

**EVALUACIÓN A ESCALA LABORATORIO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL
EN PRESENCIA DE VINAZA A PARTIR DE LEVADURAS NATIVAS**

ZUNNY TATIANA DAZA MERCHÁN

Estudiante de Maestría en Ingeniería
Énfasis en Ingeniería Sanitaria y Ambiental

EDGAR FERNANDO CASTILLO Ph.D

Director

JERSHON LÓPEZ GERENA Ph.D

Co-director

IRMA JANETH SANABRIA Ph.D

Co-directora

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE INGENIERÍA

POSTGRADO EN INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL

SANTIAGO DE CALI

2011

A Dios , a quien doy infinitas gracias por todas las bendiciones que llegan cada día a mi vida, gracias Señor por mis papás, de quienes quiero ser su orgullo; por mi hermano de quien quiero ser su ejemplo y por mi novio de quien quiero ser su amor eterno..

Zunny Tatiana

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo tiene varios partícipes a quienes expreso mis más sinceros agradecimientos:

Doctor **Edgar Castillo**, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por toda su colaboración, su amistad y sus conocimientos que contribuyeron en la obtención de este logro.

Doctores **Janeth Sanabria** y **Jershon López**, por su colaboración en la dirección de este trabajo.

Doctor **Nicolás Gil**, por su apoyo, sus sabios consejos y su amistad.

Doctor **Cletus Kurtzman** y **Christie Robnett** (AgLab, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos), a quien conocí en la finalización del presente trabajo y me ayudaron a comprender el mundo de las levaduras.

Un especial agradecimiento a **Jenny Laguado**, **Andrés Hernández**, **Oscar Mora Jorge Socarrás**, **Alberto Palma** y **Miriam Rojas**, por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del **Programa de Fábrica** y de **Cenicaña**.

Al **Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia**, por todas las oportunidades brindadas que han contribuido a mi formación profesional.

A mis compañeros de la **Universidad del Valle**, buenos recuerdos que dejan grandes amigos.

A **Andrés Felipe López**, por su colaboración, su paciencia y su amor.

Al **Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural** por la financiación del presente trabajo y por su contribución al desarrollo de la formación científica en el país.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	5
1.3 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	6
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GENERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 GENERALIDADES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE	10
3.1.1 Situación mundial de la producción de etanol carburante	10
3.1.2 Producción de etanol carburante en Colombia	11
3.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN	13
3.2.1 Materias primas para la producción de etanol carburante	13
3.2.2 Microorganismos utilizados en la producción de etanol	14
3.2.3 Proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar	17
3.2.4 La vinaza	18
3.2.5 Limitaciones y problemas frecuentes	20

3.3 POTENCIAL DE USO DE LEVADURAS NATIVAS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE EN COLOMBIA	22
3.3.1 Producción de etanol en presencia de vinaza	23
3.3.2 Evaluación de levaduras nativas para producción de etanol	25
3.3.3 Metodologías para la valoración del potencial de utilización de levaduras nativas en procesos industriales.	28
 4. DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA UTILIZADA PARA LA IDENTIFICACION DE CEPAS NATIVAS CON POTENCIAL ALCOHOLERO	 33
4.1 TÉCNICAS ANALITICAS Y MÉTODOS DE MEDICIÓN UTILIZADOS	33
4.1.1 Sustrato utilizado	33
4.1.2. Cuantificación de azúcares mediante HPLC	34
4.1.3. Análisis estadístico	35
4.2 AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS	35
4.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS LEVADURAS NATIVAS AISLADAS	36
4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS NATIVAS	37
4.4.1 Extracción de ADN	37
4.4.2 Amplificación y digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN	38
4.4.3 Caracterización molecular mediante PCR – fingerprinting usando microsatélites	40
4.5 EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE VINAZA	42
4.5.1 Evaluación preliminar de la capacidad de producción de etanol de cepas nativas	42
4.5.2 Evaluación del efecto de la vinaza sobre la producción de etanol	43
4.5.3 Evaluación a escala de reactor de la producción de etanol en presencia de vinaza	46
 5. RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS	 48
5.1 CONFORMACIÓN BANCO DE TRABAJO	48
5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS AISLADAS	49

5.2.1	Caracterización morfológica de las cepas de nativas	50
5.2.2	Caracterización Bioquímica de las cepas de levaduras nativas	57
5.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS NATIVAS	62
5.3.1	Amplificación y digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN	62
5.3.2	Caracterización molecular mediante PCR – fingerprinting usando microsatélites	68
5.4	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE VINAZA	69
5.4.1	Evaluación preliminar de la producción de etanol	69
5.4.2	Evaluación a escala erlenmeyer del efecto de la vinaza sobre la producción de etanol	70
5.4.3	Evaluación a escala de reactor de de la producción de etanol en presencia de vinaza	75
6.	ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS EXPERIMENTALES	80
6.1	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUIMICA DE LEVADURAS	80
6.2	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS NATIVAS AISLADAS	83
6.3	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE VINAZA UTILIZANDO CEPAS NATIVAS	85
6.3.1	Evaluación preliminar de la producción de etanol	85
6.3.2	Evaluación a escala banco del efecto de la vinaza sobre la producción de etanol	87
6.3.3	Evaluación de la producción de etanol a escala piloto	91
CONCLUSIONES		95
BIBLIOGRAFIA		97

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Producción mundial de etanol carburante	10
Figura 2. Evolución de la formación de células floculantes	26
Figura 3. Análisis <i>Fingerprinting</i> con el iniciador (GTG) ₅ de cepas del complejo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	31
Figura 4. Bioreactor BIOFLO 110	46
Figura 5. Amplificación de la Región ITS y del gen 5.8s rADN de levaduras nativas	62
Figura 6. Digestión con la enzima <i>Cfo I</i> de los fragmentos amplificados la región 5.8s ITS de las levaduras nativas	64
Figura 7. Digestión con la enzima <i>Hae III</i> de los fragmentos amplificados la región 5.8s ITS de las levaduras nativas	66
Figura 8. Análisis <i>Fingerprinting</i> de las levaduras nativas utilizando microsatelites con el iniciador (GTG) ₅	68
Figura 9. Producción de etanol de las levaduras nativas con diferentes concentraciones de vinaza	71
Figura 10. Consumo de ART de las levaduras nativas con diferentes concentraciones de vinaza	72
Figura 11. Sacarosa, glucosa y fructosa residual a las 24 horas (Tratamiento sin vinaza).	73
Figura 12. Sacarosa, glucosa y fructosa residual a las 24 horas. Concentración de vinaza 50% (v/v)	73
Figura 13. Sacarosa, glucosa y fructosa residual a las 24 horas. Concentración de vinaza 60% (v/v)	74
Figura 14. Eficiencia de la conversión de ART a etanol de las levaduras nativas con diferentes concentraciones de vinaza.	74
Figura 15. Producción de etanol de las levaduras nativas con 50% de vinaza	76

Figura 16. Eficiencia de fermentación de las levaduras nativas con 50% de vinaza

76

Figura 17. Consumo específico de ART de las levaduras nativas con una
concentración de vinaza de 50% (v/v)

77

Figura 18. Productividad específica de etanol (g/l/h) de las levaduras nativas con
recirculación de vinaza 50% (v/v)

78

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Plantas de producción de etanol carburante en Colombia	12
Tabla 2. Producción de alcohol carburante en Colombia 2005 - 2009	12
Tabla 3. Caracterización de compuestos inorgánicos en vinazas concentradas y diluidas	20
Tabla 4. Preparación de la mezcla para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN	39
Tabla 5. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2	39
Tabla 6. Preparación de la reacción con enzimas de restricción	40
Tabla 7. Preparación de la mezcla para la PCR - <i>Fingerprinting</i>	41
Tabla 8. Condiciones de la PCR-fingerprinting	41
Tabla 9. Condiciones de propagación y fermentación	42
Tabla 10. Diseño experimental	44
Tabla 11. Condiciones de propagación y fermentación	45
Tabla 12. Condiciones de evaluación de la producción de etanol de levaduras nativas	47
Tabla 13. Recuentos de las fermentaciones realizadas con las diferentes muestras	48
Tabla 14. Caracterización morfológica	51
Tabla 15. Perfiles bioquímicos obtenidos utilizando el Kit API 20CAUX	58
Tabla 16. Resultados de la identificación bioquímica del Kit API 20CAUX	59
Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos por dos métodos de identificación de levaduras	60
Tabla 18. Perfil bioquímico registrado por el método Rapid Yeast ID	61
Tabla 19. Comparación entre el producto de PCR de la región 5.8s-ITS rADN y la identificación bioquímica mediante API 20CAUX de levaduras nativas	63
Tabla 20. Longitud de los fragmentos de restricción generados por la enzima <i>Cfo I</i>	65

Tabla 21. Longitud de los fragmentos de restricción generados por la enzima <i>Hae</i> III de las levaduras nativas	67
Tabla 22. Producción de etanol de las levaduras nativas aisladas	69
Tabla 23. Consumo de sacarosa de las cepas de levaduras nativas	70
Tabla 24. Producción de etanol % (v/v) de las levaduras nativas en los tratamiento evaluados	71
Tabla 25. Consumo de ART de las levaduras nativas en los tratamientos evaluados	72
Tabla 26. Eficiencia del proceso de fermentación de las levaduras nativas	75
Tabla 27. Estimación de la generación de vinaza a partir de una fermentación tipo batch	79
Tabla 28. Concentración de fructosa residual de las levaduras nativas en los tratamientos evaluados	90
Tabla 29. Características deseables en levaduras alcoholeras	91

RESUMEN

La producción actual de alcohol carburante en Colombia, está a cargo de cinco plantas ubicadas en el valle geográfico del río Cauca, cuyo nivel de producción cubre el 80% de la demanda nacional. Estas plantas involucran en su proceso de fermentación la recirculación de la vinaza un generada en el posterior proceso de destilación, con el fin de minimizar el impacto ambiental causado por este efluente y a la vez minimizar el consumo de agua.

La vinaza es una corriente rica en minerales que la levadura puede utilizar como nutrientes, pero presenta un alto contenido de compuestos orgánicos alcanzando concentraciones que pueden inhibir tanto el crecimiento como la producción de etanol de las levaduras; su recirculación al proceso fermentativo exige que levaduras sean resistentes a los compuestos tóxicos. Actualmente las levaduras utilizadas en el proceso de fermentación son suministradas por una compañía de la India.

El presente trabajo presenta la posibilidad de seleccionar levaduras nativas del valle geográfico del río Cauca que tengan una alta producción de etanol en presencia de vinaza, y que sean objeto de estudio en futuros trabajos de mejoramiento ya sea por adaptación o por ingeniería genética, con el fin de contar con una levadura que pueda ser utilizada a escala industrial y de esta manera minimizar la dependencia tecnológica que se tienen actualmente con las levaduras comerciales.

Se aislaron 17 levaduras nativas a partir de muestras de suelos, uvas y sustratos fermentados, a las cuales se les realizó una caracterización bioquímica con el Kit API 20C AUX y una caracterización molecular mediante la técnica polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la región 5.8s y ITS del rADN y mediante PCR *Fingerprinting* utilizando el marcados microsatélite (GTG)₅. Se evaluó la capacidad de producción de etanol en fermentaciones tipo batch, utilizando como sustrato miel B y vinaza 50% (v/v). Se seleccionaron tres cepas que fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, que presentaron

eficiencias de fermentación superiores al 80%. El efecto de concentraciones de vinaza de 50 y 60% en volumen, fue determinado sobre las tres cepas seleccionadas (LCC 4-3, LCC 14-1, LCC 14-4) y tres cepas que fueron aisladas en estudios paralelos (LCC 0-1, LCC 0-5, y LCC 0-10). Se encontró que concentraciones de vinaza superiores al 50% reducen el grado alcohólico obtenido a las 24 horas entre 9-18% y el consumo de ART en 17% mínimo, lo cual equivale a azúcares residuales altos (mayores a 3%) y eficiencias de fermentación bajas (menores al 75%).

En escala reactor, las levaduras nativas alcanzaron grados alcohólicos superiores al 8% similares a los obtenidos con la levadura comercial (24 horas). Sobresalió la cepa LCC 14-1, con una eficiencia de conversión de azúcares a etanol del 90%. Se encontró que la levadura comercial presenta una mayor velocidad de producción de etanol alcanzando niveles máximos de 0.5% por hora mientras que la levadura LCC 14-1 presentó 0.4% por hora.

ABSTRACT

Current fuel ethanol production in Colombia, is produced by five factories located in Cauca river valley, the level of production covers 80% of national demand. These processes involved in the process of fermentation the recirculation of vinasse (stillage) generated in the subsequent distillation process, in order to minimize the environmental impact of this effluent while minimizing water consumption.

The vinasse is a material with a high content of minerals which can be used by the yeast as nutrients, but also contains high concentrations of organic compounds that can inhibit the growth and ethanol production of yeast; its recirculation requires the use of resistant yeast fermentation against toxic compounds. Currently, the yeast used in fermentation process is supplied by an Indian Company.

This work presents the possibility of selecting wild yeast from Cauca River Valley with a high ethanol production in presence of vinasse, which can be used in future studies of adaptation or by genetic engineering, to get a yeast to use on industrial scale and thus minimize technological dependence of commercial yeasts.

17 wild yeast strains were isolated from samples of soil, grapes and fermented substrates. These were characterized biochemically by means of API 20C AUX™ kit and the molecular characterization was by the technique Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP) on 5.8s ITS region of rDNA and PCR *fingerprinting* using the microsatellite marker (GTG)₅. Three strains were selected, identified as *S. cerevisiae*, their fermentation efficiencies were above 80% in a substrate composed by molasses B and vinasse (50%).

The effect of vinasse concentrations of 50 and 60% by volume, was determined on the three selected strains (LCC 4-3, 14-1 LCC, LCC 14-4) and three strains selected in parallel studies (LCC 0-1, LCC 0-5, and LCC 0-10). It was found that vinasse concentrations above 50% decreased the alcoholic content between 9-

18% and T.R.S (Total reducers sugars) consumption in 17% minimum, which is equivalent to high residual sugar (greater than 5%) and low fermentation efficiencies (less than 75%).

On reactor scale, the native yeast got a ethanol contents over 8% similar to obtained with commercial yeast (24 hours). The strain LCC 14-1 was outstanding, with 90% of sugars to ethanol conversion efficiency. It was found that the commercial yeast reached a higher ethanol production rate, levels of 0.5% per hour, while the yeast LCC 14-1 got 0.4% per hour.

INTRODUCCIÓN

La demanda de etanol carburante en Colombia está regulada por en la ley 693 de 2001, la cual dispuso que toda la gasolina dispensada en las zonas urbanas con una población mayor a 500.000 habitantes debería tener componentes oxigenados tales como alcohol carburante en una proporción del 10% (Briceño, 2006). Ésta producción , está exclusivamente a cargo de las cinco destilerías del sector azucarero Colombiano, ubicadas en el valle del río Cauca, las cuales utilizan como materia prima la miel B subproducto del proceso de elaboración de azúcar de caña. No obstante, esta producción, que actualmente supera 1.050.000 litros diarios de etanol anhidro, cubre aproximadamente el 83% de la cuota nacional (ASOCAÑA, 2010).

La cobertura total de la demanda nacional y de un incremento al porcentaje de mezcla depende del desarrollo de nuevos proyectos de producción de etanol carburante así como del incremento de la producción actual por parte de las destilerías.

La producción de etanol tiene como principal efluente la vinaza, una corriente líquida obtenida después del proceso de destilación del etanol presente en el vino producido en la etapa de fermentación.

La vinaza es una mezcla de compuestos orgánicos entre azúcares, ácidos y alcoholes y otros componentes inorgánicos, como algunas sales minerales, los cuales representan altas cargas contaminantes expresadas en términos de D.B.O y D.Q.O (Demanda Bioquímica y Química de Oxígeno (respectivamente). Éstas características impiden su descarga directa sobre los cuerpos de agua y por lo tanto requiere un tratamiento (Parnaudeau et al., 2008).

En sistemas tradicionales de fermentación – destilación, la vinaza generada supera los 10 litros por cada litro de etanol producido. Sin embargo, el compromiso

ambiental del sector azucarero y las disposiciones de las corporaciones ambientales, ha llevado a involucrar una tecnología de producción, cuyo esquema involucra la recirculación de vinaza al proceso de fermentación con dos fines: ahorro en el consumo de agua, ya que esta se sustituye por vinaza y reducción en la producción final de este efluente, alcanzando valores máximos de 3.0 litros de vinaza por litro de etanol (ASOCAÑA, 2010).

La recirculación de vinaza en la etapa de fermentación, tiene como ventajas que junto con este efluente se están recirculando una gran parte de compuestos que se constituyen en nutrientes para las levaduras responsables de la conversión de los azúcares a etanol. También se recirculan componentes como ácidos orgánicos, los cuales en altas concentraciones repercuten en el metabolismo de la levadura llegando incluso a inhibir su desarrollo (Navarro et al., 2000).

Actualmente, la producción de alcohol carburante involucra levaduras provenientes de la India, cuyo uso conlleva a la dependencia a los proveedores de las mismas, hecho que puede ser remediado por la utilización de levaduras de carácter nativo propias del valle del río Cauca.

El presente trabajo involucra el aislamiento, identificación bioquímica y molecular de levaduras nativas que tienen potencial de aplicación a nivel industrial en la producción de etanol carburante. Se evaluó el comportamiento cinético del metabolismo fermentativo de estas levaduras, utilizando como sustrato miel B e involucrando la sustitución del agua de dilución por vinaza, en concentraciones volumétricas entre el 50 y 60%.

Los resultados obtenidos hacen parte de la investigación adelantada por CENICAÑA, basada en la búsqueda de levaduras de origen nativo que sean posibles objetos de estudio en un posterior proceso de ingeniería genética con miras a incrementar la capacidad unitaria de producción de etanol de las plantas actuales disminuyendo la generación de vinaza y por ende el impacto ambiental. Estos trabajos se realizan en asocio con el Ingenio Mayagüez S.A y el Ingenio

Providencia S.A., con la financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

1. ANTECEDENTES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La generación de vinaza, se constituye en uno de los principales problemas a nivel ambiental de la producción de etanol carburante, ya que por sus características fisicoquímicas, como son altos contenidos de materia orgánica (en términos de D.B.O y D.Q.O), altos niveles de acidez y salinidad, sumado a los altos volúmenes producidos, se convierte en un efluente no apto para su vertimiento en cuerpos de agua (Shojaosadati et al., 1999) .

Teniendo en cuenta las características de la vinaza, el proceso de compostaje y la disposición mediante irrigación y fertilización en suelos, se constituyen en los principales mecanismos de disposición final, ya que puede ser utilizada como sustituto de fertilizantes de origen químico como es el caso de cloruro de potasio (Sheehan and Greenfield, 1980)

El sector azucarero colombiano, para minimizar el posible impacto ambiental ocasionado por la producción de etanol, ha instaurado un esquema tecnológico (Hiferm-GR, PRAJ Industries) que involucra la recirculación de vinaza al proceso de fermentación, reduciendo así el consumo de agua en el proceso y minimizando la producción de efluentes.

Bajo este esquema, la producción de vinaza es menor a 3.0 litros de vinaza por litro de etanol producido, parámetro que la hace competitiva frente a otras tecnologías como es el caso de Brasil donde la producción de vinaza está entre 10 y 14 litros por litro de etanol producido (Rocha MH, 2010, ASOCAÑA, 2006).

La reducción en la generación de vinaza, es respuesta de una etapa de fermentación estable y con alta eficiencia (alrededor del 90%), en la cual es posible recircular hasta un 70% del volumen total de la vinaza producida en la etapa de destilación, sin afectar el desempeño metabólico de las levaduras.

Sin embargo, las altas concentraciones de sólidos sedimentables, sales y ácidos orgánicos cuando la vinaza es recirculada a la fermentación, pueden llegar a inhibir a las levaduras afectando estructural y metabólicamente su desempeño, lo cual ocasiona que la conversión de azúcares a etanol disminuya. Bajo estas condiciones, la operación del proceso exige una reducción en la recirculación de vinaza a los fermentadores a niveles inferiores al 40% del volumen de vinaza producida o incluso conlleva a la liquidación (es decir, detener el proceso continuo de manera no programada) de los fermentadores.

Cuando se presenta disminución en la eficiencia de fermentación, se obtiene una mayor producción de vinaza al final del proceso, provocando un importante aumento de los costos unitarios de producción, debidos a mayores consumos energéticos del proceso de destilación y al lucro cesante de los bienes de capital que no se pueden operar en caso de liquidación de los fermentadores y al costo adicional de insumos y materias primas utilizadas.

Actualmente en Colombia, el sistema de fermentación – destilación, utiliza la tecnología PRAJ originaria de India que involucra cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de las cuales se desconocen los procesos de adaptación, adecuación e incluso posible mejoramiento genético a que fueron sometidas.

Puesto que la flora microbiana presente en los suelos y cuerpos de agua utilizados por el sector azucarero colombiano está adaptada a las condiciones de trópico húmedo existentes, en ocasiones se presentan episodios de contaminación microbiana en los fermentadores, específicamente por levaduras nativas, las cuales proliferan y superan en población a las levaduras comerciales PRAJ.

Dado este hecho, puede sugerirse que estas cepas nativas pueden presentar un alto grado de tolerancia o resistencia ante los metabolitos inhibidores presentes

en la vinaza y factibles de ser modificadas genéticamente para incrementar su producción de etanol.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La producción de etanol carburante en Colombia para el año 2010 fue de 287.995.000 litros, sin embargo esta cuota sólo alcanza a cubrir el 83% de la demanda nacional. Esto además de la tendencia mundial hacia la utilización de combustibles provenientes de fuentes renovables, hacen necesario un aumento en la producción de etanol que cubra el 100% de la demanda nacional e incluso que permita participar en el mercado internacional (CENICAÑA, 2011).

Un aumento en la demanda de etanol, involucra ya sea la puesta en marcha de nuevos proyectos entre los que se incluyan el aumento del área destinada para cultivos que sean fuente de azúcares fermentables o un aumento en la capacidad de producción de las plantas actuales que les permita incrementar su oferta.

El incremento en la capacidad de producción, puede ser obtenido a través de mayores eficiencias en el proceso, mediante la operación estable de la fermentación, minimizando el número de liquidaciones y paradas de la planta y por ende aumentando el tiempo hábil de operación.

