



**Evaluación de un clúster de levaduras para la optimización de la producción de alcohol en  
el Ingenio Providencia SA.**

Susana Cano Zapata

Informe de práctica para obtener el título de Ingeniera Bioquímica

Asesores

Darly Silvana Parrado Saboyá, Doctor (PhD) en Ingeniería química Luisa

Fernanda Patiño Cervantes, Docente de Microbiología

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2024

---

Cita

(Cano Zapata, 2024)

---

Referencia

Cano Zapata, S. (2024). *Evaluación de un clúster de levaduras para la optimización de la producción de alcohol en el ingenio providencia SA.*

Estilo APA 7 (2020)

[Informe de práctica]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.

---



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

### **Dedicatoria**

El presente trabajo de grado es dedicado principalmente a Dios, que me guía y me fortalece para alcanzar mis más grandes proyectos, a mis padres, Hector Cano y Yaneth Zapata, que han sido luz en mi vida, ayudándome a ser mejor y dando su mejor esfuerzo para verme realizada sin importar los obstáculos que en la vida se presentan, mi familia siempre me llena de motivación y perseverancia.

## **Agradecimientos**

Agradezco la valiosa oportunidad que me brindó el Ingenio Providencia SA., de ser parte de una industria tan enriquecedora de conocimiento como lo son las fermentaciones alcohólicas y el desarrollo sostenible ambiental en general. Gracias a mi mentora y líder de Microbiología, la Doctora Darly Silvana Parrado Saboyá, por enseñarme la pasión por las levaduras, y los bioprocesos, por indicarme con amor, cómo incluir hábitos de excelencia y profesionalismo en mi vida. Esta experiencia, me ayudó a conocer mis áreas de interés, aplicando la investigación y el desarrollo de nuevos procesos, con la finalidad de realizar aportes significativos a la industria agrícola del sector azucarero. Agradezco también, a mi asesora de prácticas Luisa Fernanda Patiño, por el apoyo y el acompañamiento en esta etapa tan importante para mi vida profesional. Finalmente, doy gracias a la Universidad de Antioquia, por convertirse en una segunda casa, en la cual aprendí y crecí profesional y personalmente.

**Tabla de contenido**

Resumen .....	8
Abstract .....	9
1.Introducción.....	10
2.Planteamiento del problema .....	11
3.Justificación .....	13
4 Objetivos .....	14
4.1 Objetivo general .....	14
4.2 Objetivos específicos .....	14
5 Marco teórico .....	15
6 Materiales y metodología .....	17
6.1 Microorganismos .....	17
6.2 Bioaumentación de las cepas seleccionadas. ....	17
6.3 Control de calidad .....	18
6.4 Montaje a escala laboratorio para fermentación alcohólica .....	18
6.5 Preparación del medio de fermentación y estandarización del inóculo.....	19
6.6 Análisis microbiológico y fisicoquímico de cada levadura usada. ....	20
6.7 Producción de biomasa .....	21
6.8 Producción de Alcohol- Montaje a escala biorreactor .....	21
6.8.1 Balance del medio de fermentación .....	22
7 Resultados .....	23
7.1 Análisis fisicoquímico .....	23
7.2 Producción de biomasa .....	24
7.3 Azúcares fermentables .....	25
7.4 Consumo de AMNL (mg/L).....	27
8 Discusión .....	32
9 Conclusiones .....	33
10 Recomendaciones .....	34
11 Referencias .....	35

### Lista de tablas

**Tabla 1.** Control de calidad.

**Tabla 2.** pH inicial y final de cada réplica del montaje de fermentación 1. **Tabla**

**3.** Ajuste de densidad óptica para cada inóculo.

**Tabla 4.** Toma de muestras para análisis microbiológicos y fisicoquímicos **Tabla**

**5.** Grado alcohólico 16 y 24 horas.

**Tabla 6.** ANOVA. Análisis de varianza para cada variable

### Lista de figuras

**Figura 1:** *Cepas evaluadas vistas en microscopio en objetivo 100x.*

**Figura 2.** *Montaje experimental 1 a escala laboratorio.*

**Figura 3.** *Montaje Biorreactor para fermentación alcohólica.*

**Figura 4.** *Consumo de azúcares fermentables [AF] (g/L) vs tiempo (h).*

**Figura 5.** *a.) Consumo de azúcares fermentables [AF] (g/L) vs tiempo (h). b.) Consumo de sacarosa para cada levadura. c.) Consumo de glucosa para cada levadura. d.) Consumo de fructosa para cada levadura*

**Figura 6.** *Comparativo de amino nitrógeno libre (AMNL en (mg/L)) y (%).*

**Gráfica 1.** *Cinética de crecimiento Biomasa (g/L) vs Tiempo(h).*

**Gráfica 2.** *Producción de alcohol montaje a escala biorreactor*

### Resumen

La propuesta planteada pretende evaluar la producción de alcohol de 3 levaduras aisladas del proceso fermentativo, y comparar sus rendimientos, consumo de sustrato y concentración final de etanol con una levadura comercial estandarizada en el proceso denominada cepa patrón (PT). Los ensayos se dividieron en dos etapas, en la etapa 1 el montaje a escala laboratorio para evaluar la producción de alcohol y la cantidad de biomasa, en la segunda parte se realiza el montaje a escala biorreactor de 10 L en condiciones controladas de temperatura (30°C), agitación (150 rpm), y un pH de 4.5. El objetivo es identificar la mejor cepa de levadura en cuanto a producción de etanol para optimizar el proceso actual de fermentación alcohólica en la destilería del ingenio Providencia. Las 3 cepas con mejores resultados se comparan con la cepa actualmente utilizada, y se determina que la levadura denominada cepa 4 alcanza las producciones de alcohol de la cepa patrón con un 9.1 % de grado alcohólico. En la ANOVA se analiza la varianza, concluyendo que no existe diferencia significativa entre las cepas evaluadas para cada parámetro, es decir, las levaduras evaluadas son promisorias y se pueden continuar evaluando en futuros proyectos.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, etanol, fermentación alcohólica, sustrato, mieles de caña.



### Abstract

The proposal aims to evaluate the alcohol production of three yeasts isolated from the fermentation process, and to compare their yields, substrate consumption and final ethanol concentration called standard strain (PT). The trials were divided into two stages, in stage 1 the laboratory scale set-up to evaluate the alcohol production and the amount of biomass, in the second part the set-up is carried out at a bioreactor scale of ten Liters under controlled conditions of temperature (30°C), agitation (150 rpm), and a pH of 4.5. The objective is to identify the best yeast strain in terms of ethanol production to optimize the current alcoholic fermentation process in the distillery. The three best performing yeasts are compared with the currently used yeast, and it is determined that the yeast called strain 4, reaches the alcohol yields of the standard strain with 9.1 % alcohol content, with a similar consumption of fermentable sugars and nitrogen source.

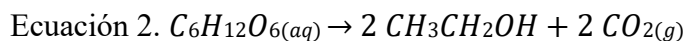
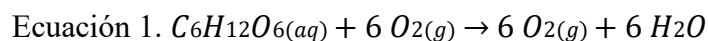
In the ANOVA the variance was analyzed, concluding that there is no significant difference between the strains evaluated for each parameter, i.e., the yeasts evaluated are promising and can be further evaluated in future projects.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, alcoholic fermentation, substrate, sugarcane molasses.

