, 52 (1) 93–100.
- Kappeli, G. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Advances in Microbial Physiology*. 28,181–209.
- Karagöz, P., Rocha, I.V., Özkan, M., Angelidaki, I. (2012). Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresource Technology* 104, 349–357.
- KEGG (2016); <http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>
- Kenneth, D.J. & Dhinakar, S.K. (1999). Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *Journal of Biotechnology*, 71, 105–131.
- Kesten, D., Kummer, U., Sahle, S. & Hübner, K. (2015). A new model for the aerobic metabolism of yeast allows the detailed analysis of the metabolic regulation during glucose pulse. *Biophysical Chemistry*, 206, 40–57.
- Kroumov, A.D., Módnes, A.N. & Araujo-Tait, M.C. (2006). Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 243-255.
- Laguna-Monroy, I. (2009). Consideraciones ambientales para la producción y uso sustentable de biocombustibles en México. *Instituto Nacional de Ecología México*, D. F., México.

- Laplace, J.M., Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M. (1993). Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultivated with xylose-fermenting yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75, 207-212.
- Lara, A.R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10 (2), 209-223.
- Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A. (1997). Long-term incomplete xylose fermentation, after glucose exhaustion, with *Candida shehatae* co-immobilized with *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research* 162, 211-218.
- López-Pérez, P.A. (2013). Diseño de un bioproceso de alta eficiencia para la remoción de cadmio vía *Desulfovibrio alaskensis* 6sr: modelado, simulación, estimación y control. *Tesis Doctoral*. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN. Unidad Zacatenco, D.F. México.
- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N. & Sablayrolles, J.M. (2004). Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 261-272.
- Martínez-Alcalá, A. (2012). *Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion*. (Tesis inédita de Doctorado). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428.
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3, 371–394.

- Nielsen, J. (2001). Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 263–283.
- Nielsen, J. (2003). It is all about metabolic fluxes. *J. Bacteriol.* 185, 7031–7035.
- Nielsen, J., Keasling, J. (2016). Engineering Cellular Metabolism Review. *Cell.* 164, 1185-1197.
- Norma Mexicana NMX-F-436-SCFI-2011 Industria Azucarera y Alcohólica - Determinación de Grados Brix en jugos de especies vegetales productoras de azúcar y materiales azucarados. Método del refractómetro.
- Noor, A., Hameed, A., Bhatti, K. & Tunio, S. (2003). Bioethanol fermentation by the bioconversion of sugar from dates by *S. cerevisiae* strains ASN-3 and HA-4. *Biotechnology*, 2 (1), 8-17.
- Noor, E., Eden, E., Milo, R., Alon U. (2010). Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Mol. Cell.* 39 (5), 809–820.
- Öhgren, K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G. (2006). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* 126, 488-498.
- Pasteur, L. (1861). Influencia del oxígeno en el desarrollo de fermentación alcohólica. *Bulletin de la Société de Paris*, 79-80.
- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1 (17).

- Pham, H.T.B, Larsson, G. Enfors, S.O. (1999). Modelling of aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a pH-auxostat *Bioprocess Engineering*, 20, 537-544.
- Ríos del Risco, C.A., Fajardo, M., Pérez, J.C. (2005). Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación apícola de Cuba
- Rivera, E., C.; Costa, A.C. (2006). Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. *Process Biochemistry*. 41, p. 1682-1687.
- Rudolf, A., Baudel, H., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnology and Bioengineering*. 99, 783-790.
- Ruiz, A.A. & Álvarez, H. (2010). Hacia el escalado de procesos desde su modelo fenomenológico. Recuperado de www.unalmed.edu.com.
- Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J.R. & Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 818-828.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S. & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37, 19-27.
- Tayeh, H.A., Najami, N., Dosoretz, C., Tafesh, A. & Azaizeh, H. (2014). Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes. *Bioresource Technology*, 152, 24–30.

Tomasso, M. (2004). Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química

Tuite, M., Oliver, S. (1991). *Saccharomyces*. *Plenum Press New York*. 250-255.

Villamizar Roa, E. J. (2010). Modelos y modelamiento matemático. [En línea]
<http://www.matematicas.uis.edu.co/~elderj/>

Vaisman-Romero, D.B. (2011). Modelamiento Continuo de una red metabólica con regulación génica y dinámica de síntesis enzimática: cambio diáuxico en *Saccharomyces Cerevisiae*. *Tesis de Maestría*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago de Chile.

Von Meyenburg, H.K., Fiechter, A. (1968). Regulation phenomena of gaseous metabolism of aerobically growing baker's yeast. *In: Proceedings of the 2nd International Symposium on Yeast*, Bratislava, pp. 377–385.

Werner-Washburne, M., Johnston, G.C., & Singer, R.A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57, 383-401.