La operación diaria de la estación de fermentación, está controlada por varios indicadores biológicos y químicos del mosto como son la población de levaduras viables por unidad de volumen, el grado alcohólico, la concentración de azúcares residuales, los niveles de contaminación microbiana expresados tanto en número de microorganismos como en la medición de la acidez volátil principalmente. Y operacionalmente, se tiene como indicador del desempeño de la fermentación, los niveles de recirculación de vinaza, los cuales disminuyen cuando el rendimiento en etanol es bajo.

Basado en lo anterior, la recirculación de vinaza a los fermentadores, hace que el proceso de producción exija la utilización de levaduras, que presenten una alta tolerancia a las características fisicoquímicas que presenta la vinaza, razón por la cual hasta la fecha, no ha sido posible prescindir de la utilización de las levaduras provenientes de la India. Esas levaduras presentan ciertas características que las hacen competitivas como son la capacidad de floculación, la estabilidad metabólica en el proceso continuo y una alta producción de etanol, que permite alcanzar valores de eficiencia incluso superiores al 90%.

Las levaduras, son organismos de amplia distribución en la naturaleza, y su utilización en la transformación de sustratos azucarados en productos con alto contenido alcohólico data de tiempo atrás. De igual manera, la base de producción artesanal de productos fermentados es la presencia de levaduras nativas con alto poder de producción de etanol a partir de diferentes sustratos. Estas levaduras nativas presentan características favorables que las hacen atractivas para su aislamiento y aplicación industrial como son su poder fermentativo, tolerancia a alta concentración osmótica y a altas concentraciones de etanol (Oliveira et al., 2008, Nova et al., 2009).

Teniendo en cuenta lo anterior, es factible que una cepa o un conjunto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, nativas del valle del Río Cauca puedan reemplazar las cepas exógenas productoras de etanol que actualmente se utilizan, incrementando la producción de etanol, permitiendo una mayor recirculación de vinaza y reduciendo el impacto ambiental y minimizando la actual dependencia tecnológica.

1.3 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

El esquema de producción de las cinco plantas de etanol carburante en Colombia, tiene establecido la necesidad de reducir los efluentes de vinaza con el fin de minimizar el impacto ambiental ocasionado por esta corriente. Por tal razón una de

las estrategias que se lleva a cabo, es la recirculación de la vinaza al proceso de fermentación, lo cual conlleva a la necesidad de utilizar levaduras cuyo metabolismo no sea inhibido ante la presencia de los componentes de la vinaza; dichos compuestos ocasionan varios efectos antagónicos sobre el desempeño de las levaduras como son la inhibición del sistema de transporte de fosfato, que conlleva una disrupción de la membrana celular, la alteración de la morfología y la inhibición de la gemación y alteraciones en la maquinaria enzimática (Navarro et al., 2000).

A nivel comercial, varias empresas de carácter biotecnológico reproducen levaduras, cuyo uso es destinado principalmente para la industria alimenticia, para la producción de bebidas alcohólicas (cerveza y bebidas fermentadas y destiladas) y para la industria farmacéutica.

En términos generales, el sustrato más empleado, tanto en la producción de estas levaduras como en su posterior aplicación, son las mieles provenientes de caña de azúcar. En Colombia, las levaduras de más amplia distribución son las producidas para uso en la industria panificadora por Levapan S.A y Nabisco Royal Colombiana Inc.

En la producción de etanol carburante, el mercado es más reducido, puesto que se hace necesaria la utilización de cepas que presenten tolerancia a altas concentraciones de etanol para asegurar un alto grado de conversión de azúcares en este compuesto. Con este fin, la casa comercial Fermentis[®], ha desarrollado y puesto en el mercado la levadura Ethanol Red[®], reconocida por alcanzar concentraciones de etanol cercanas al 18% v/v (Fermentis[®] website, 2009)

En las plantas productoras de etanol con recirculación de vinaza, se requiere que las levaduras a emplear, presenten los mecanismos fisiológicos para superar los componentes inhibitorios presentes en la vinaza, además de otras características necesarias para ser utilizadas en operación continua, como son la alta capacidad de floculación y sedimentación y estabilidad en fermentación.

Algunas levaduras de tipo comercial, incluidas las de producción local, Levapan® y Fleishman® y la Ethanol Red® han sido evaluadas a nivel experimental en las plantas de producción de etanol carburante, sin embargo su desempeño no ha sido satisfactorio debido al alto poder inhibitorio ejercido por la vinaza. Razón por la cual, no ha sido posible sustituir el uso de las levaduras de la Industria PRAJ®, provenientes de la India.

Varias investigaciones de tipo biotecnológico, han sido dirigidas para la búsqueda y evaluación de levaduras de la especie *S. cerevisiae* en la zona del trópico. Moneke y colaboradores (2008), aislaron y caracterizaron seis cepas de *S. cerevisiae* provenientes de suelo en Nigeria, las cuales fueron señaladas por su alta tolerancia a concentraciones de etanol superiores al 12 % (w/v), presiones osmóticas altas (presencia de sorbitol 15% w/v) y productividades de etanol superiores al 80 %, a partir de concentraciones de sacarosa de 10 y 15 % (w/v).

El estudio reportado por Navarro y colaboradores (2000), donde evalúa la recirculación de vinaza como una alternativa para la reducción de este efluente, demostró que la vinaza tiene un efecto inhibitorio sobre el desempeño de las levaduras, sin embargo puede ser recirculada en una proporción tal, que sus componentes tóxicos no ejerzan actividad antagónica frente a las levaduras. La recirculación tanto de vinaza como de la biomasa de levaduras, favorece una adaptación progresiva de éstas antes las condiciones desfavorables del medio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas del VRC con capacidad de producción de etanol en presencia de vinaza.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar y caracterizar levaduras nativas aisladas en el valle del río Cauca por métodos bioquímicos y moleculares.

Evaluar el comportamiento cinético del metabolismo fermentativo de las levaduras nativas, utilizando como sustrato miel B y vinaza en una concentración entre 40, 50 y 60%.

Formular una metodología para la diferenciación de cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* y su selección para la aplicación a nivel industrial en la producción de etanol.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE

3.1.1 *Situación mundial de la producción de etanol carburante*

El calentamiento global, la necesidad de reducir la dependencia del consumo de combustibles fósiles derivados del petróleo y la aceptación del etanol como aditivo oxigenante de los combustibles utilizados en los automotores, ha conllevado a un incremento notorio en la producción de etanol carburante en los últimos años. La dinámica del crecimiento en la industria del etanol carburante, es liderada principalmente por Estados Unidos y Brasil, los mayores productores. No obstante, varios países han optado por ver los beneficios de este combustible alternativo, generándose así legislaciones que promueven su producción. Como resultado, la producción de etanol carburante se duplicó en el periodo 2000 a 2007, y a partir de entonces sigue creciendo vertiginosamente (Ingledew, 2009).

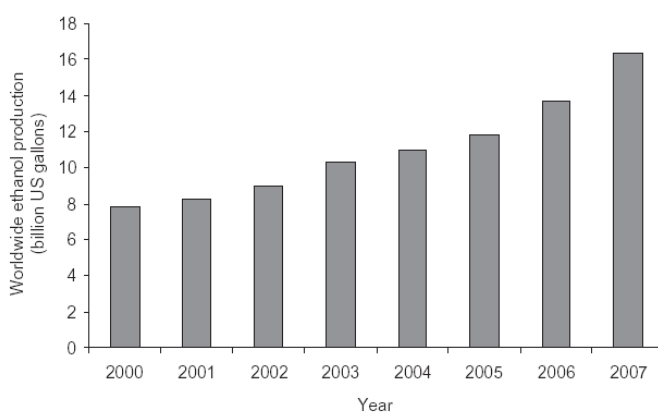


Figura 1. Producción mundial de etanol carburante

Tomado de: Ingledew, 2009

3.1.2 Producción de etanol carburante en Colombia

Las condiciones naturales del Valle del Cauca, localizado en el suroccidente de Colombia, para el cultivo de la caña, constituyen una ventaja comparativa excepcional y determinante de desarrollo. El valle geográfico del río Cauca se encuentra a 1.000 metros en promedio sobre el nivel del mar; tiene una extensión de 429.000 hectáreas planas; su temperatura promedio es de 25°C con oscilaciones de 12° entre el día y la noche; el brillo solar es superior a las seis horas diarias, con humedad relativa de 75.6%, y precipitaciones promedio /año de 1.000 mm.

El complejo productivo azucarero Colombiano, es comúnmente conocido como el cluster de la caña dado que está conformado por cerca de 1.200 proveedores de caña de azúcar, sembrada en 218.311 hectáreas; 13 ingenios, cinco de los cuales tienen plantas productoras de etanol carburante, más de 40 empresas procesadoras de alimentos, bebidas y licores; co-generadores de energía eléctrica; un productor de papel; tres industrias sucroquímicas; más de 50 grandes proveedores especializados; empresas asociativas de trabajo y cooperativas de trabajadores. Al cluster también pertenecen los organismos de apoyo propios del sector azucarero así como una amplia red de instituciones públicas y privadas que le brindan soporte.

El Estado Colombiano, no ajeno al auge cobrado por la incursión de la mezcla de etanol – gasolina, promulgó mediante la Ley 693 de 2001, el marco de regulaciones para alcoholes carburantes en Colombia, la cual dispuso que a partir de septiembre de 2005, toda la gasolina dispensada en las zonas urbanas con una población mayor a 500.000 habitantes debería tener componentes oxigenados tales como alcohol carburante en una proporción del 10% (Briceño Beltrán, 2006).

Basado en la legislación nacional, el sector azucarero Colombiano, a partir del año 2005, incursiona en la producción de etanol carburante, con la puesta en marcha

de cinco plantas de producción, anexas a las fábricas de azúcar, cuya capacidad instalada de producción de etanol es de 1.050.000 litros/día (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas de producción de etanol carburante en Colombia

Planta	Ubicación	Capacidad (Litros día)
Incauca S.A.	Miranda (Cauca)	300.000
Ingenio Providencia S.A	Palmira (Valle)	250.000
Manuelita S.A.	Palmira (Valle)	250.000
Mayagüez S.A.	Candelaria (Valle)	150.000
Ingenio Risaralda S.A.	La Virginia (Risaralda)	100.000

La cuota de producción aportada por las plantas del sector azucarero, para el año 2010 estuvo alrededor de los 287 millones de litros, que representan el 80% de la demanda nacional (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de alcohol carburante en Colombia 2005 - 2009

Año	Producción (Miles de litros)	Área Cubierta
2005	27,034	Valle del Cauca, Cauca, Nariño, Risaralda, Quindío
2006	265,684	Bogotá D.C. (A partir de febrero)
2007	271,773	Santander y Norte de Santander (A partir de junio)
2008	255,584	No hubo aumento del área de cubrimiento
2009	324,563	Huila y Tolima (A partir de marzo); Antioquia y Chocó (A partir de junio).
2010	287.062	A partir de enero de 2010 la mezcla pasó de 10% a 8%

(ASOCAÑA, 2011)

3.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN

3.2.1 Materias primas para la producción de etanol carburante

La producción de etanol, es un proceso de carácter bioquímico basado en la conversión de la molécula de glucosa hasta etanol, mediante vía glicolítica. Por esta razón, existe un amplio rango de sustratos disponibles para su obtención, no obstante para hacer un proceso de producción a costos relativamente bajos, se hace necesaria la utilización de materias primas con alto contenido de glucosa. Los dos sustratos principales son jarabes azucarados ricos además en sacarosa, glucosa y fructosa provenientes de caña de azúcar o jarabes amiláceos provenientes de maíz principalmente.

La producción de etanol a partir de jarabe de maíz o de yuca, es un proceso que demanda un mayor gasto de energía, por cuanto se hace necesaria la utilización de enzimas amilolíticas que permitan desdoblar la molécula de almidón y liberar las subunidades de glucosa. En el caso de los materiales provenientes de la caña de azúcar, no es necesario un consumo adicional de enzimas, debido a que a pesar que es necesario hidrolizar la molécula de sacarosa, en glucosa y fructosa, gran variedad de microorganismos poseen la enzima invertasa necesaria para tal fin.

Por esta razón la caña de azúcar se constituye en uno de los sustratos con mayor productividad (comparado en la base de litros de etanol producido por hectárea cultivada) para la producción de etanol a escala mundial, respecto a otros cultivos como maíz, trigo, soya y remolacha (Figura 3) (ASOCAÑA, 2006).

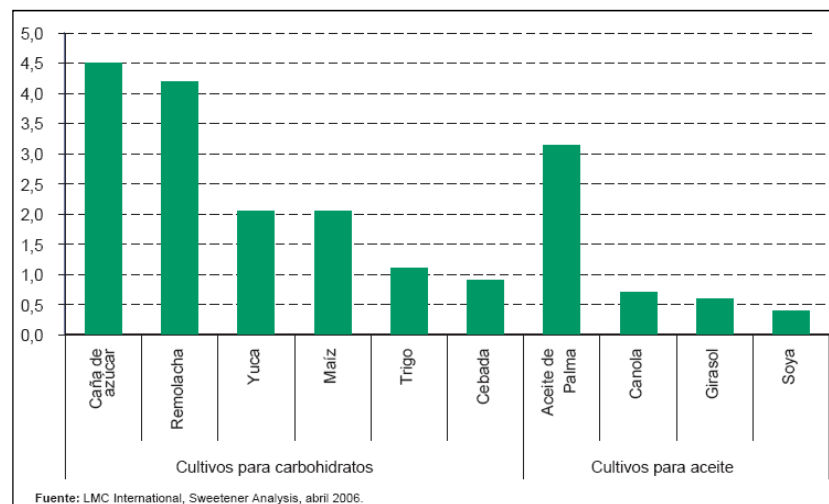


Figura 3. Productividad de Etanol a partir de diferentes cultivos (Toneladas de etanol por hectárea)

3.2.2 Microorganismos utilizados en la producción de etanol

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es uno de los organismos eucariotas más ampliamente estudiado. Su secuencia genómica, fue publicada en 1996. La secuencia completa reveló aproximadamente 6000 genes que codifican proteínas, 120 genes de ARN ribosomal organizados en serie en el cromosoma XII, 40 genes que codifican ARNs dispersos a través de los 16 cromosomas y 273 genes de tARN (Kurtzman et al., 2011).

El género *Saccharomyces*, está dividido en dos grupos mayoritarios: *sensu stricto* y *sensu lato*. Las levaduras del complejo *sensu stricto*, incluyen a las especies *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, y *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*), las cuales son muy relacionadas genéticamente. *S. cerevisiae* es la especie más representativa de este complejo. Las cepas pertenecientes a este complejo contienen al menos 16 cromosomas nucleares de diferentes tamaños. Las moléculas del ADN mitocondrial tiene aproximadamente un tamaño de 64 a 85 kb (Masneuf et al., 1998).

Saccharomyces cerevisiae es un organismo que puede crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias, produciendo etanol (fermentación alcohólica) en condiciones anaerobias. Sin embargo, se ha observado que también lo produce en condiciones óxicas, pues sólo el 10% de la glucosa es metabolizada a través de la respiración, siendo el resto metabolizado de forma fermentativa (van den Brink et al., 2008).

El flujo fermentativo se realiza en *Saccharomyces* a partir del piruvato que proviene de la ruta glicolítica de Embden Meyerhoff (EMH). Este piruvato es transformado en dos reacciones enzimáticas: una descarboxilación no-oxidativa por parte de la enzima piruvato decarboxilasa (PDC) para producir una molécula de dos carbonos (el acetaldehído y dióxido de carbono) y otra reacción de reducción de acetaldehído a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); este último paso se da acoplado a la oxidación de NADH a NAD (Figura 5).

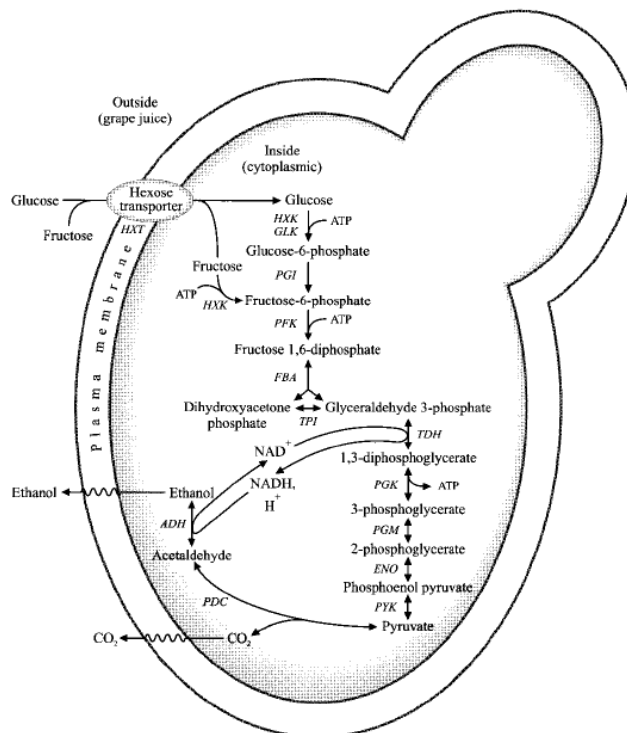


Figura 5. Vía metabólica de *S. cerevisiae* para la producción de etanol
Tomado de: (Ingledew, 2010)

La maquinaria metabólica de *S. cerevisiae*, le permite la transferencia de condiciones de respiración a fermentación en un corto tiempo. Es así como durante un corto período incrementa su velocidad catabólica e inicia la acumulación de etanol, así como produce pequeñas cantidades de acetato, succinato y glicerol. Esta capacidad dinámica es el resultado del proceso de evolución, lo cual le ha permitido crear un ambiente hostil para la competencia frente a otros organismos, asegurando así su supervivencia (van den Brink et al., 2008).

Igualmente, esta flexibilidad metabólica ha hecho de *S. cerevisiae*, uno de los microorganismos de más amplio uso a nivel industrial. Por ejemplo, la biomasa de levadura bajo condiciones de limitación de glucosa durante su almacenamiento, puede adaptarse rápidamente a concentraciones altas de azúcares durante el proceso de elaboración del pan (van den Brink et al., 2008).

S. cerevisiae, además utiliza como sustrato monosacáridos como D-galactosa, D-manosa y D-fructosa. Sin embargo, en presencia de D-glucosa se inhibe la maquinaria enzimática para la utilización de estas fuentes alternativas. Por otro lado, *S. cerevisiae* es incapaz de asimilar otros monosacáridos (pentosas como la xilosa y la arabinosa), razón por la cual actualmente varios estudios de aplicación de la ingeniería genética, se ha centrado en el mejoramiento de cepas de *S. cerevisiae* que presenten la capacidad de metabolizar estos sustratos, y obtener cepas promisorias para la producción industrial de etanol de segunda generación (Karhumaa et al., 2007).

Además de los monosacáridos de seis carbonos mencionados anteriormente, *S. cerevisiae* es capaz de metabolizar di y trisacáridos, mediante la secreción de enzimas llamadas invertasas (glicosidasas), las cuales actúan sobre estas moléculas liberando sus monómeros estructurales, los cuales fácilmente son ingresados al interior celular y metabolizados. Entre estas moléculas se encuentran la sacarosa (Glucosa y fructosa), melibiosa (glucosa y galactosa) y rafinosa (fructosa, glucosa y galactosa) (Myers et al., 1997).

3.2.3 Proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar

Las características físicas y químicas del jugo de caña de azúcar, lo convierten en un excelente medio para el desarrollo de microorganismos, gracias a su contenido de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos y a otras características tales como su actividad de agua y pH. En conjunto, estos factores permiten que los microorganismos puedan degradar la sacarosa presente en el jugo y formar, además de la biomasa celular, metabolitos tales como etanol, ácidos orgánicos y polisacáridos, entre otros (Cerutti de Gugliomone, 2000, Michelena, 2006).

Durante el proceso de producción de azúcar y mieles, el jugo extraído de la caña de azúcar es sometido a un proceso fisicoquímico de clarificación, con el fin de remover estas impurezas y obtener un jugo clarificado y limpio, propicio para el buen desempeño de las levaduras en un proceso de fermentación.

En el proceso de fabricación de azúcar, el jugo claro con un contenido de agua cercano a 85%, se concentra por medio de evaporadores de múltiple efecto para producir un jarabe (meladura o *syrup*) con un contenido de agua de 37 al 43%. Posteriormente, la meladura es sometida a un proceso de cristalización de la sacarosa, y una vez retirados los cristales de sacarosa mediante centrifugación, se obtienen licores agotados (melazas o mieles) los cuales tienen un menor contenido de sacarosa pero altos contenidos de glucosa y fructosa que, aunque no son cristalizables, constituyen la materia prima para la producción de alcohol (Acevedo, 2005).

La producción de etanol, a partir de los materiales provenientes de la fábrica de azúcar, tiene 4 procesos básicos que son: fermentación, destilación, deshidratación y rectificación y finalmente una etapa de compostaje para el tratamiento de efluentes y subproductos de la producción de etanol (vinaza) y de azúcar (cachaza, bagazo, cenizas). El proceso de fermentación propiamente dicho, arranca cuando los azúcares fermentables presentes en la materia prima, se ponen en contacto con una levadura, la cual los transforma a etanol y gas

carbónico. Al producto de la fermentación se le conoce como 'Vino' que es un material rico en alcoholes, especialmente el etanol.

Posteriormente, se hace necesario separar el compuesto principal (etanol) de los demás componentes del vino. Generalmente, este proceso se ejecuta mediante la separación por destilación, proceso basado en las diferencias en el punto de ebullición de cada compuesto químico. Estas diferencias de punto de ebullición dan lugar a una clasificación de la mezcla a separar, que se traduce en el establecimiento de una jerarquía basada en la volatilidad relativa de la mezcla. Los alcoholes (etanol principalmente), que tienen mayor volatilidad que los sólidos e impurezas presentes en la materia prima, salen por la parte superior de una primer columna de destilación (despojadora) con una concentración de 40 – 45% de etanol; mientras que la mayor cantidad de impurezas sale por la parte inferior de la misma, corriente conocida como vinaza. (Ingenio Providencia, 2006).

Los vapores procedentes de la columna despojadora, con un contenido del 40 – 45% de etanol se envían a la columna rectificadora, donde se aumenta su concentración hasta aproximadamente el 95% p/p. Finalmente, mediante la técnica de tamices moleculares, donde resinas de intercambio retienen el agua presente en los vapores del alcohol rectificado, se obtiene etanol con una concentración del 99.5% p/p, cumpliendo con los requisitos para ser utilizado como agente oxigenante de la gasolina.