## 1.Introducción

La población actual se enfrenta a la búsqueda de nuevas energías renovables para implementar una alternativa al uso de combustibles fósiles que generan problemas ambientales como gases de efecto invernadero (Demirbas, 2010). Entre las ventajas del uso de energía renovable se encuentra la disponibilidad. Actualmente se producen biocombustibles como el bioetanol a partir de productos agrícolas como la caña de azúcar, sin embargo, resulta ser más amigable utilizar la biomasa o residuos lignocelulósicos para producir etanol de segunda generación.

Las levaduras son organismos eucariotas con una morfología variable respecto a su tamaño, color y forma. Además, alcanzan un diámetro mayor al de las bacterias y pueden ser ovaladas, esféricas o incluso elípticas. Se reproducen por gemación en condiciones ambientales específicas a una temperatura de 30°C, pH de 4 a 4,5. Son microorganismos muy importantes en la industria, ya que a lo largo del tiempo se han utilizado para la producción de pan, vino y otras bebidas fermentadas. Estos microorganismos pueden llevar a cabo dos tipos de metabolismo: la fermentación anaerobia y la aerobia. En presencia de oxígeno, inicia la fase de reproducción celular para formar biomasa y CO<sub>2</sub> (ecuación 1). En ausencia de oxígeno, las levaduras producen menos biomasa y su principal producto es el alcohol, junto con CO<sub>2</sub> (ecuación 2) (Curia, 2011).



El etanol tiene el potencial para ser la principal fuente de energía renovable en el mundo, además, el reúso de los residuos de la industria agrícola favorece el cumplimiento de la normatividad ambiental y demás requisitos de sostenibilidad (Chang, 2007).

De acuerdo con Asocaña (Sector azucarero colombiano), en el año 2006, 5 de los ingenios azucareros de Colombia construyeron su propia destilería de alcohol (Incauca, Providencia, Manuelita, Mayagüez y Risaralda), logrando una producción dual de azúcar y etanol. La implementación de este proceso productivo resulta ser estratégico para la generación de empleo, disminución del calentamiento global, y la optimización del proceso de producción de caña por la utilización de subproductos. (Asocaña, 2014).

En este informe se presenta la evaluación de un clúster de cepas de levaduras para identificar la cepa con mejor rendimiento en la fermentación alcohólica, es decir, para la producción de etanol, usando como sustrato la miel de caña.

## 2. Planteamiento del problema

El proceso de producción de alcohol en la destilería del Ingenio Providencia utiliza cepas comerciales de levadura, las cuales son efectivas. No obstante, hay oportunidades para mejorar la eficiencia, reducir costos y adaptar mejor las condiciones específicas del proceso de fermentación. En el proceso de fermentación se recircula la vinaza, un subproducto de la producción de alcohol con alta carga orgánica, que podría afectar el producto. La vinaza puede ser difícil de gestionar debido a su alta carga orgánica, lo que representa un desafío de sostenibilidad.

Se busca evaluar cepas que produzcan una mayor cantidad de alcohol para optimizar el proceso y reducir costos. Es crucial encontrar cepas de levadura que no solo sean más eficientes en términos de producción de alcohol, sino que también se comporten igual o mejor que las cepas actualmente utilizadas en presencia de vinaza, lo que podría contribuir a una mejor adaptación y rendimiento en el proceso de fermentación.

Este proyecto busca evaluar y comparar varias cepas de levadura productoras de alcohol, tanto comerciales como levaduras aisladas del mismo proceso en la destilería. Se espera que algunas de las levaduras aisladas, al estar adaptadas a las condiciones específicas del proceso, ofrezcan ventajas significativas en cuanto a eficiencia y adaptación a la vinaza.

El objetivo es identificar cepas de levadura con características superiores que puedan reemplazar a las cepas comerciales actuales. Se pretende encontrar levaduras que requieran menos sustrato o fuente de nitrógeno para producir una cantidad igual o superior de alcohol, y que además muestren una buena adaptación a la vinaza.

### 2.1 Antecedentes

Como lo menciona en su artículo, (Alexis Gómez, 2018), a escala industrial Brasil y EUA, impusieron el uso del etanol como combustible alternativo de manera exitosa, por ejemplo en EUA, el 96 % del mercado de gasolina es E10 (10 % v/v de etanol con 90 % v/v de gasolina), por otro lado el etanol que se produce desde almidón de maíz abarca tres cuartas partes de la producción de

---

biocombustibles del país, el valor agregado de este es su procedencia de la materia prima de la industria alimentaria (M.P. Sudhakar, 2016).

Brasil produce gran parte de su etanol a partir de caña de azúcar, la producción de etanol en el 2014 cubrió toda la mezcla E25 (25 % v/v con 75 % v/v de gasolina) disminuyendo la importación de 550 x106 barriles de petróleo (ANP, 2014). (Alexis Gómez, 2018)

Para el año 2012, la producción en promedio de etanol combustible en el mundo fue 232,000 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>, de los cuales 138,408 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> (59.5 %) fueron producidos en EUA, y 63 374 m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> (27.4 %) en Brasil (ANP, 2014).

La materia prima usada para la producción de etanol carburante puede variar, según la estructura vegetal y la forma en que almacenan la energía, en el caso de la caña de azúcar, los tallos almacenan la energía en forma de sacarosa. En 2013 se cultivaron aproximadamente 8.6 millones de hectáreas en Brasil con un rendimiento promedio de 70 t ha<sup>-1</sup>, para un total anual de 596 millones de toneladas de caña para producir etanol (Oliveira, 2018).

Para extraer azúcares fermentables y carbohidratos no estructurales mediante el proceso de difusión a partir de biomasa de caña se han estudiado diversos métodos (Nana Baah AppiahNkansah, 2015). Para el proceso de molienda y la depuración de microorganismos que aumentan la interacción de las enzimas con el almidón se han estudiado técnicas y el proceso óptimo (Adrián González Leos, 2016)

En el proceso de producción de alcohol artesanal pueden participar diferentes tipos de levaduras como *Saccharomyces* sp, *Torula* sp. y *Pichia* sp, pero a diferencia de esto, a escala industrial, es necesario que en el proceso de obtención del producto, solamente este presente el tipo de microorganismo *Saccharomyces* sp, por los requerimientos para un proceso óptimo y económicamente viable, es decir se usan cepas comerciales puras, específicamente para la producción de alcohol para controlar la fermentación (Adrián González Leos, 2016).

### 3 Justificación

La eficiencia y rentabilidad en la producción de alcohol son aspectos de relevancia para las óptimas condiciones de producción de alcohol en los ingenios colombianos. Actualmente, las empresas utilizan cepas de levadura comerciales que pueden ser optimizadas para que no presenten limitaciones en términos de adaptación a las condiciones específicas del proceso, especialmente en lo que respecta a la gestión de la vinaza. Esta situación no solo incrementa los costos operativos, sino que también puede afectar negativamente la eficiencia del proceso de fermentación.