12. ANEXOS

SECCIÓN A. Descripción de los fermentadores utilizados

La obtención de datos experimentales para la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* se llevaron a cabo en un biorreactor comercial. Además de estos equipos, ha sido necesaria la utilización de otros para conseguir la esterilidad de los medios y las temperaturas programadas en el mantenimiento y crecimiento del microorganismo. También ha sido necesario utilizar y disponer de un buen número de aparatos de medida para analizar la evolución de los diferentes componentes del proceso objeto de estudio. A continuación se dan las características principales del equipo empleado:

Fermentador comercial: El proceso de fermentación con microorganismos se ha llevado a cabo en un biorreactor de tipo tanque agitado, diseñado y comercializado por APPLIKON®. Está constituido por un tanque de cultivo de 2 L (otro de 1 L) y con los sistemas de medida, control y regulación de pH, oxígeno disuelto, temperatura, velocidad de agitación y determinación de biomasa. En la **Figura 28** se muestra el biorreactor empleado.

Sistema de Medida y Control de Temperatura: el fermentador APPLIKON® lleva un controlador PID, con un alto grado de eficacia. La temperatura del medio de cultivo es medida mediante un sensor de temperatura Pt 100, a la vez que un segundo sensor mide la temperatura del fluido calefactor que circula a través de la camisa del reactor. La temperatura de operación es seleccionada y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0.10 °C.

Sistema de agitación: la unidad de agitación está formada por un motor P100, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de cuatro palas rectas (Rushton). Este sistema garantiza una velocidad de agitación adecuada en procesos en los que se llega a alcanzar una elevada viscosidad en el caldo.

El torque máximo es de 0.20 Nm y un rango de 0-2000 rpm. El valor fijado se presenta en un indicador digital y es regulado mediante un controlador PI.

Sistema de aireación: La aireación del caldo se consigue suministrando aire mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0.22 μm , para conseguir la esterilización del aire que se introduce en el reactor. El aire se distribuye en el interior mediante un rociador de tipo L. El caudal de aire es ajustado mediante una válvula y medido por un rotámetro.

Sistema de medida y control de oxígeno disuelto: La medida del oxígeno disuelto es realizada empleando un electrodo esterilizable. Este electrodo funciona mediante el principio de polarización y consta de un ánodo de plata y cátodo de platino separados de la disolución a medir por una membrana de teflón. La señal de medida es amplificada y convenida en una señal digital. La concentración de oxígeno disuelto puede ser controlada mediante la acción sobre el caudal de aire o bien mediante la velocidad de agitación.

Sistema de medida y control de pH: El pH del medio de cultivo es analizado en línea mediante un electrodo de vidrio esterilizable. La señal de medida, previamente amplificada, es alimentada a un controlador de tipo PI. Una vez fijado el valor de pH al que se desea trabajar es mantenido por la acción del controlador sobre sendas bombas de alimentación de álcali o ácido.

Sistema de medida y control de espuma: la aparición de excesiva espuma es combatida mediante la introducción de un compuesto antiespumante. Para la detección de espuma se utiliza un simple sensor de contacto, donde la parte metálica del reactor actúa como tierra. La señal de salida del sensor es enviada al módulo de control de espuma que actúa sobre la bomba de dosificación de antiespumante.

Sistema de determinación en línea de Biomasa: se utilizó un sensor BugLab BE2100 el cual determina la biomasa total.

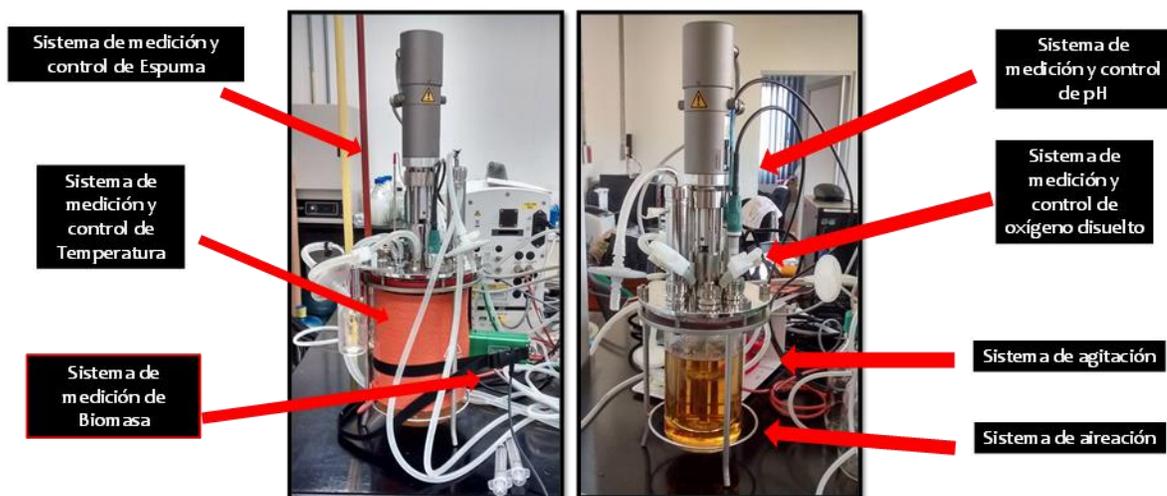


Figura 34. Biorreactores APPLIKON® de 3 litros (izquierda) y 1 litro (derecha)