3.2.4 La vinaza

La vinaza es el principal efluente en la producción de etanol, y es producida durante el proceso de destilación. Se obtiene en una proporción superior a los 10:1, con relación al etanol producido. La vinaza se caracteriza por tener valores de pH bajos (menores a 4.5) y por presentar altos contenidos de materia orgánica en suspensión, expresados en términos D.Q.O y D.B.O, y alto contenido de

minerales, lo cual la hace un alto contaminante e impide su descarga directa en fuentes hídricas (Olguín et al., 1995).

La caracterización de vinazas concentradas producidas en una planta de producción de etanol a partir de miel de caña, demostró que en este material se encuentra una gama amplia de compuestos orgánicos entre los que se destacan azúcares, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos. La presencia de estos compuestos tienen como origen, la materia prima en sí, su producción durante la fermentación ya sea por la levadura o por otros agentes microbianos contaminantes, o la degradación térmica de algunos constituyentes durante el proceso de destilación (Larrahondo, 2000).

Los principales compuestos identificados fueron glicerol, ácido aconítico, sorbitol, ácido láctico, ácido quínico, β fructofuranosa y α – glucopiranososa, además de compuestos volátiles como 2,3 – butanodiol, alcohol furfurílico, benzaldehído, 3-metoxiacetona. También reportaron presencia de polímeros y colorantes de alto peso molecular. (Larrahondo, 2000).

En otro estudio , , determinaron que la gravedad específica de la vinaza diluida está alrededor de 1Kg L^{-1} , mientras en la vinaza concentrada es de 1.35 Kg L^{-1} , de igual forma en la vinaza concentrada es mayor la concentración de materia seca (Parnaudeau et al., 2008).

Los mismos investigadores, señalaron las diferencias en la composición de vinazas provenientes de mieles de caña de azúcar o de remolacha, y de la mezcla de los dos tipos. La relación C:N en la vinaza, varía desde 23 – 42 según el material de origen. Entre los compuestos presentes tanto en vinazas diluidas como concentradas provenientes de mieles de caña, encontraron, ácidos orgánicos Lactato, acetato, propionato, formato, butirato, tartrato, malato, oxalato, *iso*-citrato, *cis*-aconitato, *trans*-aconitato; alcoholes entre inositol, glicerol, arabitól, sorbitol, y manitol; y carbohidratos entre trehalosa, galactosa, fructosa, glucosa y sacarosa (Parnaudeau et al., 2008).

Además de estos compuestos, se han reportado altos contenidos de compuestos inorgánicos, entre los que se destacan compuestos nitrogenados y sales de potasio y calcio. En la Tabla 3, se encuentran los resultados obtenidos en estudios realizados en Cenicaña, del contenido de compuestos inorgánicos en vinaza, donde se destacan los altos contenidos de potasio, expresados en términos de K_2O .

Tabla 3. Caracterización de compuestos inorgánicos en vinazas concentradas y diluidas

Análisis	Unidad	Vinaza 55% s.t.	Vinaza 10% s.t.
Materia orgánica	(%)	47,77	4,20-6,70
N	(kg/m ³)	4,30	0,63-1,14
P ₂ O ₅	(kg/m ³)	0,50	0,07-0,25
K ₂ O	(kg/m ³)	41,00	6,00-10,86
CaO	(kg/m ³)	7,00	1,05-3,14
MgO	(kg/m ³)	9,00	1,34-2,26
SO ₄ ²⁻	(kg/m ³)	35,00	3,88
pH	-	4,3-4,5	3,5-4,3
Densidad	(kg/m ³)	1,35	1,03

Tomado de : (Quintero Durán, 2008)

Teniendo en cuenta las caracterizaciones realizadas a las vinazas, el sistema de aplicación en terreno, ha sido la estrategia más difundida para su disposición, por cuanto permite, además de su tratamiento, el aprovechamiento de gran contenido de nutrientes y en la mayoría de los casos la sustitución de fertilizantes de tipo químico como el cloruro de potasio haciéndola así atractiva para su uso agrícola (Larrahondo, 2000, Parnaudeau et al., 2008).

3.2.5 Limitaciones y problemas frecuentes

La fermentación alcohólica es un proceso dinámico, en el cual las células de *Saccharomyces cerevisiae* están sujetas a estrés por cambios ambientales, tales

como la limitación de nutrientes, alta osmolaridad e incremento en la concentración de etanol. Igualmente, pueden presentarse variaciones en la temperatura del fermentador, afectando directamente el crecimiento celular, la actividad fermentativa y la viabilidad celular.

Los principales factores que afectan el desempeño metabólico de la levadura son la presencia de compuestos orgánicos alternativos, como son los alcoholes superiores (llamados comúnmente aceites “fusel”), los cuales también son producidos por las levaduras en pequeñas proporciones. Sin embargo, su acumulación puede causar problemas dado que estos alcoholes inducen cambios morfológicos en las levaduras expresados en la formación de filamentos, los que ocasionan en primer lugar una disminución en la relación área-superficie y posteriormente afectan el metabolismo celular.

Además de lo anterior, se aumenta la tensión superficial del mosto ocasionando la formación de espuma, el rebose de los equipos, altos consumos de insumos como antiespumantes lo cual se traduce en pérdidas tanto de azúcar como de etanol (Ceccato-Antonini et al., 2004).

Debido al origen agrícola de las materias primas y a los grandes volúmenes manejados en el proceso de producción de etanol a escala industrial, la esterilización previa de las mieles de caña de azúcar se constituye en un proceso inviable debido a la alta demanda de energía que implicaría esta acción.

Por esta razón, en algunas ocasiones el proceso de fermentación se puede ver afectado por episodios de contaminación microbiana, principalmente por bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, las cuales inhiben a la levadura alcoholera hasta en un 80%, debido en primer lugar a la competencia por el sustrato, y en segundo lugar por la producción de ácidos orgánicos tóxicos para la levaduras (Oliva-Neto and Yokoya, 2001).

Además de las bacterias ácido lácticas, la contaminación puede ser ocasionada por la invasión en los fermentadores de levaduras nativas, tanto de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, como de otras especies, las cuales compiten con la

levadura comercial y pueden ocasionar una disminución en la producción de etanol además de otros problemas operacionales como la formación de espuma (Oliva-Neto and Yokoya, 2001, Acevedo, 2005).

En procesos industriales de producción de etanol, donde se utilizan procesos continuos con recirculación de la crema de levadura, los contaminantes microbianos son también recirculados, incrementando su concentración a través del proceso y ocasionando problemas por competencia e inhibición a la levadura (Oliva-Neto and Yokoya, 2001).

La acidez volátil es un parámetro fisicoquímico, utilizado como control en las plantas de producción de etanol que se refiere principalmente a la presencia de ácido acético, ácido propiónico, ácido valérico y ácido butírico producto del metabolismo de las levaduras o de otros microorganismos contaminantes.

Las altas concentraciones de los ácidos orgánicos son tóxicas para la levadura, disminuyen su actividad metabólica y pueden causar su muerte. Un alto contenido de estos ácidos incrementa el tiempo de fermentación y genera subproductos indeseables por las reacciones colaterales con el azúcar, disminuyendo la eficiencia de la fermentación (Acevedo, 2005).

3.3 . POTENCIAL DE USO DE LEVADURAS NATIVAS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE EN COLOMBIA

Los estudios de evaluación de cepas nativas con potencial para la producción de etanol, se han centrado en evaluar el desempeño metabólico de levaduras nativas ante sustratos específicos, así como el comportamiento de estas cepas ante diversos factores del medio que comúnmente la levadura comercial debe soportar como son altas concentraciones de etanol, presencia de metabolitos inhibidores como alcoholes superiores y la capacidad de floculación, entre otros.

A nivel mundial, varios investigadores se han enfocado en la búsqueda de levaduras de interés industrial, realizando estudios especializados en los campos de la biotecnología, la biología molecular, el mejoramiento genético y fisiología. Sobresalen los siguientes grupos de investigación:

- Yeast Physiology Research Group, New South Wales, Australia.
- Departamento de Genética, Universidad Federal de Pernambuco, Brasil.
- Department of Genetics and Microbiology, Charles University, República Checa.
- Instituto de Fermentaciones Industriales, Universidad de La Rioja, España.
- Grupo de Microbiología Industrial, Universidad de Delft, Holanda.
- Fermentec en convenio con la Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidad de Sao Paulo, Brasil.
- Grupo de Microbiología Molecular de Levaduras Industriales, Universidad de Valencia, España.
- National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture, Illinois, USA.
- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Colmar, France.
- Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, China
- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Iran
- Department of Microbiology, University of Nigeria, Nigeria.

3.3.1 Producción de etanol en presencia de vinaza

Varias estrategias han sido sugeridas para el tratamiento de vinazas como lo son la digestión anaerobia, ósmosis inversa y electrodiálisis. Estos tratamientos no presentan un grado de desarrollo suficiente para tratar los altos volúmenes producidos.

Otra estrategia es su recirculación al proceso de fermentación, permitiendo la reducción en el consumo de agua y el aprovechamiento de los nutrientes presentes en este efluente, factores que se traducen al final en incrementos de la eficiencia global del proceso (Olguín et al., 1995).

La recirculación de la vinaza a la etapa de fermentación, presenta un reto muy importante puesto que además del aprovechamiento de las sustancias inorgánicas presentes como nutrientes de las levaduras, una amplia gama de compuestos, principalmente orgánicos pueden reducir o inhibir la actividad metabólica de las mismas (Parnaudeau et al., 2008).

Varios estudios han sido reportados con relación al efecto de los ácidos orgánicos sobre las levaduras y han establecido valores de concentración de algunos agentes que son considerados como “alarmas” en el proceso industrial, indicando que existen problemas en el desempeño metabólico de las levaduras lo cual conlleva a disminuciones en la eficiencia de conversión de azúcar a etanol. La mayoría de estos eventos se deben a la presencia simultánea de dos o más componentes tóxicos (Graves et al., 2007, Oliva-Neto and Yokoya, 2001)

Según Ingledew y colaboradores (2009), los ácidos que más repercuten en el desempeño de la levadura son el láctico y el acético, los cuales son productos del metabolismo de bacterias contaminantes. Aunque el ácido láctico se produce en mayores proporciones, el efecto inhibitor del ácido acético es mayor.

Estudios realizados en destilerías colombianas, demostraron que eventos de baja eficiencia en fermentación y posterior necesidad de liquidación y reinicio del proceso, estaban relacionados con altas concentraciones de ácidos acético y butírico presentes en la vinaza vinaza recirculada que inhiben el desempeño de la levadura (Socarras Díaz, 2009).

3.3.2 Evaluación de levaduras nativas para producción de etanol

Las cepas consideradas como apropiadas para uso industrial deben responder rápidamente a condiciones de estrés y deben tener la capacidad de adaptarse a factores ambientales adversos, ajustando sus actividades metabólicas para evitar la pérdida de viabilidad. Por esta razón, uno de los criterios más importantes a tener en cuenta en la selección de cepas nativas potenciales es su capacidad de tolerancia a situaciones de estrés, como ocurre cuando la levadura se encuentra en un medio de alta concentración de etanol (Zhao and Bai, 2009).

Santos y colaboradores (2008), evaluaron el efecto de la alta concentración de etanol y reportaron que este compuesto no sólo inhibe el crecimiento celular, sino también ocasiona una represión en el sistema de transporte de glucosa (Santos et al., 2008).

Ceccato-Antonini y colaboradores (2004), evaluaron cepas de levaduras aisladas a partir de diferentes materiales de dos plantas productoras de etanol en Brasil y encontraron una levadura que demostró producción de etanol máxima de 5.62 % (p/v), utilizando como sustrato jugo de caña clarificado. Dicho valor fue superior al resultado obtenido con la levadura comercial evaluada como testigo, la cual alcanzó 5.52 % (p/v).

Otro de los aspectos a evaluar para la selección de cepas nativas en la producción de etanol es su capacidad de floculación, ya que la presencia de esta propiedad en una cepa industrial favorece la estructura de costos de producción puesto que se disminuye el consumo energético derivado de la operación de centrifugación de la biomasa efluente del fermentador (Nahvi et al., 2002).

La capacidad de floculación consiste en la agregación de células de carácter reversible y no sexual, hasta formar flóculos. Esta característica está mediada por la presencia de genes de la familia *Flo*, cuya expresión se traduce principalmente en la producción de proteínas en la membrana celular (floculinas o adhesinas), las

cuales actúan como receptores específicos de azúcares y de iones Calcio y favorecen la adhesión a otras células (Zhao and Bai, 2009).

Merece destacarse el aporte de Ma y colaboradores (2009), quienes indujeron la floculación en una cepa de *S. cerevisiae*, a partir de 30 ciclos de fermentaciones tipo batch consecutivas, al cabo de los cuales obtuvieron una cepa mutante cuyo fenómeno de floculación se presentó en la fase estacionaria en un cultivo batch (Figura 2).

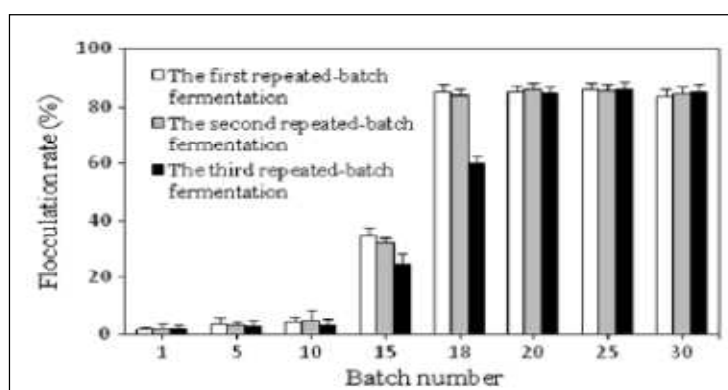


Figura 2. Evolución de la formación de células floculantes

Tomado de:(Ma et al., 2009).

Nahvi y colaboradores aislaron una cepa de *S. cerevisiae*, y evaluaron su comportamiento fermentativo utilizando miel de remolacha como sustrato, obteniendo una producción de etanol de 5.6 % v/v y un porcentaje de floculación alrededor de 64 % (Nahvi et al., 2002).

Entre los parámetros a evaluar en la valoración del potencial industrial de cepas nativas se encuentra la capacidad asesina (*killer* en inglés) que presentan algunas levaduras, que es la representación física de la existencia de un mecanismo de defensa y supervivencia eficiente de la especie microbiana frente a eventos de competencia o invasión del medio. Esta propiedad adquiere una gran importancia a nivel industrial, puesto que garantizaría la permanencia y predominancia de una

levadura en un proceso fermentativo en los casos de eventos de contaminación (Chen et al., 2000)(Ceccato-Antonini et al., 2004).

Se ha comprobado que en el proceso de fermentación de azúcares, ocurre una primera fase cinética en donde se hace vital la presencia de la enzima invertasa, la cual posee la capacidad de hidrolizar la sacarosa presente en el medio, para producir azúcares reductores simples como glucosa y fructosa. Este proceso de hidrólisis ocasiona simultáneamente un incremento de la presión osmótica en el medio de fermentación, el cual puede inhibir el crecimiento de la levadura. Sin embargo, las levaduras en su proceso de adaptación, pueden contrarrestar este efecto mediante su mecanismo de producción de glicerol y por medio de su retención intracelular, lo cual les permite una actividad fermentativa alta aún en presencia de altas concentraciones de sacarosa (Myers et al., 1997).

Como se señaló, la levadura productora de etanol en realidad se constituye en una consumidora de glucosa y fructosa, en el caso en que se encuentre en un medio rico en sacarosa. Tomando en consideración este punto, es necesario dentro de un proceso de selección de especies nativas, la evaluación de su habilidad para consumir fructosa aún bajo condiciones de estrés, puesto que la acumulación de fructosa en el medio es una de las principales causas de las fermentaciones con baja eficiencia. Santos y colaboradores (2008), estudiaron el comportamiento de varias cepas aisladas así como el de cepas comerciales, y evidenciaron que las cepas comerciales exhibieron un mayor consumo de fructosa aún cuando fueron expuestas a altas concentraciones de etanol y ácido acético.

En resumen, el perfil ideal de propiedades que debe cumplir una levadura nativa para cumplir los requerimientos de un proceso industrial a gran escala, es tener tolerancia a concentraciones de azúcares totales mayores al 15% p/v y presentar una capacidad metabólica para lograr altas conversiones de sacarosa a etanol sin que la acumulación del producto metabólico genere la inhibición en el crecimiento de la población.

Sumado a esto, es importante que las levaduras presenten una alta velocidad de crecimiento para que el tiempo de retención sea mayor o igual al tiempo de retención hidráulico del fermentador, con el fin que les permita mantenerse en la concentración adecuada para garantizar la conversión de los azúcares a etanol en el menor tiempo posible.

Otras características de interés para la selección de levaduras es que éstas exhiban altas velocidades de sedimentación, alta resistencia a eventos de contaminación por biotas exógenas al fermentador industrial ó a la presencia de compuestos químicos disueltos o suspendidos en el medio de fermentación, que eventualmente puedan inhibir su desempeño industrial.

3.3.3 Metodologías para la valoración del potencial de utilización de levaduras nativas en procesos industriales.

En el proceso industrial de producción de etanol, es necesario realizar de manera rutinaria, una inspección para determinar la presencia de microorganismos contaminantes del proceso, con el fin de evitar problemas operacionales (Basílio et al., 2008).

El monitoreo del comportamiento de las levaduras nativas en un proceso de fermentación requiere de métodos microbiológicos precisos, que permitan diferenciar y asegurar que en realidad los microorganismos aislados, son ubicuos de la zona. Varios medios de cultivo, han sido desarrollados y reportados como selectivos para levaduras nativas; tal es el caso del Agar lisina, Agar cristal violeta, Agar UBA (Universal Beer Agar), entre otros. Sin embargo, ninguno de estos medios ha demostrado ser selectivo en cuestión de diferenciación de levaduras de la especie *S. cerevisiae* (van der Aa Kühle and Jespersen, 1998).

Actualmente existen varios métodos de identificación de levaduras de interés enológico mediante técnicas de biología molecular con resultados rápidos, fiables

y económicos. Estos métodos se basan esencialmente en el análisis directo del ADN de la levadura; las diferencias entre las propiedades de este ADN se denominan *polimorfismo*. El mayor reto al identificar cepas de levadura recae en la necesidad de diferenciar grupos y especies que taxonómicamente están muy cerca, pero que tienen propiedades muy diferentes en lo que respecta a sus aptitudes fermentativas y organolépticas (http://www.acenologia.com/ciencia52_1.htm).

Hoy en día, se considera que este género tiene 10 especies, la más importante de las cuales es precisamente *S. cerevisiae* (Naumova et al., 2003). A pesar de ello, dentro de esta especie existe una gran diversidad, que obliga a subdividirla en seis grupos, sin valor taxonómico, aunque con relevancia práctica. Estos grupos (llamados *cerevisiae*, *ellipsoideus*, *oviformis*, *cheresanus*, *diastaticus* y *logos*) coinciden parcialmente con los diferentes usos de estas variedades. Por ahora, el sistema más fiable para clasificar las levaduras se basa en comparaciones directas de las composiciones de los ADN de la cepa problema con una cepa patrón, por hibridación. Se considera que dos variedades pertenecen a la misma especie cuando sus ADN difieren en menos del 20%.

Varios avances en biología molecular han llevado al desarrollo de nuevas técnicas para la identificación de levaduras, basados en la similitud de las secuencias de ADN, ARN o proteínas, entre las que se incluyen cariotipificación electroforética, hibridación de patrones de ADN, análisis de microsatélites, polimorfismo aleatorio amplificado RAPD y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés), entre otros (Silva Fihlo et al, 2005).

Esteve-Zarzoso y colaboradores (1999), evaluaron los patrones generados por los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 de un total de 132 cepas pertenecientes a 25 géneros diferentes, y encontraron que los productos de PCR generados y los patrones de restricción obtenidos permitían discernir un perfil único para cada especie utilizando las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*.

Barszczewski y Robak (2004), analizaron 27 cepas aisladas en la industria cerevecera mediante las técnicas de RFLP y RAPD y encontraron 19 patrones de restricción diferentes, por lo cual sugieren la implementación de estas dos técnicas de manera simultánea para obtener mayor certeza en la diferenciación de cepas comerciales y nativas (Barszczewski and Robak, 2004).

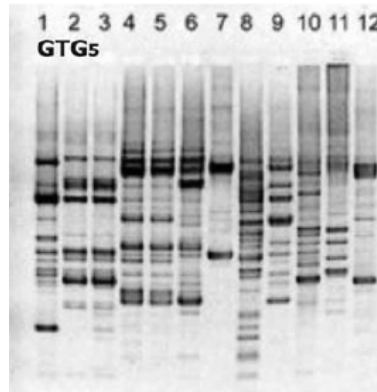
Basados en el estudio reportado por Esteve-Zarzozo y colaboradores (1999), Cenicaña adelantó las evaluaciones de 14 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, entre comerciales y nativas aisladas a partir de una planta de producción de etanol, y encontró que bajo las condiciones analizadas, se generaron patrones de restricción que no presentaron polimorfismos entre sí, lo cual evidenció la necesidad de evaluar otras alternativas de análisis (Buzón, 2008).

Varios autores han sustentado que el análisis de levaduras utilizando simultáneamente las técnicas de *fingerprinting* con microsatélites y la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande de 26s y la pequeña subunidad ribosomal 18s, permiten realizar una diferenciación de levaduras aún entre miembros de la misma especie (Kurtzman and Robnett, 1998, Santos et al., 2007, Legras and Karst, 2003).

Silva-Filho y colaboradores, han reportado el uso de marcadores microsatelites para realizar la diferenciación intraespecífica de cepas de *S. cerevisiae*, basado en la reacción de amplificación de iniciadores simples (SPAR por sus siglas en inglés), como lo es el (GTG)₅, los cuales reconocen sitios específicos y mediante PCR realizan la amplificación de segmentos genómicos, los cuales son flanqueados mediante secuencias repetidas espaciadas y orientadas inversamente (Silva-Filho et al., 2005).

El uso de este marcador, permitió un alto poder discriminatorio, entre cepas de la misma especie resultando una herramienta confiable para la realización de estudios de dinámica poblacional en un proceso de fermentación industrial, como muestra la

Figura 3, donde se puede apreciar el amplio polimorfismo de varias cepas del complejo *Saccharomyces* sensu estricto (Silva-Filho et al., 2005, Santos et al., 2007).