La reutilización de la vinaza en el proceso de fermentación introduce una carga orgánica considerable, lo que puede dificultar la actividad fermentativa o aumentar el riesgo de contaminación si las levaduras no están adecuadamente adaptadas. Las cepas aisladas podrían adaptarse tan bien o incluso mejor que la cepa comercial actualmente utilizada, lo que permitiría una mayor producción de alcohol y la evaluación de nuevas oportunidades de mejora.

El uso de cepas de levadura que no solo sean eficientes en la producción de alcohol, sino que también estén adaptadas a la presencia de vinaza, podría representar una solución significativa para estos desafíos. La identificación y aplicación de levaduras con estas características podrían mejorar la eficiencia del proceso de fermentación, reducir los costos operativos y optimizar el manejo de la vinaza.

Además, la evaluación de cepas de levadura aisladas del mismo proceso en la destilería presenta una oportunidad valiosa. Estas levaduras podrían estar mejor adaptadas a las condiciones específicas del proceso de fermentación en el Ingenio Providencia. La posibilidad de descubrir cepas con un rendimiento superior o igual al de las cepas comerciales actuales no solo podría mejorar la eficiencia del proceso, sino que también podría ofrecer una alternativa más económica y sostenible.

Por lo tanto, investigar y adoptar cepas de levadura más adaptadas a las condiciones específicas del proceso en la destilería del Ingenio Providencia es crucial para mejorar la competitividad, reducir

costos y optimizar la producción de alcohol. Este proyecto proporciona una base para realizar estos avances, ofreciendo potenciales beneficios tanto económicos como operativos para la empresa

## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la producción de etanol para un clúster de cuatro cepas de levaduras aisladas del Ingenio Providencia SA.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Analizar la cinética de crecimiento de cada cepa evaluada.
- Identificar el consumo de sustrato de las levaduras
- Comparar la producción de etanol y determinar la cepa (s) de levadura que presenten el mejor rendimiento.

## 5 Marco teórico

- Caña de azúcar.

La Caña de Azúcar (*saccharum officinarum*), es muy eficiente en la producción de biomasa tiene una alta tasa de aprovechamiento de energía solar y tolerancia a la sequía, estas características la convierten en una planta ideal para producción de azúcar y bioetanol. Se conocen diversas variedades cultivadas que se diferencian por el color y la altura de los tallos. (Álvaro Rincón, 2018)

- Subproductos.

### *Mieles*

La miel es un líquido denso y viscoso que resulta de la refinación de la sacarosa de la caña de azúcar durante el proceso de extracción del jugo, clarificación, evaporación, cristalización, centrifugación, clasificación. (SA., 2016)

### *Bagazo de caña*

Se produce luego de la molienda de la Caña de Azúcar, este subproducto se utiliza en la planta de compostaje o también, como combustible en las calderas para la cogeneración de energía. En el ingenio providencia SA., entró en funcionamiento la planta de cogeneración de energía a partir del bagazo de caña, este proyecto se realizó con el objetivo de emplear eficientemente la energía para optimizar el uso de los recursos energéticos que provee la caña de azúcar, la cual, es una fuente importante de biomasa. (SA., 2016) La planta de cogeneración de energía tiene la capacidad de generar 38 Megavatios por hora (MWh). Se instaló una caldera de alta presión con capacidad de 400.000 libras de vapor por hora, dos turbogeneradores con capacidad de 20 y 18 MW cada uno y una subestación eléctrica de 25 MVA que eleva el voltaje de 13.200 voltios a 115.000 voltios. (SA., 2016)

### *Cachaza*

En algunos ingenios, estos residuos orgánicos (cachaza, ceniza, hojas y vinaza concentrada) los transforma en un producto estable e higienizado, que es de uso agrícola en la agricultura como abono orgánico, el cual contiene un 30% de humedad, y, además, como mejorador del suelo. La

---

planta de compostaje de Ingenio Providencia S.A., tiene capacidad para procesar cada día 420 toneladas de residuos y 200 toneladas de vinaza, con lo que produce 150 toneladas de compost al día. (SA., 2016)

- *Saccharomyces cerevisiae*.

*Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levaduras más utilizada para la obtención de etanol a nivel industrial, esto se debe a que es un microorganismo de fácil manipulación, no es exigente en cuanto a su cultivo, tiene bajo costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Asocaña, 2014).

- Fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico en el que las levaduras convierten los azúcares presentes en un medio, como el jugo de caña, en alcohol etílico y dióxido de carbono. Este proceso es fundamental en la producción de bebidas alcohólicas como el ron y la cerveza. La fermentación alcohólica a partir de levaduras aisladas de miel de caña se convierte en una interesante alternativa para obtener productos con perfiles aromáticos diferentes (según la procedencia de la cepa) y sensoriales únicos. (García Romel, 2015)

- Cinética de crecimiento.

La Cinética de Crecimiento se refiere al análisis cuantitativo de la velocidad a la que las levaduras se reproducen y se multiplican en un medio de cultivo determinado. Este enfoque permite determinar cómo evoluciona la concentración de células durante la fermentación, lo que resulta significativo para estimar la producción de etanol. Entender la cinética de crecimiento de cepas de levaduras es esencial para predecir el rendimiento del proceso y aplicar estrategias que mejoren la eficiencia en la producción de biocombustibles en la industria. (Alejandro Rincón Santamaría, 2018)

- Rendimiento del etanol.

El rendimiento se puede determinar con el grado de fermentación, este se refiere a la cantidad de azúcares fermentables convertidos en etanol durante el proceso de fermentación. Es decir, el parámetro está influenciado por factores como la concentración de azúcares en el sustrato, la cepa de levadura utilizada, la temperatura y el pH del medio de fermentación. Un alto grado de



fermentación y un rendimiento óptimo son importantes para maximizar la producción de etanol. (García Romel, 2015)

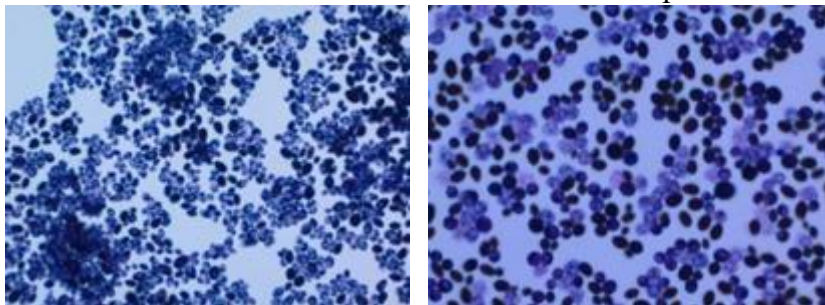
## 6 Metodología

### 6.1 Microorganismos

En el presente proyecto de investigación, se utilizó el medio miel como inóculo para determinar el crecimiento de levaduras seleccionadas y realizar sus respectivos análisis comparativos con la levadura denominada como patrón actualmente usado en la planta.

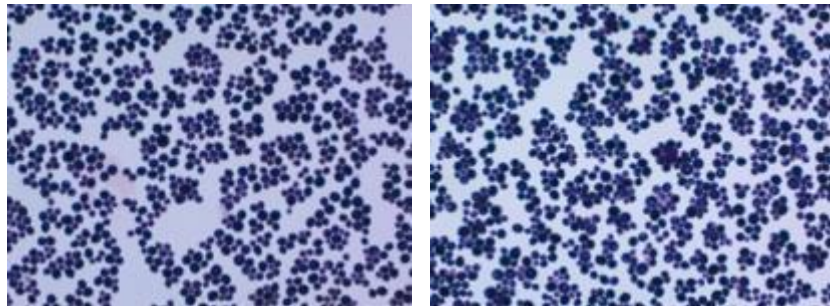
### 6.2 Bioaumentación de las cepas seleccionadas.

Para la siembra masiva de las cepas nativas seleccionadas se utilizó el agar CGA como medio de cultivo. Se incubó un total de 10 cajas Petri por cepa durante 48 horas a 30°C. Posteriormente se realizó coloración de Gram a una caja por cepa para tener un control de calidad que permitiera verificar la pureza de la levadura. De la coloración de Gram realizada a cada cepa, se pudo determinar la pureza de cada cultivo, que se utilizará para preparar el inóculo destinado a la fermentación alcohólica a escala de laboratorio en tipo lote.



Cepa Patrón (PT)

Cepa 2



Cepa 3

Cepa 4

*Figura 1: Cepas evaluadas vistas en microscopio en objetivo 100x.*

Se verifica la pureza de las 3 levaduras a utilizar y se determina que es posible realizar los próximos montajes a escala laboratorio y biorreactor para conocer el grado de alcohol producido de cada levadura induciendo la fermentación anaerobia, y adicionalmente la producción de biomasa usando la fermentación aerobia.

### 6.3 Control de calidad

Como procedimiento esencial para determinar la pureza del experimento y corroborar las UFC esperadas se realiza un control usando una dilución seriada en agar cloranfenicol Glucosado (CGA) y Plate Count (PC).

*Tabla 1. Control de calidad.*

Microorganismo	CGA	PC
Patrón R1	49 X10 <sup>-7</sup>	0
Patrón R2	42 X10 <sup>-7</sup>	0
Cepa 3 R1	86 X10 <sup>-7</sup>	0
Cepa 3 R2	96 X10 <sup>-7</sup>	0
Cepa 4 R1	58 X10 <sup>-7</sup>	0
Cepa 4 R2	61 X10 <sup>-7</sup>	0

#### 6.4 Montaje a escala laboratorio para fermentación alcohólica

El montaje se compone de 9 unidades experimentales teniendo en cuenta el control, cada unidad contenía inicialmente 450 mL de medio y 50 mL de inóculo. El lote se dejó bajo condiciones controladas a una temperatura de 30° C y 150 rpm durante 24 horas con un pH de 4.5.

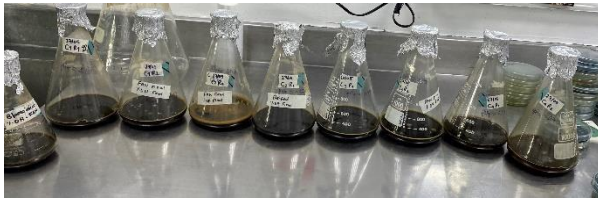


Figura 2. Montaje experimental 1 a escala laboratorio.

Al cumplirse las 24 horas del lote de fermentación, se desmontan las unidades del shaker y se miden los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos pertinentes.

#### 6.5 Preparación del medio de fermentación y estandarización del inóculo.

En esta etapa se establecieron los porcentajes de cada componente para la preparación del medio de fermentación, además, se preparó solución salina estéril al 85 % para el inóculo.

##### *Balace del medio de fermentación*

Para preparar 4.5 L de medio de fermentación con una producción final estimada de alcohol del 10.68 % se adiciona:

$$\text{Agua de proceso} = 1.61 \text{ m}^3$$

$$\text{Vinaza} = 1.61 \text{ m}^3$$

$$\text{Inóculo} = 0.45 \text{ m}^3$$

$$\text{Miel B} = 0.89 \text{ m}^3$$

$$\text{Urea} = 2.72 \text{ g}$$

Luego de homogenizar el medio de fermentación, se adicionan 450 mL de medio en nueve Erlenmeyer de un litro, etiquetados con el nombre y la réplica de cada cepa, así como el control.

Se mide el pH del medio y se esteriliza en la autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizado y enfriado, se procede a la inoculación en la cabina de flujo laminar.

*Tabla 2. pH inicial y final de cada réplica del montaje de fermentación 1.*

Muestra	pH inicial	pH final
Cepa patrón R1	4,68	4,71
Cepa patrón R2	4,67	4,73
Cepa 2 R1	4,77	4,82
Cepa 2 R2	4,74	4,85
Cepa 3 R1	4,79	4,9
Cepa 3 R2	4,78	4,85
Cepa 4 R1	4,7	4,81
Cepa 4 R2	4,7	4,82
Blanco	4,8	4,8

• *Preparación del inóculo*

Usando cuatro frascos schott de vidrio de 250 ml con 150 ml de solución salina al 85% estéril, se recolecta la biomasa de 3 cajas de cada cepa para obtener el inóculo. Se ajusta la densidad óptica a 2.0 ( $200 \times 200 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ) a una absorbancia de 620 nm.

*Tabla 3. Ajuste de densidad óptica para cada inóculo.*

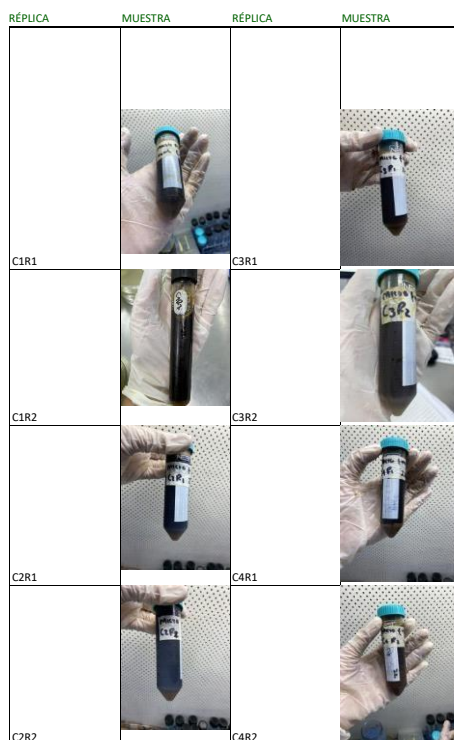
Muestra	Densidad óptica
Cepa Patrón	2,358-1,880
Cepa 2	2,296
Cepa 3	2,261

Cepa 4	2,186
--------	-------

### 6.6 Análisis microbiológico y fisicoquímico de cada levadura usada.

En esta parte del experimento se deben separar 50 mL de cada réplica para los análisis microbiológicos, 50 mL para azúcares fermentables y el resto de la muestra para determinación de grado alcohólico (50 mL) y AMNL (100ml).

*Tabla 4. Toma de muestras para análisis microbiológicos y fisicoquímicos.*



### 6.7 Producción de biomasa

Para evaluar la cinética de crecimiento en relación a la biomasa producida, se utilizan muestras del medio (Montaje a escala biorreactor # 1) las cuales se congelaron previamente. Se determina la cuantificación de biomasa utilizando la metodología peso seco, para esto se utilizaron 50 (g/L) de muestra, una balanza con (precisión g x 0,001), una mufla para secar la muestra un recipiente metálico.