Carril 1 *S. cerevisiae* Y 12632; **Carril 2** *S. paradoxus* Y 17217; **Carril 3** *S. paradoxus* CLIB 228; **Carril 4** *S. bayanus* Y 12624; **Carril 5** *S. bayanus* CLIB 181; **Carril 6** *S. uvarum* CLIB 533; **Carril 7** *S. pastorianus* Y 27171; **Carril 8** *S. carlsbergensis* CLIB 176; **Carril 9** *S. monacensis* CLIB 180; **Carril 10** *S. cariocanus* Y 27337; **Carril 11** *S. mikatae* Y 27341; **Carril 12** *S. kudriavzevii* Y 27339

Figura 3. Análisis *Fingerprinting* con el iniciador (GTG)₅ de cepas del complejo *Saccharomyces* sensu estricto

(Santos et al., 2007)

En resumen, para la industria de producción de etanol carburante y otros productos que utilizan como catalizador biológico a las levaduras (como es el caso de las industrias vinícola, cervecera, panificación, entre otras) existe el interés por la evaluación de organismos nativos.

Se han establecido varios parámetros que permitan a escala de laboratorio la diferenciación y el establecimiento del potencial de aplicación industrial. Estos parámetros ideales para el proceso de búsqueda, evaluación y selección son:

- Tolerancia y crecimiento en altas concentraciones de etanol
- Alta actividad invertasa
- Baja producción de ácidos orgánicos
- Baja producción de ácido sulfhídrico

- Buena formación de flóculos
- Alta capacidad fermentativa
- Baja producción de espuma

(Nahvi et al., 2002, Myers et al., 1997, Oliveira et al., 2008, Zhao and Bai, 2009).

4. DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA UTILIZADA PARA LA IDENTIFICACION DE CEPAS NATIVAS CON POTENCIAL ALCOHOLERO

El presente trabajo, tiene cuatro fases de desarrollo principales: una primera etapa, en la cual se realizó el **aislamiento, caracterización bioquímica y molecular** de una población de levaduras obtenidas a partir de diferentes ambientes presuntivos de sufrir procesos de fermentación natural.

Una segunda etapa, consistió en la **evaluación de la capacidad de producción de etanol de las cepas seleccionadas**, bajo unas condiciones establecidas. Las cepas que en esta evaluación presentaron mejor desempeño, además de tres aislamientos de *S. cerevisiae* aislados en trabajos paralelos al presente trabajo, fueron seleccionadas para una tercera etapa, en la cual se realizó la **evaluación de la producción de etanol en presencia de 50 y 60% de vinaza** y por último éste mismo grupo de levaduras, fue **evaluado a escala de bioreactor** de 14 litros.

Para todas las etapas del trabajo, se empleó el mismo tipo de sustrato, que corresponde a la miel B y a la vinaza como se explicará posteriormente.

4.1 TÉCNICAS ANALITICAS Y MÉTODOS DE MEDICIÓN UTILIZADOS

4.1.1 *Sustrato utilizado*

La miel B, corresponde al producto del segundo agotamiento del jugo de caña de azúcar concentrado (meladura), material con menor contenido de sacarosa, debido a que gran parte de ésta ha sido retirada después del proceso de cristalización.

La miel B, presenta un alto contenido de sólidos solubles, expresados por °Brix (g sólidos solubles/100 g de solución), valores que oscilan entre 55 – 75 °Brix. El pH, se encuentra en el rango entre 6 y 6.5, y el contenido de azúcares expresados como azúcares reductores totales (A.R.T) entre 50 – 70 % (p/v). De igual manera, el contenido de amino nitrógeno libre (F.A.N por sus siglas en inglés), se encuentra en el rango entre 200 y 3000 mg/l. Esta caracterización fisicoquímica, fue realizada a todas las materias primas utilizadas en los ensayos del presente proyecto, por el laboratorio de calidad de las plantas de producción de etanol.

Por otro lado, la vinaza corresponde a la corriente obtenida después de la separación del etanol mediante destilación presente en el vino obtenido en la etapa de fermentación. La vinaza contiene todos aquellos azúcares que no fueron fermentados por la levadura, algunos compuestos orgánicos principalmente ácidos producto del metabolismo de las levaduras u otros agentes microbianos, y compuestos inorgánicos propios de la miel B o adicionados durante el proceso.

Para todas las pruebas fermentativas, la miel fue acondicionada con el fin de obtener las condiciones óptimas para el desempeño de la levadura. En primer lugar, los A.R.T fueron ajustados mediante dilución de la miel hasta alcanzar la concentración deseada cercana al 12% p/v; posteriormente la concentración de nitrógeno y fósforo fue ajustada por adición de difosfato de amonio (D.A.P), con base en el contenido de F.A.N. Finalmente, el pH fue ajustado con ácido sulfúrico concentrado (36 Normal). El sustrato fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 1.034 bar (15 psig)

4.1.2. Cuantificación de azúcares mediante HPLC

La concentración de azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa fue cuantificada mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC con un equipo marca Waters™ en el laboratorio de Análisis de Caña de Cenicaña. Las características del equipo son:

- Bomba Waters™ Modelo 501
- Inyector Reodyne™
- Cámara de Calentamiento Waters™
- Controlador de Temperatura de la cámara Waters TCM™
- Detector IR Waters 410™
- Módulo de datos Waters 746™
- Columna Sugar-Pak I Waters™

4.1.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de todos los ensayos, fueron compilados en hojas de cálculo, y posteriormente analizados haciendo uso del software Statistical Analysis System S.A.S. versión 11.0

4.2 AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS

Las muestras con presuntiva presencia de levaduras alcoholeras, fueron sometidas a un proceso de enriquecimiento selectivo, utilizando una mezcla de miel B y vinaza como medio de cultivo, similar al ambiente de la producción a nivel industrial de etanol; de ésta manera se favorece el crecimiento únicamente de los microorganismos que pueden desarrollarse en éstas condiciones.

Las muestras analizadas eran provenientes de distintos ambientes, algunos de ellos asociados con la caña de azúcar y procesos de fermentación alcohólica, entre los que se encuentran muestra de suelo de cultivos de caña. Otros ambientes utilizados son el proceso de producción de vino a partir de uvas, las aguas residuales agroindustriales del procesamiento del café y algunas bebidas

alcohólicas artesanales y sustratos vegetales azucarados diferentes a la caña de azúcar, hasta obtener un total de 11 muestras diferentes.

Muestras de miel B fueron diluidas a una concentración de A.R.T de 12% (p/v) y una concentración volumétrica de vinaza equivalente al 50% en volumen. La concentración de F.A.N se ajustó a 300 mg/L y el pH a 4.5. El medio de cultivo fue esterilizado como se mencionó anteriormente.

Para lograr el aislamiento de levaduras a partir de las muestras, 10 g o mL de las mismas se pusieron en contacto en 90 mL del medio de cultivo, adicionado de 2.5 mL de una solución de penicilina (1mg/mL). La incubación de la mezcla se realizó a 30°C, 100 r.p.m, durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó un recuento de la población de levaduras presentes mediante la técnica de recuento en placa utilizando agar YGC. La concentración de etanol de cada uno de los sustratos sometidos a enriquecimiento selectivo, se determinó mediante densimetría (PRAJ D3).

El aislamiento de las colonias más representativas, se realizó a partir de los cultivos obtenidos mediante el recuento en placa, basados en la morfología de las colonias obtenidas y se conformó el banco de trabajo.

4.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS LEVADURAS NATIVAS AISLADAS

Los cultivos de colonias individuales en agar YM fueron la base para la identificación morfológica de cada una de las levaduras aisladas por visualización directa al microscopio y mediante la tinción de Gram.

La identificación bioquímica, se realizó utilizando el Kit API 20CAUX[®] (BioMérieux), el cual consiste en una batería bioquímica, que permite determinar la asimilación de 19 sustratos diferentes por parte de la levadura a evaluar. La identificación se realizó de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial. Se

utilizó el programa informático API WEB® (BioMérieux) para la interpretación de los resultados.

Para corroborar los resultados obtenidos por el Kit API®, algunas cepas se enviaron a un laboratorio externo, para realizar la identificación bioquímica por un método alternativo al utilizado en este estudio, llamado Rapid Yeast ID, que consta de un panel de 27 pozos de microdilución, con 27 sustratos deshidratados comprendidos entre 13 aminoácidos p naphtilamidas; 9 nitrofenil carbohidratos, 3 carbohidratos, urea e indolxyl fosfato.

4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS NATIVAS

4.4.1 Extracción de ADN

Colonias obtenidas de cultivos jóvenes (48 horas), se transfirieron a medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2% p/v) y se incubaron durante 16 horas, a 30°C, con agitación constante de 150 r.p.m. Las células se colectaron por centrifugación en una centrífuga Eppendorf 5820, a 8000 r.p.m durante 5 min utilizando viales de 1.5 mL estériles. Posteriormente, las células se suspendieron en 0,5 ml de una solución de sorbitol 1M, EDTA 0,1M, (pH 5) adicionada con β - glucoronidasa (Roche®) con una concentración equivalente a 50 Unidades (U) y liticase con una concentración equivalente a 50 Unidades (U). Esta suspensión se incubó en baño de agua a 37 °C durante 60 min, hasta obtener esferoplastos.

Posteriormente, los esferoplastos se centrifugaron a 8000 r.p.m por 10 min y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM (pH 7,4); se adicionaron 50 μ l de SDS (10%) y se incubó en baño de agua a 65 °C por 30 min. Inmediatamente, se adicionaron 200 μ L de acetato de potasio 5M (pH 4,8) y

se incubó durante 30 minutos a 4°C (baño de hielo), al cabo de los cuales se centrifugó a 14000 r.p.m por 5 minutos.

Cuidadosamente el sobrenadante se transfirió a un vial estéril y se centrifugó durante 5 minutos y transferido a otro tubo. Se adicionó 1 ml de isopropanol (conservado a -20 °C) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos agitando suavemente el vial. Se centrifugó a 14000 r.p.m por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 0,5 ml de etanol 70% (conservado a -20 °C) y se centrifugó 14000 r.p.m durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se sometió a secado a temperatura ambiente.

Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-EDTA pH 7,4), y se sometió a incubación durante 5 minutos en baño de agua a 100° C y el enfriamiento se realizó a temperatura ambiente (Osorio-Cadavid, 2009, Kurtzman and Robnett, 1998).

4.4.2 Amplificación y digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN

Para amplificar la región comprendida entre el gen 5.8s del rADN y las regiones no codificantes, varios autores han reportado el uso de los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), quienes han demostrado que ésta fracción muestra un bajo polimorfismo intraespecífico, pero una alta variabilidad interespecífica, siendo ésta aún mayor cuando se acompaña de un análisis de restricción (Esteve-Zarzoso et al., 1999, Caggia et al., 2001, Trost et al., 2004).

El protocolo para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN, se encuentran en las Tabla 4 y 5.

Tabla 4. Preparación de la mezcla para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN

Componente	Concentración Rx
Primer ITS1	1 μ M
Primer ITS4	1 μ M
dNTPs	0,2mM
Buffer PCR	1X
Buffer MgCl ₂	1,5mM
Taq Polimerasa	0.5 U
ADN	100ng

Tabla 5. Condiciones de la PCR para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2

	Tiempo	Temperatura	ciclos
Denaturación inicial	5 minutos	95°C	1X
Denaturalización	60 segundos	94°C	35X
Anillaje	2 minutos	55.5°C	35X
Extensión	2 minutos	72°C	
Extensión final	10 minutos	72°C	

(Esteve-Zarzoso et al., 1999)

Posteriormente los productos de la PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *Cfo* I y *Hae* III, con una incubación a 37°C, durante 3 h oras, al cabo de las cuales se detuvo la reacción mediante la inactivación de la enzima a 80°C durante 20 minutos. Las condiciones de la reacción se encuentran en la

Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de la reacción con enzimas de restricción

Componente		Concentración	Volumen (μl)
<i>Cfo I</i> / <i>Hha I</i>	<i>Hae III</i> / <i>BsuRI</i>	10u/μl	1
Buffer B / Buffer Tango	Buffer C / Buffer R		2
Albumina de suero bovino		10X	2
Agua HPLC			5
Producto PCR			10
Total			20

4.4.3 Caracterización molecular mediante PCR – fingerprinting usando microsatélites

La técnica PCR-fingerprinting, con el marcador microsatélite (GTG₅), ha sido reportada para la discriminación a nivel intraespecífico de cepas pertenecientes al complejo *Saccharomyces sensu stricto* (Silva-Filho et al., 2005, Nova et al., 2009). Las condiciones de amplificación se citan en las Tabla 7 y 8.

Tabla 7. Preparación de la mezcla para la PCR - *Fingerprinting*

Componente	Concentración
Primer (GTG) ₅ F	0,28μM
dNTPs	0,2mM
Buffer PCR	1X
Buffer MgCl ₂	3mM
Taq Polimerasa	
ADN	100ng

Tabla 8. Condiciones de la PCR-fingerprinting

Segmento	Proceso	Temp. (°C)	Tiempo
1	Denaturación inicial	94,0	5 min
2 (x40)	Denaturación	94,0	15 seg
3 (x40)	Anillaje	45,0	45 seg
4 (x40)	Extensión	72,0	90 seg
5	Extensión Final	72,0	5 min
6	Conservación	6,0	-

Los productos de la reacción, se visualizaron en un gel de agarosa (1.3% p/v), teñido con SyBR Green™.

4.5 EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE VINAZA

4.5.1 Evaluación preliminar de la capacidad de producción de etanol de cepas nativas

A partir de los aislamientos obtenidos, se realizó la evaluación de la capacidad de producción de etanol mediante fermentaciones discontinuas, a partir de un medio de cultivo con base en miel B y vinaza al 50%, como se describe a continuación.

A partir de un cultivo de 24 – 48 horas de cada una de las levaduras en agar YGC, se realizó el inóculo en 70 mL de medio de propagación. Esta suspensión se incubó durante 16 horas, transferida a 280 mL de medio de fermentación e incubada bajo las condiciones establecidas. Las características del sustrato y las condiciones para propagación y fermentación, se citan en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de propagación y fermentación

	PROPAGACIÓN	FERMENTACIÓN
A.R.T	6 % (p/v)	12 % (p/v)
pH	4.5	4.5
F.A.N	300 p.p.m	300 p.p.m
Agitación	150 r.p.m	100 r.p.m
Tiempo	16 horas	24 horas

Al cabo de las 24 horas, se realizaron los análisis químicos (A.R.T y Etanol) y microbiológicos (conteo de levaduras) .

4.5.2 Evaluación del efecto de la vinaza sobre la producción de etanol

El efecto de la vinaza en la producción de etanol de las tres levaduras que presentaron mejores resultados en la etapa descrita anteriormente (LCC 4-3, LCC 14-1 y LCC 14-4) y otras tres cepas obtenidas de estudios paralelos al presente (LCC 0-1, LCC 0-5 LCC 0-10) y seleccionadas por su capacidad de producción de etanol, se evaluó mediante fermentaciones tipo batch a escala de laboratorio siguiendo un diseño factorial con un arreglo en bloques completamente al azar, con dos factores, tres repeticiones.

Factor 1 Concentración de vinaza

Niveles: Concentración de vinaza 0% v/v

Concentración de vinaza 50% v/v

Concentración de vinaza 60% v/v

Factor 2 Levaduras

Niveles: LCC 4-3

LCC 14-1

LCC 14-4

LCC 0-1

LCC 0-5

LCC 0-10

Tabla 10. Diseño experimental

REPETICIÓN	LEVADURA	CONCENTRACIÓN DE VINAZA
1	1	0%
		50%
		60%
	2	0%
		50%
		60%
	N	0%
		50%
		60%

En todo el estudio se utilizó vinaza proveniente del mismo lote de producción. Para cada una de las repeticiones se utilizó miel proveniente de tres plantas de producción de azúcar diferentes.

El modelo lineal utilizado para realizar el análisis de varianza fue el siguiente:

$$Y = \mu + Lev + Tto + Lev * Tto + Error$$

Variables de respuesta Y:

- Concentración de etanol %
- Consumo de A.R.T %
- Eficiencia %

Se utilizó el procedimiento Promixed del programa S.A.S (Statistical Analysis System versión 11.0). mediante el cual se compararon los promedios obtenidos con el fin de determinar cuál de las levaduras presentó un mejor desempeño, el

cual fue cuantificado en términos de concentración de etanol y rendimiento con base en la conversión de los A.R.T a etanol

La metodología de evaluación, se describe a continuación:

Con base en cada tratamiento se adicionó el volumen de vinaza requerido (50% para el tratamiento 2 y 60% para el tratamiento 3). Las condiciones del sustrato para propagación y fermentación, se citan en la Tabla 11

El inóculo de cada fermentación, se realizó a partir de cultivos de 24 – 48 horas, en 70 mL de medio de propagación. Al cabo de 16 horas de incubación, éste inóculo fue transferido a 280 mL de medio de fermentación e incubado bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 11, al finalizar el tiempo de fermentación se realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

Tabla 11. Condiciones de propagación y fermentación

	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES
PROPAGACIÓN	A.R.T: 6% F.A.N: ~ 300 p.p.m pH: 4.5	V.E.T: 2000 mL Temperatura: 30°C Agitación: 150 r.p.m Tiempo: 16 horas
FERMENTACIÓN	A.R.T: ~ 12% p/v F.A.N: 300 ppm pH: 4.5 Vinaza TTO 1: 0% v/v TTO 2: 50% v/v TTO 3: 60% v/v	V.E.T: 10000 mL Temperatura: 30°C Agitación: 100 r.p.m O.D: <0.1% pH: 4.5 Control con NaOH 1% Tiempo: 24 horas

4.5.3 Evaluación a escala de reactor de la producción de etanol en presencia de vinaza

La evaluación del comportamiento en fermentación de las seis levaduras nativas seleccionadas, se realizó en el equipo bioreactor y fermentador BIOFLO® 100 de la casa comercial New Brunswick Scientific™, adquirido para la realización de éste proyecto. En este ensayo se incluyó la evaluación de la levadura comercial utilizada actualmente a nivel industrial.

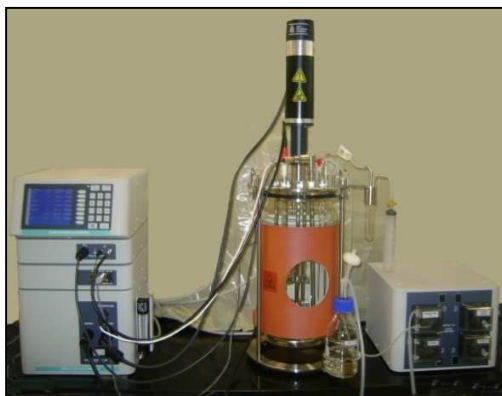


Figura 4. Bioreactor BIOFLO 110

Para la evaluación de cada una de las cepas de levadura, se utilizaron los medios que se citan a continuación:

Un volumen de 2000 ml de medio de propagación estéril fue la base para obtener el inóculo, a partir de un cultivo de la levadura en medio agar YGC®. Posteriormente este inóculo se transfirió a un volumen de 8000 mL del medio de fermentación estéril, sometiendo esta nueva mezcla al proceso de fermentación. Para el seguimiento del crecimiento de la levadura en esta etapa se tomaron muestras individuales de 100 mL cada dos horas, durante las primeras 12 horas, y a la hora 24, con el objeto de efectuar los análisis fisicoquímicos (A.R.T y

etanol). Las condiciones de fermentación y propagación se encuentran en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de evaluación de la producción de etanol de levaduras nativas

	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES
PROPAGACIÓN	A.R.T: 6% F.A.N: ~ 300 p.p.m pH: 4.5	V.E.T: 2000 mL Temperatura: 30°C Agitación: 150 r.p.m Tiempo: 16 horas
FERMENTACIÓN	A.R.T: ~ 12% p/v F.A.N: 300 ppm pH: 4.5 Vinaza: 50% v/v	V.E.T: 10000 mL Temperatura: 30°C Agitación: 100 r.p.m O.D: <0.1% pH: 4.5 Control con NaOH 1% Tiempo: 24 horas

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS

5.1 CONFORMACIÓN BANCO DE TRABAJO

Los resultados de las fermentaciones producto del enriquecimiento selectivo realizado a cada una de las 11 muestras, se resumen en la Tabla 13, donde se exponen la población total obtenida, el etanol producido y el número de aislamientos obtenidos de cada una de las muestras.

Los aislamientos predominantes correspondieron a morfologías diferentes de colonias. La primera correspondió a colonias redondas, bordes regulares, de aspecto cremoso. Los demás aislamientos correspondieron a otras morfologías, entre las que se destacaron colonias color crema, con superficies y bordes irregulares, texturas rugosas y en algunas se aprecia la formación de pseudohifas después de 48 horas de incubación. Sin embargo para la selección de los microorganismos, se prefirió la primer morfología descrita, dada la similaridad con la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 13. Recuentos de las fermentaciones realizadas con las diferentes muestras

Muestra	Levadura totales (UFC/mL)	Aislamientos	Etanol % (p/v)
Suelo 1	37×10^6	2	3.5
Suelo 2	65×10^6	1	2.8
Suelo 3	12×10^7	3	3.7
Suelo 4	91×10^6	2	2.8
Suelo 5	57×10^6	1	3.3
Uva estrujada	37×10^7	3	4.1
Mosto vino	85×10^8	3	4.7
Agua miel de café	27×10^4	2	1.2

Sorgo dulce	78 x 10 ⁴	6	3.7
Champús	13 x 10 ⁵	2	n.d
Azúcar	12 x 10 ¹	1	n.d

Se obtuvieron 27 aislamientos provenientes de las diferentes muestras analizadas; no obstante, dada la similitud entre estos, se redujo este número a un total de 16 aislamientos, denominados así:

LCC 3-1	LCC 4-1	LCC 4-2	LCC 4-3	LCC 14-1	LCC 14-4
LCC 14-5	LCC 14-6	LCC 15-1	LCC 15-2	LCC 15-3	LCC 15-4
LCC 15-5	LCC 15-6	LCC 16-1	LCC 16-2		

La anterior nomenclatura se diseña teniendo en cuenta los requerimientos de manejo de la información experimental originada en Cenicaña (LCC Levaduras Cenicaña Colombia).