## 6.8 Producción de Alcohol- Montaje a escala biorreactor

### 6.8.1 Balance del medio de fermentación

Para preparar 6.2 L de medio de fermentación con una producción final estimada de 10 % de alcohol se adiciona:

*Agua de proceso* = 2.4 m<sup>3</sup>

*Vinaza* = 2.4 m<sup>3</sup>

*Inóculo* = 1.3 m<sup>3</sup>

*Miel B* = 1.274 m<sup>3</sup>



*Figura 3. Montaje Biorreactor para fermentación alcohólica.*

Se realiza el montaje para fermentación alcohólica usando las 3 cepas seleccionadas y la cepa patrón por duplicado, durante 24 horas, en condiciones controladas de una temperatura de 30 °C, 150 rpm y un pH igual a 4.5. Se utilizó un volumen inicial de 6 L en un biorreactor con capacidad de 10 L

Para las réplicas realizadas en este montaje fue necesario adicionar antiespumante para facilitar la toma de muestra cada dos horas.

Los análisis realizados para determinar el grado alcohólico, azúcares fermentables y amino nitrógeno libre (AMNL) se realizan con la ayuda del laboratorio de fisicoquímica de la destilería del ingenio Providencia. Para la determinación de azúcares fermentables se utilizó el equipo HPLC de la marca Agilent usando una columna Hi Plex Ca<sup>++</sup>.

## 7 Resultados

### 7.1 Análisis fisicoquímico

*Tabla 5. Grado alcohólico 16 y 24 horas.*

Muestra	%OH inicial	%OH final (16 h)	%OH (24 h)	AMNL (mg/L)
Cepa patrón R1	*	9.8	11	208
Cepa patrón R2	*	9.3	11,1	183
Cepa 2 R1	*	1,5	NA	4
Cepa 2 R2	*	1,6	NA	381
Cepa 3 R1	*	7	8,7	234
Cepa 3 R2	*	7	7,7	197
Cepa 4 R1	*	9	10	66
Cepa 4 R2	*	9.1	9.8	78
Blanco	2	1,4	NA	350

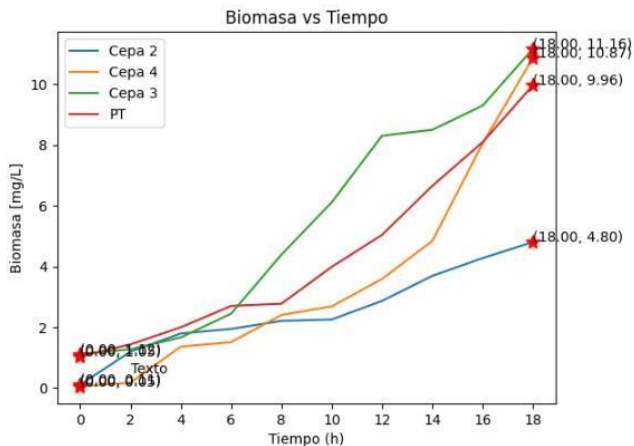
De acuerdo con la tabla 5, se puede observar que luego de 24 horas en el shaker, el grado alcohólico producido por la cepa patrón es sobresaliente en comparación a las demás, obteniendo un grado alcohólico de 9.8% a 9.3% durante 16 horas, al igual que la cepa 4, con un grado

alcohólico de 9 % y 9.1%. También, se puede ver que la cepa 3 alcanza 7% de grado alcohólico y tiene un potencial para seguir explorando. Es notable que la cepa 4 puede igualar la producción de alcohol a escala laboratorio. Es importante mencionar que la vinaza utilizada para el medio de fermentación contenía un grado alcohólico de 1.4%

A continuación, se realiza el montaje para evaluación de la cinética de crecimiento para las 3 cepas seleccionadas y la cepa patrón (PT) por duplicado, durante 16 horas.

## 7.2 Producción de biomasa

La producción de biomasa en el tiempo indica que la levadura PT produjo mayor biomasa con un valor de 11.16 mg/L, la cepa 4 alcanzó un valor de 10.87 mg/L y las demás se encuentran por debajo de 10 mg/L. la cepa tomada como patrón empieza a mostrar características mejores, esto se puede atribuir a que se trata de una cepa comercial específicamente hecha para la producción de etanol.



**Gráfica 1.** Cinética de crecimiento Biomasa (g/L) vs Tiempo(h).

## 7.3 Azúcares fermentables

Los azúcares fermentables son carbohidratos que pueden ser descompuestos y metabolizados por microorganismos como las levaduras, el consumo de azúcar fermentable se puede ver afectado por la concentración de azúcar, la temperatura, el pH, o la ausencia de otros nutrientes como el magnesio, zinc, y urea como fuente de nitrógeno (Spencer, 1981)



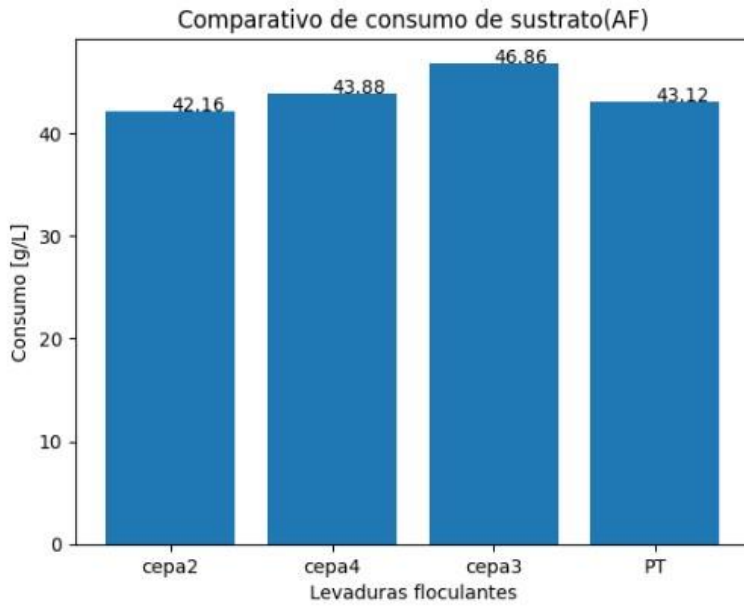
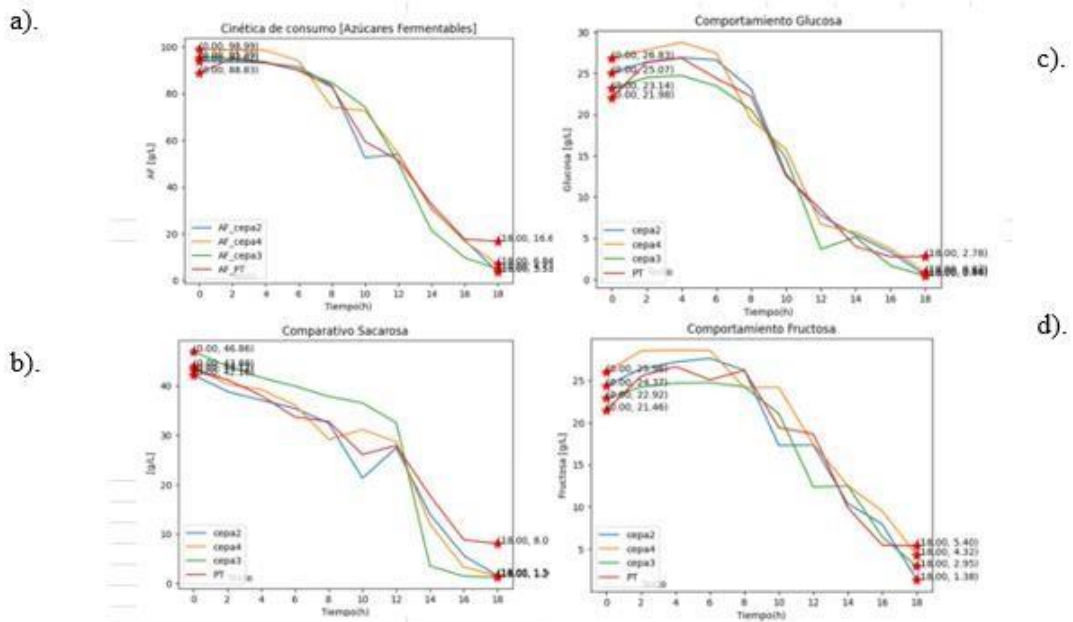


Figura 4. Consumo de [AF] (g/L) vs tiempo (h).

En la figura 4 se observa que la cepa PT alcanza un valor de 43.12 (g/L) de azúcares fermentables y la cepa 4 alcanza 43.88 (g/L), por tal motivo, la cepa 4 presenta las características más similares a la levadura PT, con un consumo de [AF] entre 43.1 (g/L) y 43.9 (g/L)



**Figura 5.** a.) Consumo de [AF] (g/L) vs tiempo (h). b.) Consumo de sacarosa para cada levadura. c.) Consumo de glucosa para cada levadura. d.) Consumo de fructosa para cada levadura

En la figura 5, se observa el resumen del consumo de azúcares fermentables [AF] (g/L) en el tiempo, en la parte a.), se evidencia que la cepa PT, deja más azúcares disponibles en el medio con 16.6 (g/L), en las demás imágenes se nota que todas las cepas evaluadas consumen más glucosa que fructosa o sacarosa, lo cual se puede describir por la siguiente ecuación propuesta por el científico Gay-Lussac:

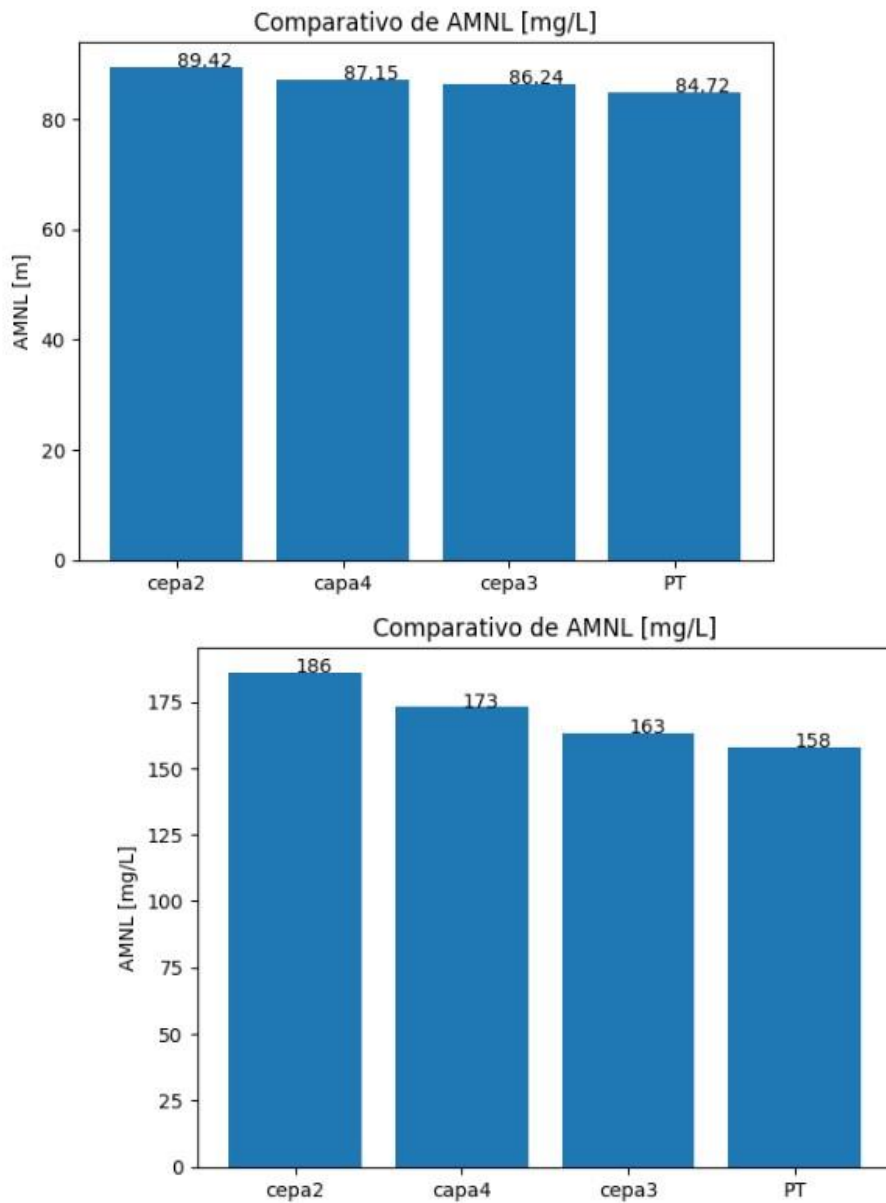
*Ecuación 1:*



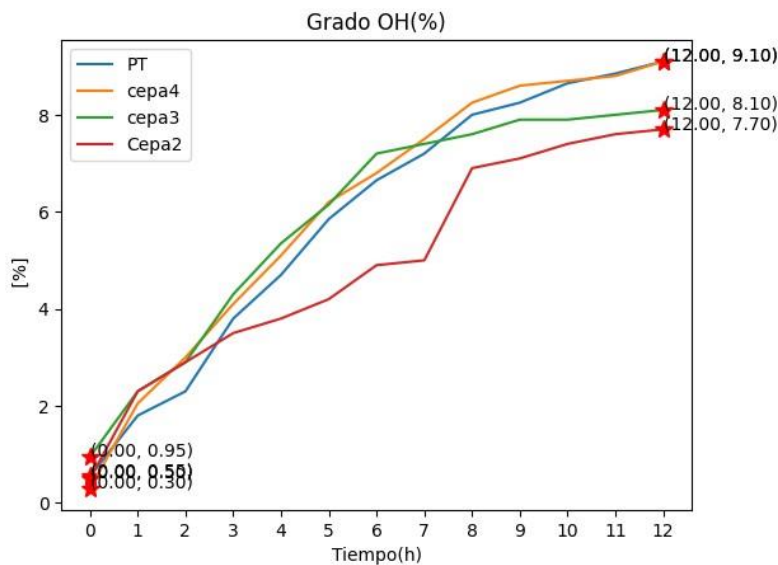
La ecuación 1, muestra que el consumo de glucosa produce partes iguales de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y etanol, que se utilizan para el metabolismo celular de la levadura y que una parte se pierde en forma de calor, lo que esta ecuación no tiene en cuenta es que una parte de la glucosa se utiliza para el crecimiento o reproducción de la levadura y que se producen otros metabolitos como glicerol, ácido láctico y succínico entre otros. (Russell, 2003)

#### **7.4 Consumo de AMNL (mg/L)**

A partir de la información obtenida, se establecen los consumos de AMNL (mg/L) en cada una de las levaduras. De acuerdo con los experimentos se identificó que la levadura patrón consume un 84.72% de la fuente de nitrógeno disponible y la cepa 4 un 87.15%, por tanto, se puede concluir que la diferencia de consumo es 2.43% (ver grafica 7).