5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS AISLADAS

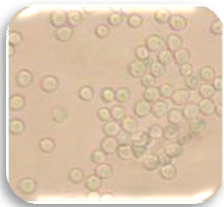
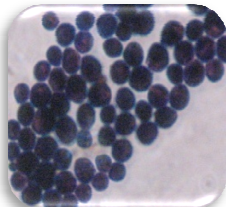
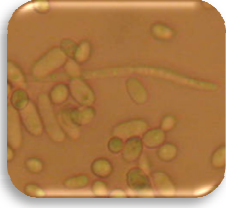
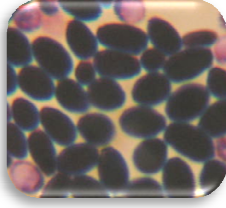
Todo proceso de selección de levaduras para una futura aplicación biotecnológica, debe iniciar con una identificación convencional de acuerdo con criterios taxonómicos reportados, comenzando con la descripción de la morfología celular, modo vegetativo de reproducción, caracterización fisiológica, bioquímica y metabólica (Demain et al., 1998).

5.2.1 Caracterización morfológica de las cepas de nativas

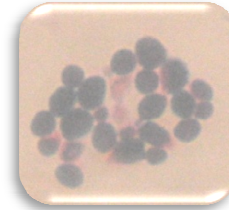
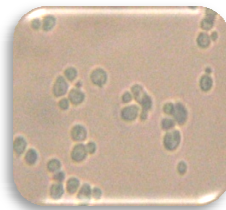
Los criterios básicos para caracterización morfológica, residen en la descripción de la apariencia de las colonias, cuando su crecimiento se realizó sobre un medio de cultivo nutritivo. Esta descripción hace referencia a la forma de la colonia, color, bordes, superficie y textura.

Microscópicamente, la descripción radica en la forma de las células, su forma de reproducción y la capacidad de producir filamentos. En la Tabla 14, se encuentran la descripción macroscópica y microscópica de las levaduras aisladas.

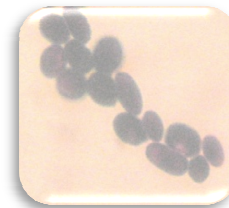
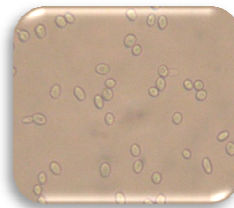
Tabla 14. Caracterización morfológica

LEVADURA	FOTOGRAFIA COLONIA	FOTOGRAFIA MICROSCOPIO	COLORACIÓN DE GRAM
LCC 3-1			
LCC 4-1			

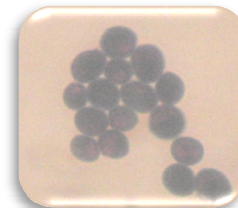
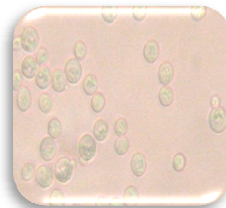
LCC 4-2



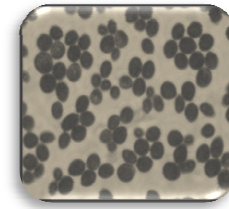
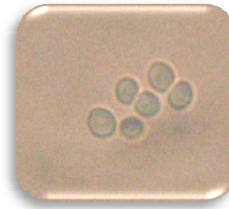
LCC 4-3



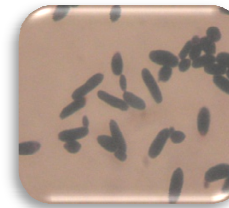
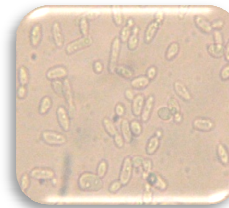
LCC 14-1



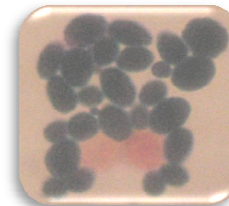
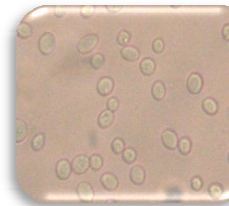
LCC 14-4



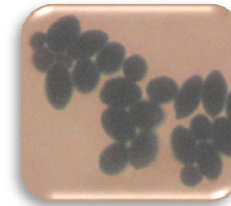
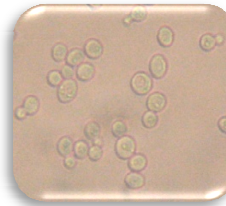
LCC 14-5



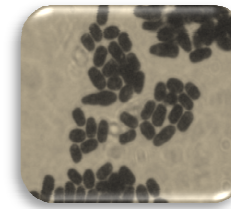
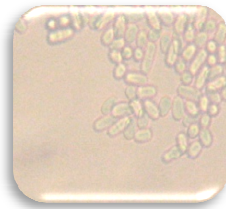
LCC 14-6



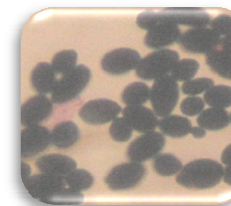
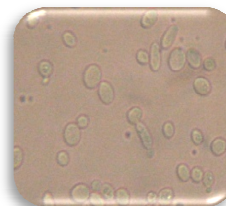
LCC 15-1



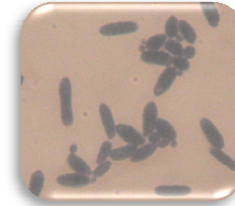
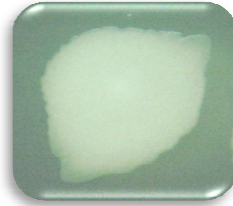
LCC 15-2



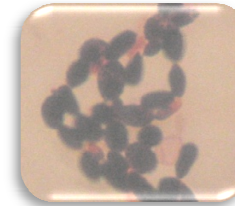
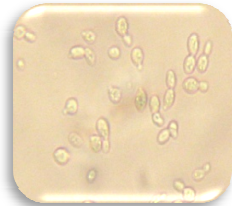
LCC 15-3



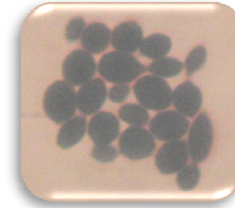
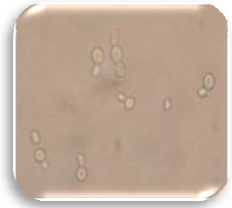
LCC 15-4



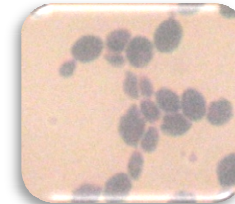
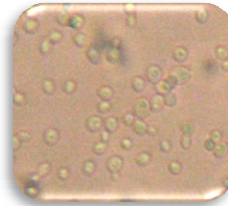
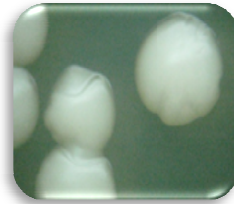
LCC 15-5



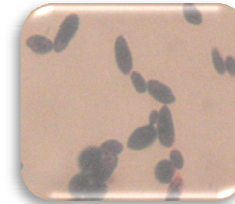
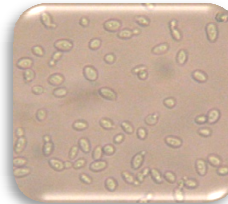
LCC 15-6



LCC 16-1



LCC 16-2



5.2.2 Caracterización Bioquímica de las cepas de levaduras nativas

Los perfiles bioquímicos de las levaduras nativas aisladas, utilizando el kit API 20CAUX™, se encuentran en la Tabla 15, mientras que los resultados arrojados por el software API WEB se encuentran en la Tabla 16.

Tabla 15. Perfiles bioquímicos obtenidos utilizando el Kit API 20CAUX

LEVADURA	0	GLU	GLY2K	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
LCC 3-1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
LCC 4-1	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LCC 4-2	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LCC 4-3	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LCC 14-1	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LCC 14-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LCC 14-4	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
LCC 14-5	-	+	-	+		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LCC 14-6	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LCC 15-1	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LCC 15-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
LCC 15-3	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
LCC 15-4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCC 15-6	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 16. Resultados de la identificación bioquímica del Kit API 20CAUX

Aislamiento	Identificación API 20CAUX	% de ID
LCC 3-1	<i>Candida colliculosa</i>	76%
LCC 4-1	<i>Candida tropicalis</i>	99%
LCC 4-2	<i>Candida sphaerica</i>	99%
LCC 4-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98%
LCC 14-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%
LCC 14-3	<i>Candida inconspicua</i>	99%
LCC 14-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%
LCC 14-5	<i>Candida tropicalis</i>	95%
LCC 14-6	<i>Candida tropicalis</i>	95%
LCC 15-1	<i>Candida tropicalis</i>	95%
LCC 15-2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	63%
LCC 15-3	<i>Candida tropicalis</i>	95%
LCC 15-5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	63%
LCC 15-6	<i>Cryptococcus laurentii</i>	97%
LCC 16-1	<i>Candida lusitaneae</i>	94%
LCC 16-2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	97%

Con el fin de validar la metodología establecida, respecto a la caracterización bioquímica y basados en los resultados obtenidos mediante el Kit de identificación API 20CAUX, se enviaron varios aislamientos del banco de levaduras conformado en Cenicaña, a un Laboratorio externo, que presta el servicio de identificación de levaduras, mediante un método referenciado llamado Rapid Yeast ID®, el cual cuenta con una base de datos conformada por 51 especies de levaduras diferentes.

Los datos de la comparación de los resultados obtenidos en Cenicaña con el Kit API y el método Rapid yeast ID se encuentran registrados en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos por dos métodos de identificación de levaduras

Levadura	API		MICROSCAN	
	IDENTIFICACIÓN	%	IDENTIFICACION	%
Ref 1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,59
Ref 2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,86
LCC 4-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,73
LCC 2-31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99,86
LCC 2-9	<i>Pichia angusta</i>	99,9	~ <i>Candida krusei</i>	50
CM 58	<i>Candida famata</i>	95,7	<i>Candida tropicalis</i>	99,9
CM 64	<i>Candida tropicalis</i>	56,4	<i>Candida tropicalis</i>	99,9

En la Tabla 18, se encuentra el perfil bioquímico de las levaduras analizadas mediante el método Rapid Yeast ID.

Tabla 18. Perfil bioquímico registrado por el método Rapid Yeast ID

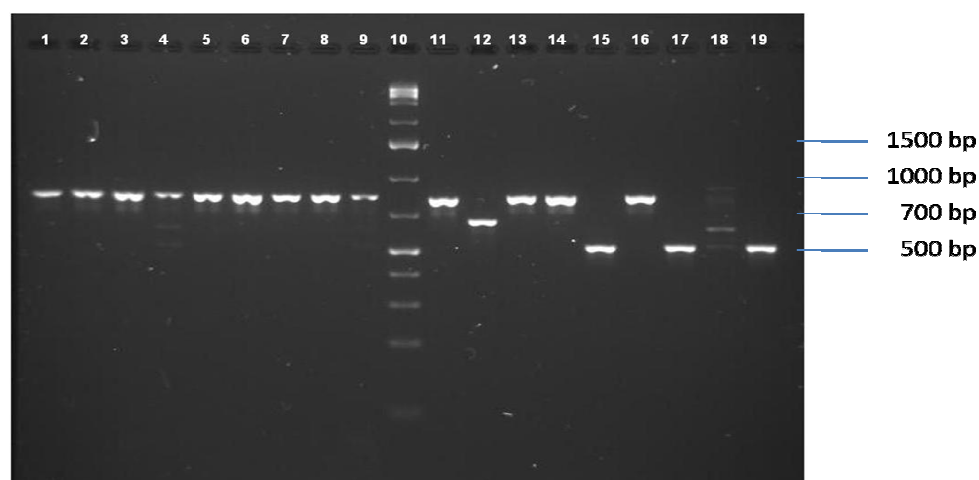
Levadura	HPR	TYR	GLAR	LYAL	URE	SUC1	AGL1	AGL2	NAG	ILE	GLY	GLPR	ALA
Referencia 1	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Referencia 2	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
LCC 4-2	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
LCC 2-31	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
LCC 2-9	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
CM 58	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
CM 64	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Levadura	IDX	SUC2	BGL	BDF	CELL	PRO	GGLY	AARG	STY	HIS	TRE	BGAL	AGAL	NGAL
Referencia 1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
Referencia 2	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
LCC 4-2	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
LCC 2-31	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
LCC 2-9	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CM 58	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
CM 64	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS NATIVAS

5.3.1 Amplificación y digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN

La amplificación de la región ITS 5.8s, se realizó en las cepas que morfológica y bioquímicamente presentaron mayor similitud con la cepa comercial y adicionalmente se incluyeron otras cepas aisladas en trabajo paralelos correspondientes a *S. cerevisiae* (Figura 5).



1. COMERCIAL; 2. LCC 0-1; 3. LCC 0-2; 4. LCC 0-5; 5. LCC 0-6; 6. LCC 0-10; 7. LCC 2-19; 8. LCC 2-26; 9. LCC 2-31; 10. Marcador de peso 1Kb; 11. LCC 3-1; 12. LCC 4-2; 13. LCC 4-3; 14. LCC 14-1; 15. LCC 14-5; 16. LCC 14-4; 17. LCC 15-1; 18. LCC 15-2; 19. LCC 15-3

Figura 5. Amplificación de la Región ITS y del gen 5.8s rADN de levaduras nativas

Al comparar los productos de la amplificación de la región 5.8s e ITS del rARN, con los resultados obtenidos a partir de bioquímicas obtenidas mediante el Kit API 20CAUX, se puede observar que los patrones similares entre sí, corresponden a aquellas cepas cuya identificación bioquímica correspondió al mismo género y especie.

Tabla 19. Comparación entre el producto de PCR de la región 5.8s-ITS rADN y la identificación bioquímica mediante API 20CAUX de levaduras nativas

CEPA	PRODUCTO PCR (pb)	IDENTIFICACIÓN API
LCC 0-1	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 0-2	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 0-5	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 0-6	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 0-10	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 2-19	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 2-31	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 3-1	~850	<i>C. colliculosa</i>
LCC 4-2	600	<i>C. sphaerica</i>
LCC 4-3	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 14-1	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 14-4	~850	<i>S. cerevisiae</i>
LCC 14-5	500	<i>C. tropicalis</i>
LCC 15-1	500	<i>C. tropicalis</i>
LCC 15-2	550	<i>R. glutinis</i>
LCC 15-3	500	<i>C. tropicalis</i>

Todas las cepas identificadas como *S. cerevisiae*, presentaron un tamaño de la región 5.8s – ITS alrededor de 850 pb, mientras que las especies del género *Candida* spp., presentaron tamaños de banda que van desde los 500 hasta 800 pb. Estos valores han sido reportados por estudios similares (Tabla 19) (Carvalho et al., 2005, Esteve-Zarzoso et al., 1999, Osorio-Cadavid et al., 2008).

Los polimorfismos obtenidos con el análisis de restricción utilizando la enzima *Cfo I*, reflejaron nuevamente que las cepas identificadas como *S. cerevisiae*, mostraron tres bandas de tamaños 360, 340 y 180 pb. Estos valores están relacionados con los obtenidos por varios autores (Figura 6) (Esteve-Zarzoso et al., 1999, Osorio-Cadavid et al., 2008).

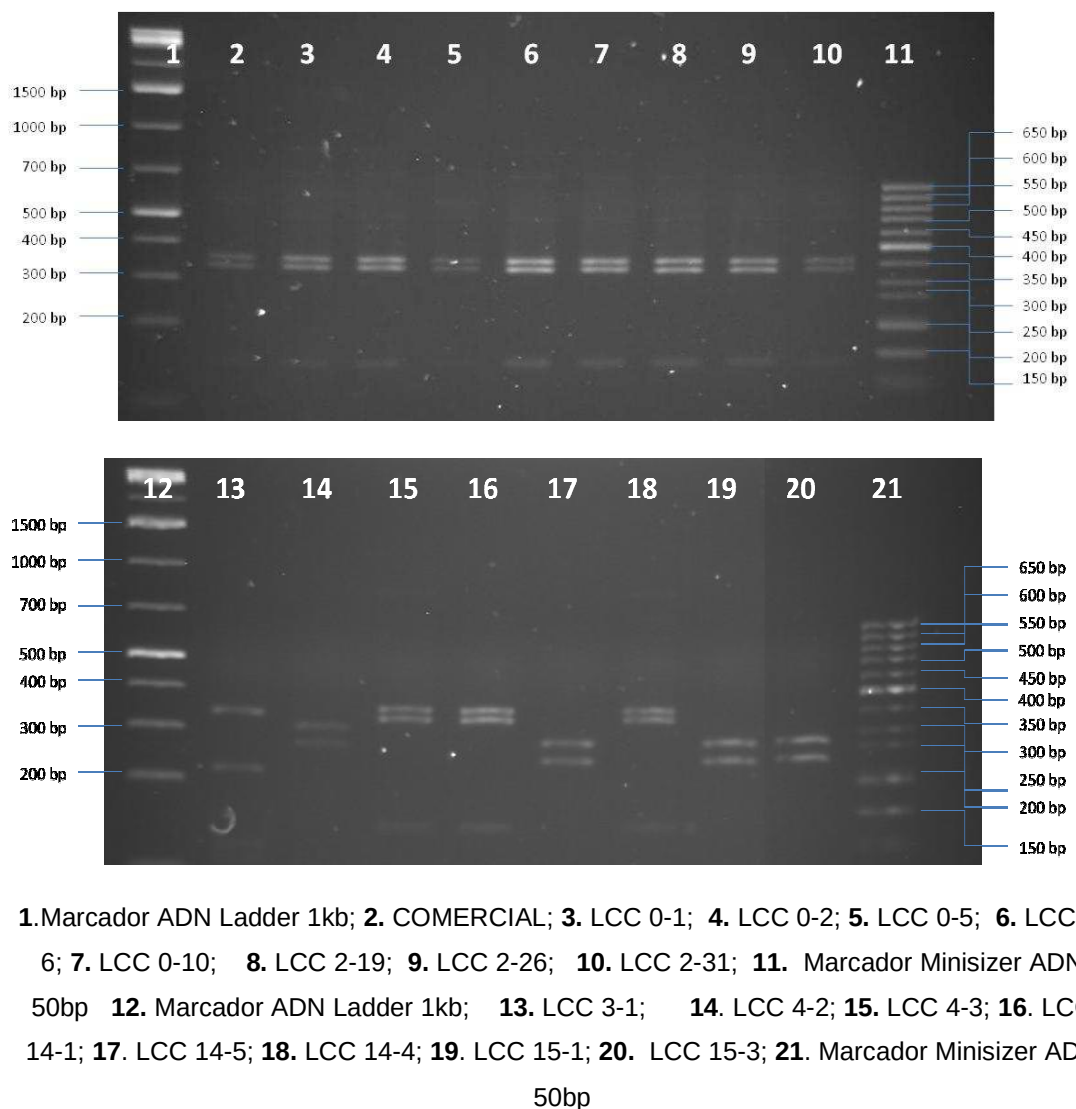


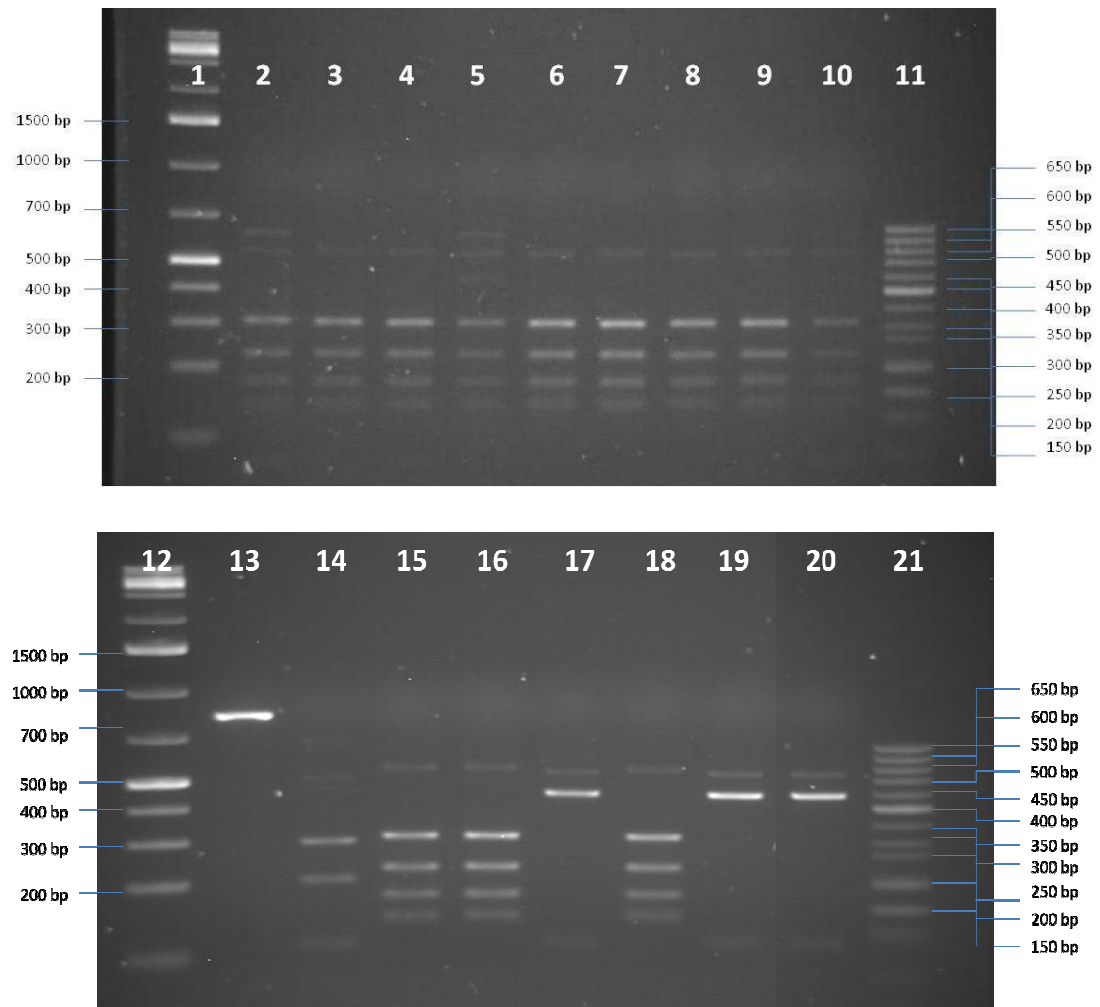
Figura 6. Digestión con la enzima *Cfo I* de los fragmentos amplificados la región 5.8s ITS de las levaduras nativas

Las diferentes especies presuntivamente identificadas en el género *Candida* spp., presentaron diferentes patrones de restricción (Tabla 20). En el caso de las tres cepas identificadas bioquímicamente como *C. tropicalis*, presentaron los mismos patrones de restricción generados por la enzima *Cfo I*.