**Figura 6.** Comparativo de AMNL (mg/L) y (%).



**Gráfica 2.** Producción de alcohol montaje a escala biorreactor.

Respecto al montaje experimental a escala laboratorio, en el que se puso a prueba 3 de las levaduras, la producción de alcohol de la cepa 4 a pesar de estar en un medio con exceso de azúcares, logró el porcentaje de alcohol propuesto en el tiempo estimado, esto demuestra una capacidad adicional de esta cepa para soportar ambientes más concentrados con más fuente de carbono que las otras cepas evaluadas.

Además, se realiza la evaluación de la producción de alcohol y se determina que la cepa 3 y 4, alcanzan similitud en el grado alcohólico producido (ver gráfica 2), el porcentaje de alcohol de la cepa 2 es el más bajo con valores de 7.9% de grado alcohólico. La cepa 4 alcanzó un grado alcohólico similar a la cepa patrón con un valor de 9.1. Por lo anterior, se puede deducir que el proceso de producción de alcohol podría tener como alternativas la cepa 3 y 4, ya que alcanzan el grado alcohólico propuesto en 24 horas al igual que la cepa PT.

La levadura con menor producción de alcohol en el montaje a escala laboratorio solo se le realizaron dos diluciones para el control de calidad, ya que se determinó que su consumo de azúcares fermentables es mínimo, por esta razón, no se tuvo en cuenta para los siguientes montajes experimentales.

De acuerdo con la tabla 5, se puede observar que luego de 24 horas en el shaker, el grado alcohólico producido por la cepa patrón es sobresaliente en comparación a las demás, obteniendo un grado alcohólico de 11% a 11.1%. Así, las cepas PT y 4 son las más promisorias para producción

de alcohol. Es importante mencionar que la vinaza utilizada para el medio de fermentación contenía un grado alcohólico de 1.4%

Los objetivos de la investigación fueron alcanzados, concluyendo con buenos resultados respecto a la búsqueda de una nueva cepa con características favorables para el tipo de bioproceso que se buscaba optimizar, adicionalmente, las cepas identificadas como promisorias (cepa 3 y 4) con mejores resultados fueron crioconservadas, y se encuentran disponibles en el cepario y banco de trabajo para investigaciones posteriores. Es importante resaltar que a cada cepa evaluada en este proyecto se le realizó una ficha técnica en donde se indican las concentraciones adecuadas de nutrientes, sus rangos de producción de alcohol, rango de resistencia a temperaturas mayores a 30°C, entre otros aspectos relevantes para el momento de seleccionarlas para procesos específicos.

**Tabla 6.** ANOVA. Análisis de varianza para cada variable

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Biomasa (g/L)					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	P-value
Bio Cepa 2	10	138,04	13,80	41,95	0,35
Bio Cepa 3	10	185,06	18,51	304,60	
Bio Cepa 4	10	247,53	24,75	353,22	
Bio PT	10	239,80	23,98	227,61	
Alcohol (%)					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	P-value
OH Cepa 2	10	17,84	1,78	3,17	0,99
OH Cepa 3	10	19,35	1,94	2,93	
OH Cepa 4	10	20,125	2,01	3,18	
OH PT	10	18,85	1,89	2,94	
AMNL (mesg/L)					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	P-value
AMNL Cepa 2	10	1138,02	113,80	6240,87	0,96
AMNL Cepa 3	10	1000,59	100,06	5538,36	
AMNL Cepa 4	10	987,22	98,72	4751,51	
AMNL PT	10	1014,65	101,46	4419,46	
AF(mg/L)					

---

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>	<i>P-value</i>
AF Cepa 2	10	613,17	61,32	1207,02	0,99
AF Cepa 3	10	645,82	64,58	1265,99	
AF Cepa 4	10	594,35	59,44	1287,30	
AF PT	10	627,91	62,79	965,74	

De acuerdo con los conceptos del análisis de varianza, en el que se explica que cuando la variable P, es menor a .0.04, va a existir diferencia significativa entre los resultados de cada cepa en cada variable, es decir, en este caso, todas las levaduras nativas evaluadas no presentaron diferencia significativa en los aspectos evaluados frente a la cepa patrón, esto se puede afirmar con base en las ANOVAS realizadas para cada variable. Sin embargo, la levadura con mayor producción de biomasa fue la cepa 4 con 55,8 [g] o 25,7 [g/L]. La levadura con mayor producción de OH fue cepa 4 con 9.1%.

---

## 8 Discusión

En este trabajo se evaluaron varias cepas de un clúster de levaduras del Ingenio Providencia, en el cual, se tenía como objetivo principal identificar la mejor cepa para la producción de alcohol, para esto, se usa inicialmente un montaje a escala laboratorio para conocer el % de alcohol producido y posteriormente un montaje usando un biorreactor Eppendorf BioFlo 120 de 10 L, del cual, solo se usó el 70% de su capacidad para simular las condiciones reales en los fermentadores de la planta de destilación de alcohol.

Una de las 4 levaduras evaluadas, denominada cepa 4, logra el mismo porcentaje de alcohol que la cepa PT, alcanzando un valor de 9.1% en el montaje a escala biorreactor en donde se tomaron muestras durante 24 horas, a una temperatura de 30°C, 150 rpm y pH entre 4.6 y 4.1, de esto se pudo inferir, que esta cepa tiene similitudes en su metabolismo, sin embargo, esta hipótesis solo se puede aclarar realizando una identificación de forma molecular y fisicoquímica a la colonia original de esta cepa ( cepa 4).

En la investigación realizada por (Tuárez, 2020) analizan la capacidad de las levaduras para producir alcohol a diferentes temperaturas 27, 30 y 33°C, y determinan que la mejor temperatura es de 30°C, la cual, es la temperatura recomendada para optimizar las condiciones de fermentación y asegurar la supervivencia de la levadura sin generar condiciones de estrés y por esta razón desviar su ruta metabólica y obtener productos no deseados. (Russell, 2003)

En este montaje experimental no se controló el pH, solo se midió. La cepa 4 alcanzó el mismo porcentaje de alcohol que la cepa PT en el montaje experimental a escala biorreactor, en el cual, se utilizó partes iguales de vinaza, miel B y agua de proceso en el medio de fermentación, las cepas 2 y 3 tienen potencial para producción de alcohol, pero no cuentan con las características necesarias para producir alcohol a escala industrial, teniendo en cuenta que en el proceso de destilación de alcohol en el ingenio se espera obtener la mayor cantidad de alcohol posible a una concentración final del 10%. En esta parte del proceso se obtiene la vinaza como subproducto, la cual es altamente contaminante por su índice de acidez para los suelos y efluentes en Colombia (Ospina, 2022), por

esta razón, se debe recircular un porcentaje de vinaza al proceso fermentativo. Por lo descrito anteriormente, se conoce la razón por la que se realiza un montaje a escala biorreactor en el que se estresa la levadura desde el primer momento de la fermentación anaerobia con vinaza para conocer sus características fisicoquímicas y de fermentación.

Para alcanzar el pH de 4.5 inicial en el medio de fermentación se adicionó ácido sulfúrico, en cambio, para el medio con miel B, se agregó ácido fosfórico.

Es importante mencionar que el montaje de fermentación alcohólica se realiza con la misma miel B convencional y vinaza para todos los montajes, éstas, fueron caracterizadas fisicoquímicamente para conocer su contenido.

Los análisis realizados prometen hallar una cepa de levadura diferente a la actualmente usada con características similares a esta, por tal motivo, la investigación realizada se podría complementar evaluando las producciones de alcohol (%) variando las concentraciones de la fuente de nitrógeno (Urea) y/o Magnesio (Mg) o el Zinc (Zn), los cuales, son factores de crecimiento cruciales para estimular la multiplicación de la levadura y garantizar un metabolismo fermentativo eficaz.

Finalmente, se tiene una levadura promisoriosa, con la que se puede continuar una amplia investigación para conocer sus características y su origen, y de esa manera variar el experimento propuesto, adicionando y variando concentraciones de nutrientes para plantear una ficha técnica en la que se describan los requerimientos necesarios y lograr optimizar en un mayor porcentaje la cepa PT o una levadura comercial.



## 9 Conclusiones

- Las levaduras evaluadas muestran un potencial para la producción de alcohol, alcanzando el valor estimado de grado alcohólico, sin embargo, la cepa considerada en el informe como patrón, es la que demuestra estar más estandarizada, ya que consume menos amino nitrógeno libre (AMNL) (mg/L) y requiere de una menor cantidad de [AF] (g/L).
- Se puede afirmar, que de las cepas evaluadas la mejor es la cepa 4, cumpliendo con la mayoría de las características necesarias, como soportar temperaturas altas y alcanzar el porcentaje de alcohol planteado por los balances.
- La cepa con menor producción de biomasa es la cepa 2, la cual, no muestra potencial en los demás aspectos evaluados.
- Las cepas evaluadas en el montaje en el biorreactor muestran tener buena capacidad para soportar condiciones estresantes como la presencia de la vinaza.
- Las levaduras seleccionadas como promisorias como la 3 y 4.

### **10. Recomendaciones**

Para próximos montajes se recomienda evaluar la levadura denominada cepa 4, en las condiciones reales de la planta, en el primer propagador de levadura y fermentador del proceso de destilación para identificar su viabilidad. Una segunda etapa es analizar el desempeño de esta al encontrarse mezclada con la vinaza. Es importante dirigirse a las fichas técnicas iniciadas de cada cepa aislada en donde se constata la cantidad necesaria de cada nutriente para cada alcanzar levadura para su rendimiento óptimo.

---

## Referencias

1. Adrián González Leos, J. A.-D.-C.-D. (2016). Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de la caña de azúcar. *Biotechnology Ciencias agropecuarias*, ISSN 2007-7521. 11(2): 80-92 (Ene - Jun 2017).
2. Alexis Gómez, L. A. (2018). MATERIAS PRIMAS USADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE CUATRO GENERACIONES: RETOS Y OPORTUNIDADES. Agrociencia, Instituto Politécnico Nacional- CEPROBI, Carretera Yautepec-Jojutla Km 6, Calle Ceprobi 8.
3. Alejandro Rincón Santamaría, J. A. (2018). Kinetics of Gluconacetobacter diazotrophicus Growth Using Cane Molasses and Sucrose: Assessment of Kinetic Models. <http://dx.doi.org/10.15446/abc>: Acta Biologica Colombiana, Universidad Nacional.
4. Álvaro Rincón, C. J. (2018). Respuesta agronómica de cuatro variedades de caña de azúcar en los llanos Orientales de Colombia. Meta, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
5. Asocaña. (2014). El Sector Azucarero Colombiano, una fuente de energía renovable para el país. *Bioetanol, energía limpia que mueve el país*, 2-10.
6. Chang, M. C. (2007). Harnessing energy from plant biomass. *Current Opinion in Chemical Biology*, 677-684.
7. Curia, M. O. (2011). La Enseñanza de Conceptos en Biotecnología a través de un Experimento Sencillo y Económico. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas Dr. J. J. Ronco, Centro Científico Tecnológico La Plata, CONICET. Calle 47 No.
8. Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy conversion and management*, 2738-2749.
9. Fernando Viana, C. B. (2011). Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*–*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production.

---

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), P.O. Box 73.

10. García Romel, A. P. (2015). Incorporating other substances as raw materials for fermented sugar in alcohol distilleries. Medellín: Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N. °75pp. 130-142, June, 2015.
11. Kok Tat Tan, K. T. (2008). Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. *Energy policy*, 33660-33665.
12. Lagos Elizabeth, E. C. (2019). Sugar cane and by-products of the sugar agro-industry in ruminant. Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.: *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, núm. 3, pp. 917-934.
13. Manginot, J. M. (1996). Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. Elsevier.
14. M.P. Sudhakar, R. M. (2016). Characterization, pretreatment and saccharification of spent seaweed biomass for bioethanol production using baker's yeast. *Biomass and Bioenergy*, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.031>.
15. Nana Baah Appiah-Nkansah, K. Z. (2015). Model study on extraction of fermentable sugars and nonstructural carbohydrate from sweet sorghum using diffusion process. *Industrial Crops and Products*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.056>.
16. Oliveira, L. A. (2018). Water management for sugarcane and corn under future climate scenarios in Brazil. *Agricultural Water Management.*, 201, 199–206. doi:10.1016/j.agwat.2018.01.019.
17. Peña, C. A. (2010). EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL UTILIZANDO CEPAS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR. Médico, PhD, Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB, jefe Unidad Biotecnología Vegetal.
18. Russell. (2003). Understanding yeast fundamentals. 93-105: The alcohol textbook.

19. SA., I. P. (2016). Ingenio Providencia procesos. Cali:  
[https://www.providenciaco.com/wpcontent/uploads/2016/05/Procesos\\_de\\_Ingenio\\_Providencia.pdf](https://www.providenciaco.com/wpcontent/uploads/2016/05/Procesos_de_Ingenio_Providencia.pdf).
20. Spencer, J. F. (1981). Yeast Technology.
21. Tuárez, M. A. (2020). Evaluación de levaduras en la producción de etanol a partir de melaza de caña de azúcar. revista Espamciencia para el agro.