Tabla 20. Longitud de los fragmentos de restricción generados por la enzima *Cfo I*

CEPA	IDENTIFICACIÓN API	LONGITUD FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN <i>Cfo I</i>
LCC 0-1	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 0-2	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 0-5	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 0-6	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 0-10	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 2-19	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 2-31	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 3-1	<i>C. colliculosa</i>	350 + 250
LCC 4-2	<i>C. sphaerica</i>	350 + 300
LCC 4-3	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 14-1	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 14-4	<i>S. cerevisiae</i>	360 + 340+ 180
LCC 14-5	<i>C. tropicalis</i>	260 + 240
LCC 15-1	<i>C. tropicalis</i>	260 + 240
LCC 15-3	<i>C. tropicalis</i>	260 + 240

En la Figura 7, se encuentran los patrones generados por la restricción de la enzima *Hae* III, sobre la región 5.8s – ITS.



1. Marcador ADN Ladder 1kb; 2. COMERCIAL; 3. LCC 0-1; 4. LCC 0-2; 5. LCC 0-5; 6. LCC 0-6; 7. LCC 0-10; 8. LCC 2-19; 9. LCC 2-26; 10. LCC 2-31; 11. Marcador Minisizer ADN 50bp 12. Marcador ADN Ladder 1kb; 13. LCC 3-1; 14. LCC 4-2; 15. LCC 4-3; 16. LCC 14-1; 17. LCC 14-5; 18. LCC 14-4; 19. LCC 15-1; 20. LCC 15-3; 21. Marcador Minisizer ADN 50bp

Figura 7. Digestión con la enzima *Hae* III de los fragmentos amplificados la región 5.8s ITS de las levaduras nativas

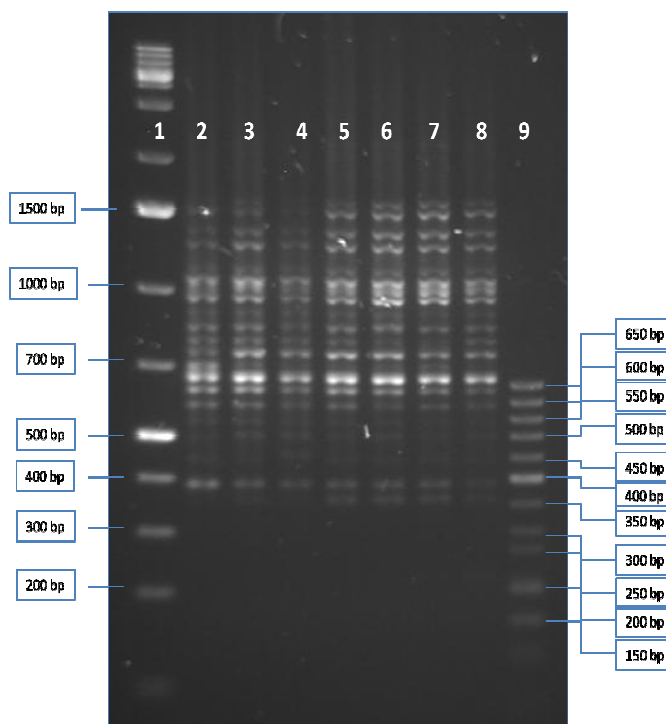
Tabla 21. Longitud de los fragmentos de restricción generados por la enzima *Hae III* de las levaduras nativas

CEPA	IDENTIFICACIÓN API	LONGITUD FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN <i>Hae II</i>
LCC 0-1	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 0-2	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 0-5	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 0-6	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 0-10	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 2-19	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 2-31	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 3-1	<i>C. colliculosa</i>	800
LCC 4-2	<i>C. sphaerica</i>	300 + 200 + 80
LCC 4-3	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 14-1	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 14-4	<i>S. cerevisiae</i>	330 + 320 + 180 + 140
LCC 14-5	<i>C. tropicalis</i>	450 + 90
LCC 15-1	<i>C. tropicalis</i>	450 + 90
LCC 15-3	<i>C. tropicalis</i>	450 + 90

5.3.2 Caracterización molecular mediante PCR – fingerprinting usando microsatélites

El análisis PCR – *Fingerprinting* usando el marcador microsatélite (GTG)₅, generó un patrón de bandas para todas las cepas *S. cerevisiae*, los cuales abarcaron desde 1500 hasta 350 pb (Figura 8).

Figura 8. Análisis *Fingerprinting* de las levaduras nativas utilizando microsatelites con el iniciador (GTG)₅



1. Marcador ADN Ladder 1kb 2. COMERCIAL; 3. LCC 0-1; 4. LCC 0-5; 5. LCC 0-10;
6. LCC 4-3; 7. LCC 14-1; 8. LCC 14-4; 9. Marcador Minisizer ADN 50bp

5.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE VINAZA

5.4.1 Evaluación preliminar de la producción de etanol

La producción de etanol, el consumo de A.R.T (Azúcares reductores totales) y la eficiencia de fermentación de las levaduras nativas aisladas se muestran en la Tabla 22. Como se puede observar, de las 10 cepas evaluadas únicamente cinco consumieron más del 60% de los azúcares presentes en el medio y de éste grupo, sólo tres convirtieron estos azúcares a etanol con una eficiencia igual o superior al 80%.

Tabla 22. Producción de etanol de las levaduras nativas aisladas

Levadura	Etanol teórico	Consumo de ART %	EtOH p/v Producido	Rendimiento Yp/s	Eficiencia %
LCC 3-1	8,08	85	3,157	0,236	39,06
LCC 4-2	7,18	65	4,920	0,538	68,58
LCC 4-3	7,72	79	6,241	0,526	80,82
LCC 14-1	7,95	100	6,858	0,441	86,26
LCC 14-4	8,04	82	6,377	0,492	79,30
LCC 14-5	7,60	20	2,006	0,676	26,41
LCC 15-2	8,99	41	2,246	0,310	24,99
LCC 15-3	8,32	26	2,120	0,502	25,47
LCC 16-1	8,65	27	1,795	0,397	20,76
LCC 16-2	8,72	23	1,865	0,481	21,39

El bajo consumo de azúcares de las cepas evaluadas, radica primeramente en su bajo poder de inversión de la sacarosa, siendo las cepas LCC 3-1, LCC 4-2, LCC 4-3, LCC 14-1 y LCC 14-4, las únicas cepas capaces de invertir más del 88% de la sacarosa presente en el medio, en 24 horas (Tabla 23).

Tabla 23. Consumo de sacarosa de las cepas de levaduras nativas

Levadura	Sacarosa inicial	Sacarosa final
LCC 3-1	8.99	0.16
LCC 4-2	9.34	1.12
LCC 4-3	5.32	0.14
LCC 14-1	9.46	0
LCC 14-4	9.42	0.97
LCC 14-5	11.12	10.53
LCC 15-2	11.49	3.26
LCC 15-3	11.57	11.27
LCC 16-1	11.86	11.63
LCC 16-2	11.62	11.33

5.4.2 Evaluación a escala erlenmeyer del efecto de la vinaza sobre la producción de etanol

Las tres cepas seleccionadas (LCC 4-3, LCC 14-1 y LCC 14-4) y tres cepas provenientes de investigaciones paralelas a ésta estudio (LCC 0-1, LCC 0-5 y LCC 0-10), fueron evaluadas en presencia de diferentes concentraciones de vinaza, y el efecto se puede observar en la Figura 9. La producción de etanol se ve disminuida en presencia de vinaza para todas las levaduras evaluadas, a excepción de la cepa LCC 4-3 en la cual no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la producción de etanol con y sin vinaza en el medio (Tabla 24).

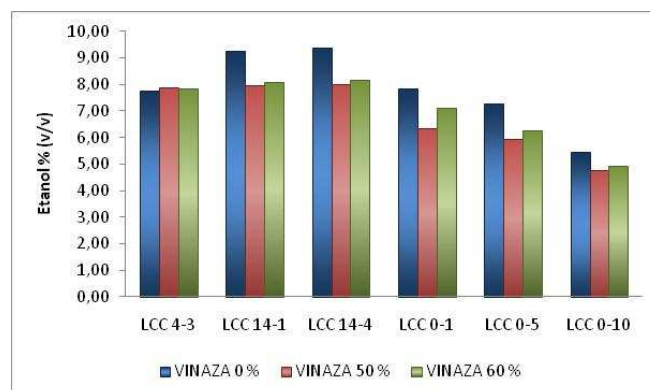


Figura 9. Producción de etanol de las levaduras nativas con diferentes concentraciones de vinaza

La presencia de vinaza en el medio, no obstante un aumento de un 50 a un 60% en la concentración de vinaza, no ejerce una disminución significativa en la producción de etanol (Tabla 24).

Tabla 24. Producción de etanol % (v/v) de las levaduras nativas en los tratamiento evaluados

Tratamiento	LCC 4-3	LCC 14-1	LCC 14-4	LCC 0-1	LCC 0-5	LCC 0-10
1	7,76 ^A	9,27 ^A	9,37 ^A	7,84 ^{AB}	7,27 ^B	5,44 ^C
2	7,87 ^{AB}	7,99 ^{AB}	8,01 ^{AB}	6,36 ^B	5,93 ^B	4,76 ^C
3	7,84 ^{AB}	8,08 ^{AB}	8,16 ^{AB}	7,12 ^B	6,26 ^B	4,92 ^C

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas (Test de Tukey $p \leq 0,1$)

Las levaduras LCC 14-1 y LCC 14-4, presentaron la mayor producción de etanol en los tres tratamientos; a pesar que su producción disminuyó en presencia de la vinaza, no fueron superadas en rendimiento por las otras cepas.

La presencia de vinaza, además de inhibir la producción de etanol, también inhibe el consumo de los azúcares, como se puede observar en la Figura 10. La cepa LCC 14-1 sobresale, por su alto consumo de azúcares alcanzando un consumo de 93% del total de los azúcares presentes en el medio, sin embargo en presencia de vinaza este consumo sólo alcanzó niveles de 78% máximo.

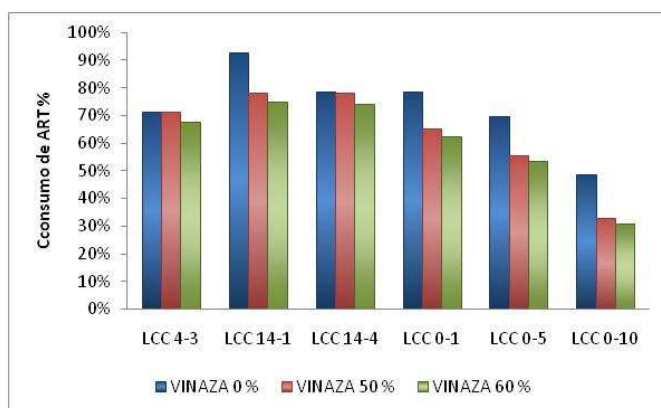


Figura 10. Consumo de ART de las levaduras nativas con diferentes concentraciones de vinaza

Tabla 25. Consumo de ART de las levaduras nativas en los tratamientos evaluados

Tratamiento	LCC 4-3	LCC 14-1	LCC 14-4	LCC 0-1	LCC 0-5	LCC 0-10
1	71% ^{BC}	93% ^A	79% ^A	79% ^B	70% ^{BC}	49% ^{DE}
2	71% ^{BC}	78% ^B	78% ^B	65% ^C	56% ^D	33% ^{EF}
3	68% ^C	75% ^{BC}	74% ^{BC}	63% ^{CD}	54% ^D	31% ^F

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas (Test de Tukey $p \leq 0,1$)

Consumos de A.R.T. superiores al 75%, corresponden a aquellas cepas que fueron capaces de invertir la sacarosa presente en el medio hasta alcanzar concentraciones de éste azúcar inferiores a 0.5%(p/v). Y en cuanto a la glucosa y la fructosa, concentraciones inferiores a 1% (p/v) (Figura 11-13).

Las cepas que presentaron estos niveles de consumo, fueron las cepas LCC 14-1 y LCC 14-4 en los tres tratamientos. La cepa LCC 0-1, presentó un consumo de A.R.T del 79% en el tratamiento con vinaza, sin embargo en la presencia de ésta su consumo disminuyó a valores inferiores a 56% (Figura 10).

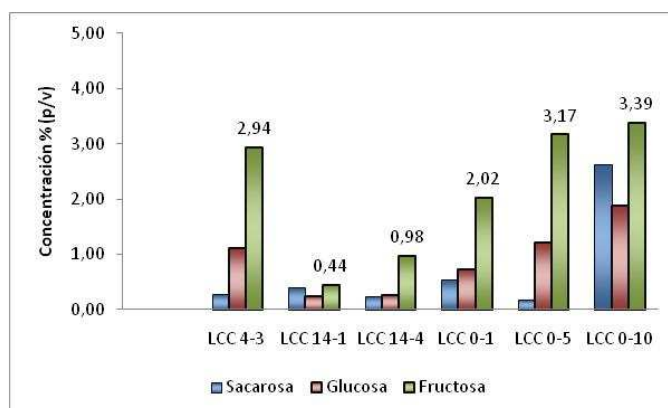


Figura 11. Sacarosa, glucosa y fructosa residual a las 24 horas (Tratamiento sin vinaza).

En las Figura 12, se puede observar que la presencia de vinaza, inhibe el consumo de los azúcares presentes en el medio por parte de las levaduras, conllevando a valores de azúcares residuales altos.

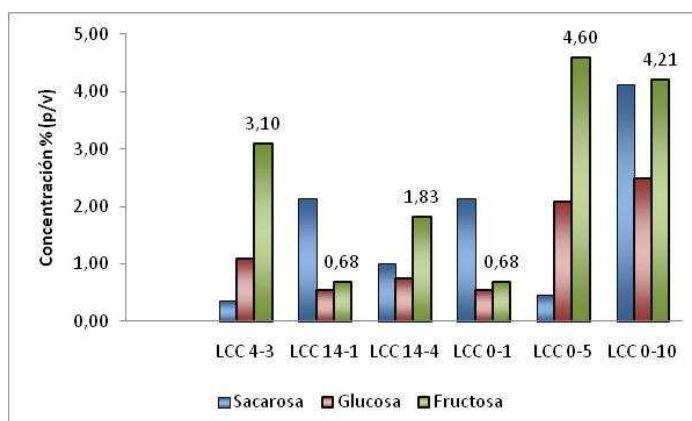


Figura 12. Sacarosa, glucosa y fructosa residual a las 24 horas. Concentración de vinaza 50% (v/v)

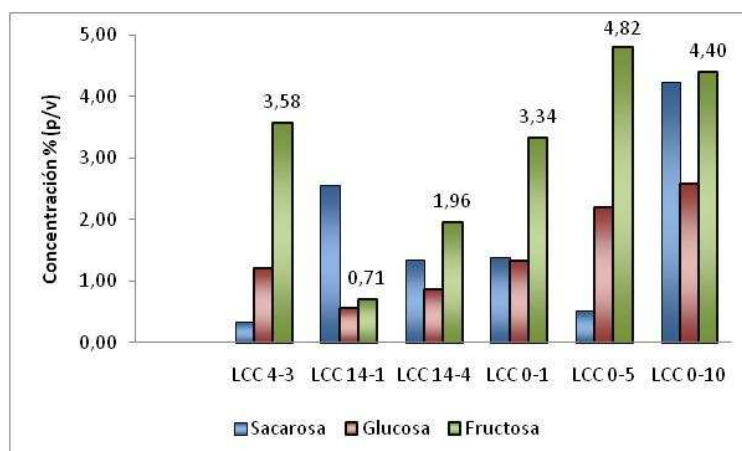


Figura 13. Sacarosa, glucosa y fructosa residual a las 24 horas. Concentración de vinaza 60% (v/v)

En términos de eficiencia, las cepas que presentaron un mayor aprovechamientos de los azúcares presentes en el medio fueron LCC 14-1, LCC 14-4 y LCC 0-1, sin embargo los valores disminuyeron significativamente cuando éstas cepas fueron expuestas a concentraciones de vinaza superiores al 50% (Figura 14).

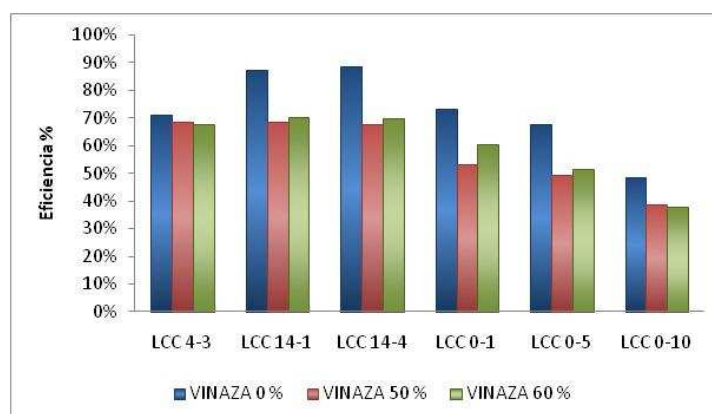


Figura 14. Eficiencia de la conversión de ART a etanol de las levaduras nativas con diferentes concentraciones de vinaza.

En términos generales, se puede observar que la presencia de vinaza, afecta el consumo de azúcares por parte de las levaduras, lo cual se traduce en disminución de la eficiencia de fermentación alcanzando niveles de disminución superiores al 20%. Para la mayoría de las cepas, no existen diferencias significativas en la eficiencia de fermentación al aumentar la presencia de vinaza de un 50% a un 60% en el medio de fermentación (Tabla 26).

Tabla 26. Eficiencia del proceso de fermentación de las levaduras nativas

Tratamiento	LCC 4-3	LCC 14-1	LCC 14-4	LCC 0-1	LCC 0-5	LCC 0-10
1	71% ^B	87% ^A	88% ^A	73% ^{AB}	68% ^B	48% ^{CD}
2	68% ^B	69% ^B	68% ^B	53% ^{BC}	49% ^{CD}	39% ^{CD}
3	68% ^B	70% ^B	70% ^B	60% ^{BC}	52% ^C	38% ^{CD}

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas (Test de Tukey $p \leq 0,1$)

5.4.3 Evaluación a escala de reactor de de la producción de etanol en presencia de vinaza

Las seis levaduras seleccionadas a escala erlenmeyer, se evaluaron a escala de reactor, utilizando como sustrato miel B y 50% (v/v) de vinaza. Como se puede observar en la Figura 15, las levaduras presentaron un comportamiento favorable en cuanto al grado alcohólico obtenido a las 24 horas de fermentación, alcanzando valores de 8.5% (v/v), cercanos a los obtenidos por la levadura comercial.

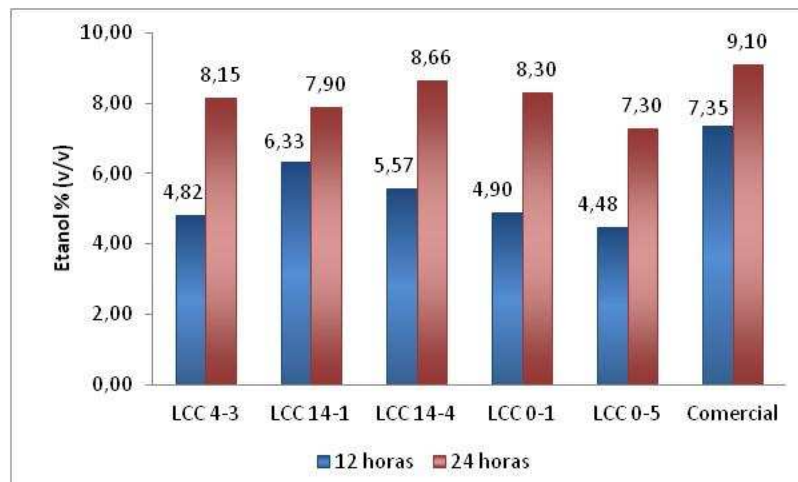


Figura 15. Producción de etanol de las levaduras nativas con 50% de vinaza

En términos de eficiencia de conversión de azúcares a etanol, la mayoría de las cepas nativas alcanzaron eficiencias de conversión superiores al 70%, sobresaliendo la cepa LCC 14-1, que alcanzó una eficiencia de 91%, muy cercana a la obtenida por la cepa comercial 93% (Figura 16).

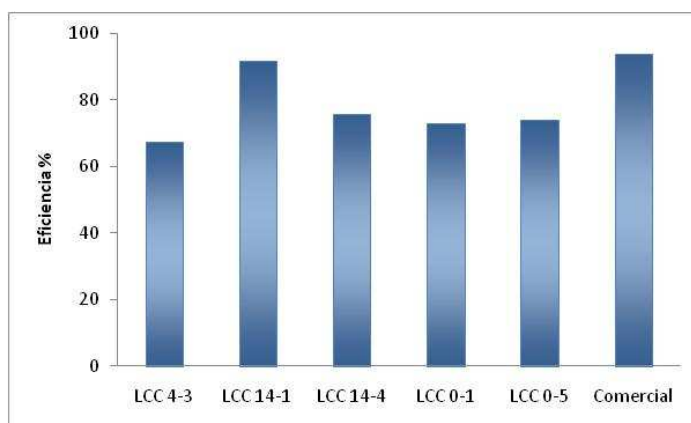


Figura 16. Eficiencia de fermentación de las levaduras nativas con 50% de vinaza

No obstante, se puede observar que la velocidad de producción de etanol de la levadura comercial es mayor dado el hecho que a las 12 horas , fue mayor comparado con el alcanzado por las levaduras nativas, lo cual verifica su potencial industrial, por permitir disminuir el tiempo de la producción (Figura 15).

Lo anterior se puede complementar con lo registrado en la Figura 17, donde se puede observar que la velocidad de consumo de la levadura comercial es notablemente mayor que en las levaduras nativas, alcanzando niveles de consumo de hasta 1.3% de A.R.T por hora (13 g/L/h) a la hora 8 de fermentación. Las levaduras LCC 4-3 y LCC 14-1, presentaron las mayores velocidades de consumo (1% de A.R.T por hora), a la hora 4 de fermentación.

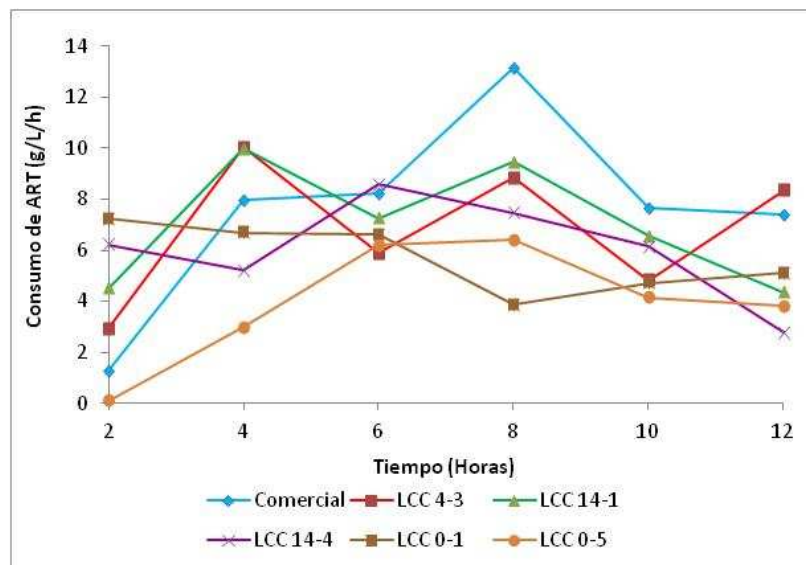


Figura 17. Velocidad de Consumo de ART de las levaduras nativas con una concentración de vinaza de 50% (v/v)

La velocidad de producción de etanol (g /l/h), fue mayor en la levadura comercial, alcanzando niveles de producción de etanol 0.5 % consumida por hora (5g/g/h), en las horas 4 y 8. La levadura LCC 14-1 presentó niveles de producción de etanol máximos de 0.4% por hora, en los mismos tiempos (Figura 18).

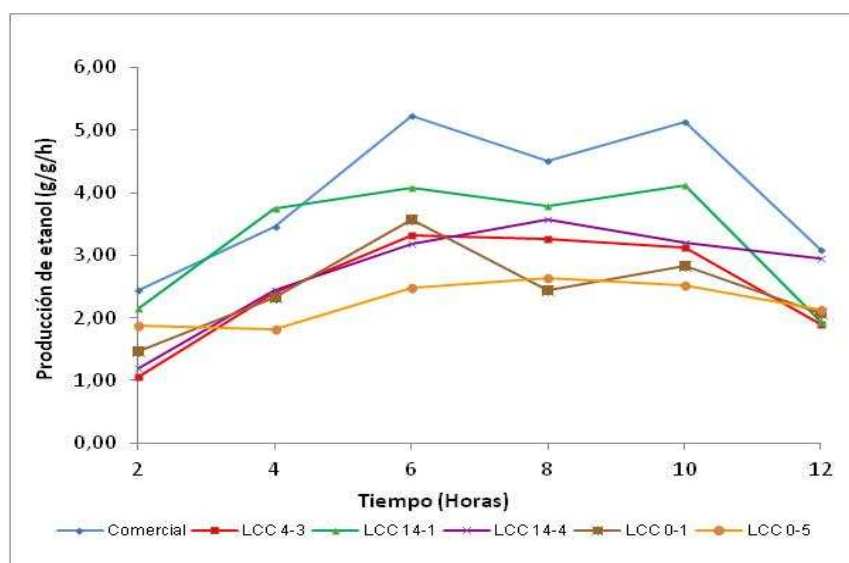


Figura 18. Velocidad de producción de de etanol (g/l/h) de las levaduras con recirculación de vinaza 50% (v/v)

Basados en la información mencionada anteriormente, se realizó un balance de materia con el fin de estimar la producción de vinaza generada en un proceso de fermentación tipo Batch, con un tiempo de residencia de 24 horas, asumiendo que las eficiencias de destilación, deshidratación, y rectificación equivalen al 100% y sin tener en cuenta la masa de sólidos presentes en la vinaza (Tabla 27). Se tuvo en cuenta la densidad del vino como 1,055 Kg/L, para una producción diaria de 10 Kg de vino y la densidad de la vinaza equivalente a 1.052 Kg/L.

Los resultados muestran que la levadura comercial, bajo estas condiciones tiene una generación de efluente menor a 3 litros de vinaza por cada litro de etanol

anhidro producido de acuerdo con los requerimientos expedidos en las licencias ambientales.

Tabla 27. Estimación de la generación de vinaza a partir de una fermentación tipo batch

Levadura	Etanol % (v/v)	Etanol (kg/día)	Vinaza (Kg/día)	Vinaza/Etanol (l/l)
LCC 4-3	8,15	1,91	8,64	3,39
LCC 14-1	7,90	1,85	8,70	3,53
LCC 14-4	8,66	2,03	8,52	3,15
LCC 0-1	8,02	1,88	8,67	3,46
LCC 0-5	7,58	1,78	8,77	3,71
Comercial	9,10	2,13	8,42	2,96

6. ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

6.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUIMICA DE LEVADURAS

Las levaduras, son organismos de amplia distribución en la naturaleza, por cuanto una misma especie puede ser ubicua en varios ambientes y su desempeño fisiológico depende de las condiciones del mismo. Basados en lo anterior, para el aislamiento de levaduras con potencial de producción de etanol, una etapa previa de enriquecimiento selectivo, utilizando como sustrato miel B y vinaza 50%, fue favorable puesto que permitió la recuperación únicamente de cepas de levaduras restringiendo una gran parte de la biota bacteriana contaminante. Se observó que además de las levaduras de interés de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se recuperaron levaduras de otras especies entre las que sobresale el género *Candida* spp. , algunas de las cuales pueden tener capacidad alcoholera, sin embargo como se discutirá posteriormente ésta no es significativa cuando se comparan con el género *Saccharomyces*.

La información referente al origen de las levaduras utilizadas a escala industrial, para producción de etanol carburante es limitada. Existen unos pocos reportes de la industria brasilera donde los autores señalan la utilización de cultivos de levaduras comerciales como iniciadores del proceso fermentativo y la presencia y posterior prevalencia de cepas nativas en las etapas tardías, lo cual ha sido la base de varios estudios que liderados en su mayor parte por el personal de Fermentec, cuyo objetivo es la selección de levaduras y su utilización a escala industrial (Basso et al., 2008).

Los mismos autores señalan, que como resultado de más de 12 años de investigación, han logrado seleccionar alrededor de 14 cepas las cuales han llevado a escala industrial, sin obtener resultados exitosos en todos los casos, dado el hecho que a pesar que una cepa exhiba buenas propiedades

fermentativas, no garantiza que su población prevalezca ante la presencia de cepas nativas (Basso et al., 2008).

En Colombia, las condiciones son un poco diferentes puesto que las plantas de producción han invertido grandes esfuerzos por reducir la presencia de microorganismos nativos acompañantes de la materia prima, por cuanto los episodios de prevalencia de levaduras nativas cada vez son menos frecuentes.

Además la presencia de vinaza, hace que el medio de fermentación no sea apto para una amplia gama de microorganismos y permite centrar interés en aquellos organismos que pueden desarrollarse bajo estas condiciones.

Por esta razón, la utilización de un medio de cultivo cuya selectividad fue aportada por la adición de vinaza y la alta concentración de A.R.T, permitió seleccionar de manera preliminar únicamente cepas de levaduras con alguna capacidad de producción de etanol, que posteriormente fueron evaluadas y seleccionadas según su desempeño.

En estos procesos de selección, la identificación bioquímica de las especies aisladas, juega un papel importante puesto que permite reducir el banco de trabajo a solo aquellas organismos cuya producción de etanol es reconocida, como lo es la especie *S. cerevisiae*. Para la identificación de esta especie, se ratificó que el kit API 20CAUX, es una alternativa rápida, accesible y de precisión cuando de esta especie se trata.

El mismo caso no se presenta cuando se trata de especies pertenecientes a otros géneros dada que las bases de datos que soportan a estas dos herramientas bioquímicas, están especializadas únicamente a especímenes comunes en muestras de origen clínico por cuanto su aplicación para identificación de especies de tipo ambiental puede ser limitada.

No obstante, basados en la identificación presuntiva realizada con el kit API, las levaduras aisladas pueden tener algún tipo de aplicación biotecnológica en

aspectos como son la biorremediación, el control biológico, biofertilizantes y como catalizadores biológicos, (Botha, 2011, Daniel and Prasad).

Las levaduras LCC4-1, 14-5, 14-6 y 15-3, identificadas como *C. tropicalis*, de acuerdo con su perfil bioquímico, tienen la capacidad de asimilar xilosa y celobiosa como fuente de carbono en condiciones aerobias, lo cual las hace atractivas desde el punto de vista biotecnológico por cuanto pueden tener aplicación para el aprovechamiento de fracciones lignocelulósicas e incluso se ha reportado su aplicación en la utilización de intermediarios producto de la degradación de la lignina como son ácidos ferúlico, gálico, protocatéquico y vanillínico (Botha, 2011).

En términos generales, los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Cryptococcus*, han sido reconocidos por su amplia participación en los procesos biogeoquímicos que dan lugar a la provisión de los nutrientes requeridos por las plantas. Por ejemplo, estos géneros tienen reconocimiento por su capacidad de nitrificar el ion amonio a nitrato, vía nitrito, e incluso el género *Rhodotorula* es capaz de oxidar también formas reducidas de azufre y producir tiosulfato, tetratiónato y sulfato; por otro lado también se ha reconocido su capacidad de solubilizar fosfatos.

La cepa LCC 4-2 identificada como *Candida sphaerica*, taxonómicamente es conocida con el nombre de *Kluyveromyces lactis* (estado teleomorfo), es reconocida por su aplicación en la producción de β -galactosidasa útil en la hidrólisis de la lactosa (Zhou and Chen, 2001, Lachance et al., 2011).

Un caso particular se presentó con esta levadura, LCC 4-2, para la cual se realizaron dos repeticiones con el Kit API, y el resultado en una ocasión fue *S. cerevisiae*, y en otra fue *C. sphaerica*. Por el método Microscan, se relacionó también con la especie *S. cerevisiae*, no obstante más adelante se discutirá que el perfil molecular obtenido mediante la prueba PCR-RFLP, no fue similar al de otras

cepas de *S. cerevisiae* evaluadas, lo cual permite presumir que puede tratarse de una especie del género *Candida*.

6.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEVADURAS NATIVAS AISLADAS

Los espaciadores transcritos internos ITS (región no codificante y variable) y el gen 5.8 s del rADN (codificante y conservado), han sido ampliamente utilizados para el establecimiento de relaciones genealógicas en hongos y exhiben mayores diferencias interespecíficas comparados con los genes 18s y 26s. (Kurtzman and Robnett, 1998, Suh et al., 2006).

Los resultados obtenidos, fueron comparados con varios estudios reportados y los resultados fueron similares en cuanto a que los productos de la amplificación de las regiones ITS 5.8s del rADN, presentaron un tamaño cercano o igual al reportado por otros autores, con las mismas especie. Por ejemplo, para el caso de la especie *S. cerevisiae*, se reporta que el producto de la amplificación de ésta región haciendo uso de los mismos *primers* (ITS1 e ITS4), presenta un tamaño alrededor de 800 pb (Esteve-Zarzoso et al., 1999, Carvalho et al., 2005, Trost et al., 2004).

Para el caso de cepas identificadas presuntivamente dentro del género *Candida*, también se encontró correlación con algunos reportes bibliográficos, donde señalan que el tamaño de la región 5.8S ITS de ADNr, está entre 500 a 600 pb, dependiendo de cada especie.

La región comprendida entre el gen 5.8s del rADN y las regiones no codificantes, haciendo uso de los iniciadores ITS1 e ITS4, presenta un bajo polimorfismo intraespecífico, pero una alta variabilidad interespecífica, siendo ésta aún mayor cuando se acompaña de un análisis de restricción (Sabate et al., 2002, Caggia et al., 2001, Las Heras-Vazquez et al., 2003, Esteve-Zarzoso et al., 1999, Trost et al., 2004).

Los análisis de longitud de los fragmentos obtenidos por la restricción de la región 5.8s ITS del rADN, mostraron básicamente cuatro polimorfismos diferentes, correspondiente cada uno de ellos a cada una de las especies encontradas *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa* y *C. sphaerica*, ratificando la alta variabilidad interespecífica de la región amplificada corresponden al reportado por otros autores en estudios similares utilizando las mismas enzimas de restricción, corroborando la reproducibilidad de la técnica (Esteve-Zarzoso et al., 1999, Carvalho et al., 2005).

Para realizar una caracterización intraespecífica de especies de *S. cerevisiae*, varios autores, han reportado el uso del marcador microsatélite (GTG)₅, para la discriminación de cepas a nivel de biotipos y se destaca éste por obtener el mayor nivel discriminatorio de las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* (Naumova et al., 2003, Santos et al., 2007).

Para el caso de las cepas identificadas previamente como *Saccharomyces cerevisiae*, el marcador no presentó la capacidad de realizar una discriminación intraespecífica de las mismas, arrojando perfiles genéticos similares para las siete cepas evaluadas, incluyendo la cepa comercial (Filho et al., 2005).

A pesar que el uso de este marcador no presenta un poder discriminatorio que permita distinguir cepas dentro de la misma especie, su uso puede ser una herramienta útil en un proceso de selección de levaduras con presuntivo potencial de producción de etanol puesto que nos permite seleccionar de manera rápida e inequívoca aquellos biotipos que presentan el mismo polimorfismo que las levaduras utilizadas comercialmente, ahorrando sustantivos costos de identificación bioquímica y evitando la realización de la amplificación de la región del gen 5.8s ITS del rADN.

Por otro lado, la implementación de ésta técnica, permitirá a futuro la realización de estudios del comportamiento de una población de levaduras a lo largo de un proceso fermentativo, distinguiéndolas rápidamente frente a miembros de otras especies.

6.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE VINAZA UTILIZANDO CEPAS NATIVAS

6.3.1 *Evaluación preliminar de la producción de etanol*

La producción de etanol, depende de un balance delicado entre procesos biológicos y bioquímicos concatenados por la levadura seleccionada dentro de un medio específico y una serie de factores ambientales.

La evaluación preliminar de producción de etanol de las cepas nativas estudiadas, (dadas las condiciones iniciales en que se diseña la prueba) es una herramienta útil como criterio de selección y permite la recuperación únicamente de aquellas especies de levaduras capaces de subsistir en un ambiente agresivo de fermentación, ya que se tienen una alta concentración de azúcares al inicio ($\geq 12\%$ p/v), un bajo pH (4.0 – 4.8) y en la medida en que avanza la fermentación, un aumento en la concentración de etanol, que ocasiona la inhibición de los microorganismos que no toleran estas condiciones.

Sin embargo, la presencia de estos microorganismos en estos ambientes no siempre significa que sean productores de etanol; por el contrario, en muchas ocasiones estas especies sobreviven en estos ambientes y son quienes ocasionan problemas de contaminación en un proceso de producción de etanol a escala industrial.

Basados en la caracterización bioquímica y morfológica, se seleccionaron aquellos aislamientos que preliminarmente fueron identificados como *Saccharomyces cerevisiae* y/o, que por su morfología tenían similitud con esta especie hasta contar con un total de 10 cepas diferentes. Su producción de etanol se evaluó mediante fermentaciones tipo batch, bajo las mismas condiciones en que se realiza un proceso de fermentación en las plantas ubicadas en el valle geográfico de río Cauca.

Todas las 10 cepas evaluadas mostraron su capacidad de producción de etanol, sin embargo ésta sólo fue representativa para cuatro cepas que alcanzaron grados alcohólicos superiores o iguales al 5% v/v, sin embargo en términos de eficiencias fermentativas cuatro cepas alcanzaron niveles del 80%.

La producción de etanol, es un proceso bioquímico desencadenado desde el momento en que un microorganismo entra en contacto con ciertas moléculas de azúcares fermentables, estando éstos en una concentración tal que permiten su libre intercambio a través de la membrana celular.

Por esta razón, cepas con consumos de ART menores a 50%, no son aptas para ser utilizadas para estos procesos ni pueden llegar a ser candidatas a futuros procesos de mejoramiento genético, dado el hecho que estos bajos consumos son indicio de una maquinaria enzimática pobre que le impide tener una alta velocidad de ingresos de estos azúcares al interior celular y posterior conversión de los mismos (Thomas et al., 1996).

El disacárido sacarosa, se encuentra en mayor proporción con relación a los monosacáridos glucosa y fructosa (60:20:20) en materias primas como la miel B, considerando que una de las cualidades que debe exhibir una cepa para ser utilizada en estas condiciones es su capacidad para producir la enzima invertasa capaz de hidrolizar la molécula de sacarosa en sus dos constituyentes glucosa y fructosa.

Varios autores han centrado su interés en el estudio del mecanismo de la invertasa y su participación sobre el proceso de fermentación de azúcares a etanol, y han definido que la expresión de esta enzima, es un factor importante en la regulación de la osmolaridad, puesto que la hidrólisis de la sacarosa y posterior liberación de glucosa y fructosa, conlleva a incrementos en la presión osmótica, que involucra reducciones en el volumen celular por el flujo del agua hacia el exterior (Takeshige and Ouchi, 1995, Myers et al., 1997, Andjelkovic et al., 2010).

Myers y colaboradores, encontraron que el mecanismo de inversión de la sacarosa exclusivo de *S. cerevisiae*, es el resultado de una compleja

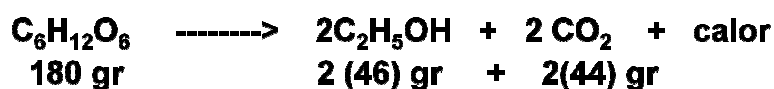
concatenación de la actividad de la enzima invertasa y de la producción de glicerol, como soluto compatible, para contrarrestar la alta presión osmótica. Lo anterior concuerda con el hecho que las cepas que presentaron mayor consumo de sacarosa fueron identificadas bioquímicamente como *S. cerevisiae*, LCC 4-3, LCC 14-1 y LCC 14-4 y presentaron grados de inversión de la sacarosa superiores al 90% excepto la cepa LCC 3-1 identificada como *C. colliculosa*, la cual tuvo un grado de inversión de sacarosa del 98%, éste hecho puede estar relacionado con el origen de éste aislamiento que fue una muestra de azúcar crudo (Myers et al., 1997).

La presencia de cepas nativas de *S. cerevisiae* aisladas bajo condiciones químicas proporcionadas por la mezcla de miel B y vinaza, es un hecho que permite confirmar la existencia de cepas de origen local que tengan el potencial de utilización industrial para producción de etanol a altas concentraciones involucrando la recirculación de vinaza y su desarrollo permitiría en un futuro cercano la apropiación de estas tecnologías biotecnológicas de las industria colombiana y minimizaría la dependencia de otras industrias.

6.3.2 Evaluación a escala banco del efecto de la vinaza sobre la producción de etanol

En condiciones óptimas, la conversión estequiométrica de glucosa a etanol está estimada como 1 molécula de glucosa, se producen 2 moléculas de piruvato, las cuales son descarboxiladas formando dos moléculas de etanol y dos moléculas de gas carbónico (Ecuación 1).

Ecuación 1. Relación estequiométrica de la conversión de la glucosa a etanol y gas carbónico



Las enzimas involucradas en este proceso, metabolizan los azúcares (entendidos como glucosa), que se convierte en etanol y CO₂, y además como ganancia neta, la levadura obtiene una alta reserva energética en términos de ATP.

De los seis aislamientos evaluados utilizando como sustrato únicamente miel B ajustada a una concentración de A.R.T iniciales alrededor del 14%, sobresalieron las cepas LCC 4-3, LCC 14-1, LCC 14-4 y LCC 0-1, las cuales presentaron grados alcohólicos superiores a 7.8% en volumen. A pesar de que estadísticamente no existen diferencias significativas, sobresalen las cepas LCC 14-1 y LCC 14-4, cuyos grados alcohólicos de 9.27 y 9.37 respectivamente y superan en más de una unidad porcentual a las demás cepas. Con diferencias estadísticamente significativas, se encuentran las cepas LCC 0-5 y LCC 0-10, que alcanzaron grados alcohólicos inferiores a 7.3 % (p/v) (Tabla 24).

Menos del 10% de la glucosa consumida, es utilizada por la célula y metabolizada por diferentes enzimas para la producción de intermediarias para la síntesis de nuevas células. Por ejemplo, algunos autores han demostrado que bajo condiciones anaerobias, la glucosa que se sintetiza por ciclo de Krebs o de ácidos tricarboxílicos no es conducida a crecimiento celular sino que es conducida para la formación de otros intermediarios de este ciclo que son claves para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos.

En cuanto al consumo de azúcares, las cepas que presentaron un mayor consumo fueron LCC 14-1 y LCC 14-4, las cuales consumieron el 93 y el 79% de los azúcares presentes difiriendo significativamente de las demás cepas evaluadas (Tabla 25).

Basados en estos factores bioquímicos y en la relación estequiométrica, se determina que por cada gramo de sacarosa, glucosa o fructosa, expresada en términos de A.R.T, la eficiencia máxima de la conversión de azúcares a etanol es del 90% (Ingledew, 2010). En este sentido, las cepas que presentaron mayores eficiencias en fermentación fueron las cepas LCC 14-1 y LCC 14-4, que alcanzaron eficiencias de fermentación de 87 y 88%, muy cercana al valor máximo

reportado. Se encontró que las demás cepas evaluadas, presentaron eficiencias significativamente menores, con valores de 73% e incluso alcanzando valores tan bajos como 48% como lo fue la cepa LCC 0-10.

Los resultados obtenidos, permiten señalar a la cepa LCC 14-1, como una cepa con un alto potencial de producción de etanol en condiciones batch, puesto que presenta una alta capacidad de consumo de azúcares y un metabolismo selectivo que le permite direccionar los azúcares consumido a la producción de etanol.

En presencia de componentes inhibidores del metabolismo, se pueden encontrar, algunos ácidos orgánicos que afectan el metabolismo fermentativo de las levaduras y por ende disminuyen su producción de etanol.

Este efecto se observó en presencia de vinaza, que por su alto contenido de ácidos orgánicos y de compuestos inorgánicos, se convierten en factores de estrés para las levaduras, las cuales disminuyen su actividad metabólica expresada en términos de grado alcohólico obtenido (Graves et al., 2007). Trabajos relacionados, desarrollados por CENICAÑA, han establecido que las concentraciones de ácidos orgánicos en vinaza, superan valores de 8000 mg/L para el ácido láctico y 1500 mg/L para el ácido acético. Existen evidencias que relacionan efectos inhibitorios para las levaduras, cuando se encuentran expuestas a estas concentraciones (Ingledew, 2010).

La producción de etanol de las levaduras LCC 14-1, LCC 14-4, LCC 0-1, LCC 0-5, y LCC 0-10, se redujo significativamente por la adición de concentraciones de 50 % vinaza, alcanzando una disminución entre el 13 y el 18% en el grado alcohólico obtenido a la hora 24. Esta disminución estuvo relacionada también con una reducción en el consumo de azúcares, entre un 15 y un 32 % (Tabla 25).

En términos de eficiencia, la presencia de vinaza ejerce una disminución significativa en la eficiencia fermentativa entre un 20 y un 27 %. Siendo las cepas LCC 0-1 y LCC 0-5, las más sensibles ante el efecto inhibitorio ejercido por la vinaza.

Como se puede observar, la presencia de vinaza ejerce un efecto negativo sobre el metabolismo de las cepas tanto en la menor capacidad de consumo de azúcares y en el caso de la sacarosa, aparentemente indica que los componentes de la vinaza pueden conllevar a una inhibición en la expresión de la enzima invertasa, la cual juega un papel importante en la producción de etanol (Takeshige and Ouchi, 1995, Myers et al., 1997, Andjelkovic et al., 2010).

Lo anterior se constata en el hecho que las concentraciones de sacarosa residual a la hora 24, de los tratamientos con vinaza (50 %), son hasta cuatro veces mayores al compararlos con los tratamientos sin vinaza, como es en el caso de la levadura LCC 14-1.

Otro efecto observado fue una mayor concentración de fructosa residual, en los tratamientos que involucraron vinaza (50 %), lo cual se relaciona con los problemas presentados en las industrias vinícolas, las cuales han establecido que las levaduras en condiciones de estrés por presencia de agentes tóxicos, reprimen el consumo de éste azúcar, conllevando a fermentaciones incompletas conocidas como fermentaciones estancadas (*Stuck fermentation*), caso que difícilmente es remediado y conlleva a iniciar un proceso de renovación celular o a la utilización de cultivos de levaduras mixtos (Tabla 28) (Santos et al., 2008).

Tabla 28. Concentración de fructosa residual de las levaduras nativas en los tratamientos evaluados

Levaduras	Concentración de Vinaza		
	0 %	50 %	60 %
LCC 4-3	2,94	3,10	3,58
LCC 14-1	0,44	0,68	0,71
LCC 14-4	0,98	1,83	1,96
LCC 0-1	2,02	3,10	3,34
LCC 0-5	3,17	4,60	4,82
LCC 0-10	3,39	4,21	4,40

Un caso particular, se observó con la cepa LCC 4-3, para la cual la presencia de de vinaza no tuvo un efecto negativo sobre su metabolismo fermentativo al no encontrarse diferencias significativas entre los grados alcohólicos obtenido en fermentaciones sin y con vinaza. .

Sin embargo, vale la pena destacar que aún bajo estas condiciones de inhibición fermentativa, estas cepas nativas alcanzaron un alto grado alcohólico, en promedio valores superiores a 7% (v/v), lo cual es un factor muy importante a tener en cuenta, si se compara con otros estudios, en los cuales el grado alcohólico obtenido por cepas nativas no supera concentraciones de etanol del 6%, aún sin involucrar la presencia de vinaza (Nahvi et al., 2002, Moneke, 2008).

6.3.3 Evaluación de la producción de etanol a escala piloto

El potencial de producción de etanol de una levadura, está dado en la medida en que cumpla diferentes requerimientos para su utilización a nivel industrial, entre los que se destacan una alta eficiencia en la conversión de los azúcares a etanol, baja producción de espuma, alta estabilidad genética, alta tolerancia a etanol, principalmente (

Tabla 29).

Tabla 29. Características deseables en levaduras alcoholeras

Propiedades de fermentación	Propiedades tecnológicas
Rápida iniciación de la fermentación	Alta estabilidad genética
Alta eficiencia en fermentación	Alta tolerancia a sulfitos
Alta tolerancia a etanol	Baja formación de espuma
Alta osmotolerancia	Propiedades de floculación
Temperatura óptima baja	Propiedades <i>killer</i>
Producción de biomasa moderada	Baja demanda de nitrógeno

Baja formación de sulfuros/ DMS/ tioles

Baja producción de ácidos volátiles

Baja producción de alcoholes superiores

Alta producción de glicerol

Alta actividad hidrolítica

Adaptado de: (Pretorius, 2000)

Las condiciones de evaluación establecidas, permitieron determinar algunas de las propiedades de fermentación y tecnológicas señaladas en la Tabla 29. En primer lugar, la concentración de A.R.T del medio de fermentación y el contenido de sólidos insolubles de la vinaza, permiten señalar que las levaduras nativas exhiben una alta osmotolerancia.

El desempeño metabólico obtenido por la cepa comercial, con un grado alcohólico de 9.1%(v/v) y una eficiencia de fermentación de 93%, la hace un estándar muy alto para realizar una comparación y sería pretencioso esperar que una cepa nativa alcance estos valores, más aún cuando se desconocen los procesos de adaptación e incluso mejoramiento a los que haya sido sometida.

Sin embargo las cepas nativas, presentaron un óptimo comportamiento fermentativo, teniendo en cuenta que la presencia de vinaza en un 50%, no permite exhibir todo su potencial. Con excepción de la cepa LCC 0-5, todas las cepas alcanzaron grados alcohólicos de cercanos e incluso superiores al 8 % (v/v), sin afectar la viabilidad celular, la cual fue superior a 50 %. Lo cual señala la tolerancia exhibida por éstas cepas nativas ante concentraciones altas de etanol.

Valores de eficiencia superiores al 70% alcanzando en uno de los casos la cepa de LCC 14-1 de 90% y grados alcohólicos superiores al 8% (v/v), permiten adicionalmente destacar el potencial que tienen estas cepas.

En términos de la iniciación de la fermentación, sobresalió la cepa LCC 14-1, con una velocidad de producción de etanol de 2.15 (g/L/h) a la hora 2 de fermentación,

valores cercanos a los obtenidos por la cepa comercial 2.45 (g/L/h), lo cual da información referente a la rápida iniciación de la fermentación que presenta ésta cepa.

Bajo el esquema de producción de las plantas del sector azucarero colombiano, otras características son deseables como lo es el hecho que la levadura presente una alta robustez en su maquinaria enzimática, que le permita soportar condiciones adversas como lo es la presencia de los compuestos tóxicos presentes en la vinaza.

Además de esto, también es considerable tener en cuenta que su desempeño en presencia de vinaza tiene un impacto positivo por cuanto se minimiza el consumo de agua en este proceso en niveles del 70%, comparado con un proceso de fermentación tradicional que utilice como sustrato miel y requiera un alto grado de dilución.

Por otro lado, la utilización de levaduras que alcanzan altos grados alcohólicos, además de los beneficios relacionados con el rendimiento, conllevan a reducciones sustanciales en los consumos de energía en la destilación y a la vez en la disminución de los volúmenes de vinaza generada, disminuyendo los costos unitarios de producción y de disposición de efluentes (Compeán and Polenske).

Las estimaciones de producción de vinaza a partir de los grados alcohólicos obtenidos (Tabla 27), a pesar de ser concebidas como un sistema estacionario, son de gran importancia y juegan un papel muy importante sobre el establecimiento de la sostenibilidad de la producción de etanol carburante a partir de caña de azúcar en Colombia, por cuanto se consideran el impacto que el proceso fermentativo pueda tener sobre el recurso hídrico (Silva Lora et al., 2011).

En este aspecto y teniendo en cuenta que el sustrato empleado en la evaluación tenía niveles de vinaza de 50%, los niveles de generación de éste mismo efluente son muy alentadores, menores a 3.7 litros de vinaza por litro de etanol generado por la levadura que presentó el menor grado alcohólico, si se compara con un sistema tradicional de fermentación donde se reporta que la producción de vinaza

puede alcanzar hasta 14 litros por unidad de producto (Shojaosadati et al., 1999, Parnaudeau et al., 2008).

En términos generales, el desempeño metabólico exhibido por las levaduras nativas principalmente las cepas LCC 14-1 y LCC 14-4, permiten resaltar su potencial de utilización a escala piloto e incluso comercial, en procesos fermentativos que utilicen como sustrato miel B y las hace candidatas a posteriores procesos de mejoramiento genético que conlleven a minimizar la inhibición que ejerce la vinaza sobre su metabolismo, y de esta manera hacerlas competitivas frente a cepas de carácter comercial.

CONCLUSIONES

- A partir de un medio de cultivo compuesto por una mezcla de miel B y vinaza en una concentración de 50% (v/v), se seleccionaron 17 cepas de levaduras, aisladas a partir de diferentes sustratos y ambientes relacionados con materiales del procesamiento de la caña de azúcar y/o sustratos fermentados, y de algunas muestras provenientes de cultivos de sorgo y aguas residuales. Estas cepas se caracterizaron por métodos bioquímicos y se identificaron presuntivamente como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida sphaerica*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida* spp.
- Las pruebas de producción de etanol, permitieron seleccionar tres cepas de las 16 aisladas que presentaron mayor conversión de los azúcares a etano LCC 4-3, LCC 14-1 y LCC 14-4. Mediante las técnicas de biología molecular RFLP región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN y PCR *Fingerprinting* con el microsatelite (GTG)₅, se confirmó que estas levaduras presentaron el mismo patrón molecular que la cepa comercial y corresponden a la especie *S. cerevisiae*.
- Los resultados obtenidos con la técnica PCR *Fingerprinting*, haciendo uso del marcador microsatelite (GTG)₅, demuestran que ésta técnica puede ser utilizada como un método rápido para identificación de levaduras con un potencial para la producción de etanol.
- En las condiciones naturales del valle del Río Cauca, es posible encontrar cepas de levaduras de carácter nativo, que tienen una alta capacidad de producción de etanol en sustratos con concentraciones de vinaza superiores al 50%, alcanzando eficiencias fermentativas del 90% y grados alcohólicos de 8% v/v y que conllevan a una minimización en la generación de este efluente además de ahorros significativos en el consumo de agua.
- Los resultados obtenidos con las cepas nativas, demuestran que éstas presentan la maquinaria metabólica para una conversión eficiente de azúcares a etanol y por tanto se constituyen en candidatos para aplicación de próximos

procesos de mejoramiento, con el fin de eliminar la dependencia tecnológica a levaduras exógenas al ambiente natural del valle del río Cauca.

- La capacidad fermentativa de seis levaduras nativas fue evaluada a escala erlenmeyer (tres cepas aisladas y tres cepas del banco de Cenicaña) y se encontró que en presencia de concentraciones de vinaza de 50 y 60% en volumen, disminuyen su producción de etanol entre un 12 – 19%, comparado en una fermentación sin vinaza. Esta disminución de etanol se debe a un bajo consumo de A.R.T y por ende altos azúcares residuales.
- A escala de reactor y en presencia de concentraciones de vinaza de 50% (v/v), las levaduras nativas alcanzaron grados alcohólicos alrededor del 8% (v/v) y eficiencias fermentativas superiores al 70%, alcanzando valores incluso del 90%. La levadura comercial alcanzó una concentración de etanol de 9%(v/v) y una eficiencia de 93%.

BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO, A. D. L., F.; OCHOA, J.C.; PARRA, J.A.; CALERO SALAZAR, L.M.; CABALLERO, M.R.; FIGUEROA, M.; MARRIAGA, N.; VALLEJO, R.; SALAZAR, S. 2005. Curso de entrenamiento de Tecnologías PRAJ. Informe técnico. Cali.
- ANDJELKOVIC, U., PICURIC, S. & VUJCIC, Z. 2010. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, 120, 799-804.
- ASOCAÑA 2006. Informe anual 2006 - 2007. Cali: Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia.
- ASOCAÑA 2010. Informe anual 2009 - 2010. Cali: Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia.
- ASOCAÑA 2011. Informe Anual 2010 - 2011. Cali: Asociación de Cultivadores de la Caña de Azúcar de Colombia.
- BARSZCZEWSKI, W. & ROBAK, M. 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiology*, 21, 227-231.
- BASÍLIO, A., DE ARAÚJO, P., DE MORAIS, J., DA SILVA FILHO, E., DE MORAIS, M. & SIMÕES, D. 2008. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. *Current Microbiology*, 56, 322-326.
- BASSO, L. C., DE AMORIM, H. V., DE OLIVEIRA, A. J. & LOPES, M. L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8, 1155-1163.
- BOTHA, A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1-8.
- BRICEÑO BELTRÁN, C. O. 2006. Aspectos estructurales y de entorno para proyectos e inversiones en bioetanol. *Carta Trimestral CENICAÑA* 28, 18-25.
- CAGGIA, C., RESTUCCIA, C., PULVIRENTI, A. & GIUDICI, P. 2001. Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 71-73.
- CARVALHO, C. M., ROCHA, A., ESTEVINHO, M. L. F. & CHOUPINA, A. 2005. Identification of honey yeast based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 5, 11 - 17.
- CECCATO-ANTONINI, S. R., TOSTA, C. D. & SILVA, A. C. D. 2004. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 13-23.
- CENICAÑA 2011. Informe Anual 2010. 160.
- CERUTTI DE GUGLIOMONE, G. I., DIEZ, O., CÁRDENAS, G., OLIVER, G. 2000. Sucrose utilization and dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* isolated from the sugar industry. *The Sugar Journal*, 62, 36-41.

- COMPEÁN, R. G. & POLENSKE, K. R. Antagonistic bioenergies: Technological divergence of the ethanol industry in Brazil. *Energy Policy*, In Press, Corrected Proof.
- CHEN, W.-B., HAN, Y.-F., JONG, S.-C. & CHANG, S.-C. 2000. Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5348-5352.
- DANIEL, H.-M. & PRASAD, G. S. The role of culture collections as an interface between providers and users: the example of yeasts. *Research in Microbiology*, 161, 488-496.
- DEMAIN, A. L., PHAFF, H. J. & KURTZMAN, C. P. 1998. The industrial and agricultural significance of yeasts. In: CLETUS, P. K. & JACK, W. F. (eds.) *The Yeasts (Fourth Edition)*. Amsterdam: Elsevier.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F. & QUEROL, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 329-337.
- FILHO, E., DE MELO, H., ANTUNES, D., SANTOS, S., RESENDE, A., SIMÕES, D. & DE MORAIS JR, M. 2005. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32, 481-486.
- GRAVES, T., NARENDRANATH, N., DAWSON, K. & POWER, R. 2007. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in corn mash. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1190-1196.
- KARHUMAA, K., FROMANGER, R., HAHN-HAGERDAL, B. & GORWA-GRAUSLUND, M. 2007. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73, 1039 - 1046.
- KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. & BOEKHOUT, T. 2011. Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. In: CLETUS, P. K., JACK, W. F. & TEUN, B. (eds.) *The Yeasts (Fifth Edition)*. London: Elsevier.
- KURTZMAN, C. P. & ROBNETT, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
- LACHANCE, M.-A., BOEKHOUT, T., SCORZETTI, G., FELL, J. W. & KURTZMAN, C. P. 2011. Candida. In: CLETUS, P. K., JACK, W. F. & TEUN, B. (eds.) *The Yeasts (Fifth Edition)*. London: Elsevier.
- LARRAHONDO, J., MORALES, A., VICTORIA, H., JARAMILLO, A. 2000. Compuestos orgánicos en vinaza. *Carta Trimestral*, 3.
- LAS HERAS-VAZQUEZ, F. J., MINGORANCE-CAZORLA, L., CLEMENTE-JIMENEZ, J. M. & RODRIGUEZ-VICO, F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*, 3, 3-9.

- LEGRAS, J.-L. & KARST, F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249-255.
- MA, K., WAKISAKA, M., SAKAI, K. & SHIRAI, Y. 2009. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. *Bioresource Technology*, 100, 2289-2292.
- MASNEUF, I., HANSEN, J., GROTH, C., PISKUR, J. & DUBOURDIEU, D. 1998. New Hybrids between *Saccharomyces* Ssensu Stricto Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3887-3892.
- MICHELENA, G., MARTÍNEZ, A., CERUTTI DE GUGLIEMONE, G.I., CORONLE, M., BELL, A., CARRERA, E., LOPEZ., A., PORTUONDO, P., MERGAREJO, L., STEEL, F. 2006. Inhibitory effect on *Leuconostoc* and other bacteria. *International Sugar Journal*, 108, 44-48.
- MONEKE, A., OKOLO, B., NWEKE, A., EZEUGU, L., IRE, F. 2008. Selection and characterisation of high ethanol tolerant *Saccharomyces* yeasts from orchard soil. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4567-4575.
- MYERS, D., LAWLOR, D. & ATTFIELD, P. 1997. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 145-150.
- NAHVI, I., EMTIAZI, G. & ALKABI, L. 2002. Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 23, 481-486.
- NAUMOVA, E. S., KORSHUNOVA, I. V., JESPERSEN, L. & NAUMOV, G. I. 2003. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research*, 3, 177-184.
- NAVARRO, A. R., DEL C. SEPÚLVEDA, M. & RUBIO, M. C. 2000. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*, 20, 581-585.
- NOVA, M. X. V., SCHULER, A. R. P., BRASILEIRO, B. T. R. V. & MORAIS JR, M. A. 2009. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. *Food Microbiology*, 26, 460-466.
- OLGUÍN, E. J., DOELEL, H. W. & MERCADO, G. 1995. Resource recovery through recycling of sugar processing by-products and residuals. *Resources, Conservation and Recycling*, 15, 85-94.
- OLIVA-NETO, P. D. & YOKOYA, F. 2001. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 10-14.
- OLIVEIRA, V. A., VICENTE, M. A., FIETTO, L. G., DE MIRANDA CASTRO, I., COUTRIM, M. X., SCHULLER, D., ALVES, H., CASAL, M., DE OLIVEIRA SANTOS, J., ARAUJO, L. D., DA SILVA, P. H. A. & BRANDAO, R. L. 2008. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae*

- Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaca Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 693-701.
- OSORIO-CADAVID, E., CHAVES-LÓPEZ, C., TOFALO, R., PAPARELLA, A. & SUZZI, G. 2008. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiology*, 25, 771-777.
- OSORIO-CADAVID, E. R., MAURICIO; LOPEZ, WILLIAM; MAMBUSCAY, LUZ ADRIANA 2009. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11.
- PARNAUDEAU, V., CONDOM, N., OLIVER, R., CAZEVIEILLE, P. & RECOUS, S. 2008. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology*, 99, 1553-1562.
- PRETORIUS, I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- QUINTERO DURÁN, R. 2008. Investigaciones sobre el manejo de las vinazas aplicadas al suelo *Cenicaña Documento de Trabajo*, 19.
- ROCHA MH, L. E., VENTURINI OJ, ESCOBAR JCP, SANTOS JJCS, MOURA AG. 2010. Use of the life cycle assessment (LCA) for comparison of the environmental performance of four alternatives for the treatment and disposal of bioethanol stillage. *Proceedings of the XXVII Congress of International Society of Sugar Cane Technologists (ISSCT)*. 10-14.
- SABATE, J., CANO, J., ESTEVE-ZARZOSO, B. & GUILLAMÓN, J. M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157, 267-274.
- SANTOS, J., SOUSA, M. J., CARDOSO, H., INACIO, J., SILVA, S., SPENCER-MARTINS, I. & LEAO, C. 2008. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, 154, 422-430.
- SANTOS, S., BASÍLIO, A., BRASILEIRO, B., SIMÕES, D., SILVA-FILHO, E. & DE MORAIS, M. 2007. Identification of yeasts within <i>Saccharomyces</i> sensu stricto complex by PCR-fingerprinting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1613-1620.
- SHEEHAN, G. J. & GREENFIELD, P. F. 1980. Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Research*, 14, 257-277.
- SHOJAOSADATI, S. A., KHALILZADEH, R., JALILZADEH, A. & SANAEI, H. R. 1999. Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. *Resources, Conservation and Recycling*, 27, 125-138.
- SILVA-FILHO, E. A. D., SANTOS, S. K. B. D., RESENDE, A. D. M., MORAIS, J. O. F. D., MORAIS, M. A. D. & SIMÕES, D. A. 2005. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 13-23.
- SILVA LORA, E. E., ESCOBAR PALACIO, J. C., ROCHA, M. H., GRILLO RENÓ, M. L., VENTURINI, O. J. & ALMAZÁN DEL OLMO, O. 2011. Issues to

- consider, existing tools and constraints in biofuels sustainability assessments. *Energy*, 36, 2097-2110.
- SOCARRAS DÍAZ, J. I. D. M., T. ; JAIME, L.Z. ; LEGARDA, F. ; CASTILLO MONROY, E.F. 2009. Determinación de metabolitos y parámetros indicadores de eficiencia en el proceso de fermentación. *Memorias VIII Congreso de la Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar.*, 597-606.
- SUH, S.-O., BLACKWELL, M., KURTZMAN, C. P. & LACHANCE, M.-A. 2006. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98, 1006-1017.
- TAKESHIGE, K. & OUCHI, K. 1995. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 513-515.
- THOMAS, K. C., HYNES, S. H. & INGLEDEW, W. M. 1996. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry*, 31, 321-331.
- TROST, A., GRAF, B., EUCKER, J., SEZER, O., POSSINGER, K., GÖBEL, U. B. & ADAM, T. 2004. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 201-211.
- VAN DEN BRINK, J., CANELAS, A. B., VAN GULIK, W. M., PRONK, J. T., HEIJNEN, J. J., DE WINDE, J. H. & DARAN-LAPUJADE, P. 2008. Dynamics of Glycolytic Regulation during Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentative Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5710-5723.
- VAN DER AA KÜHLE, A. & JESPERSEN, L. 1998. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 205-213.
- ZHAO, X. Q. & BAI, F. W. 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 144, 23-30.
- ZHOU, Q. Z. K. & CHEN, X. D. 2001. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized [beta]-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33-40.