

PRODUCTION OF ETHANOL BY *Saccharomyces cerevisiae* AND *Zymomonas mobilis* COIMMOBILIZED: PROPOSAL FOR THE USE OF ORGANIC WASTE

PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* COINMOVILIZADAS: PROPUESTA PARA EL USO DE DESECHOS ORGÁNICOS

Alejandro Ruiz-Marín¹, Yunuén Canedo-López¹, Asteria Narváez-García¹, J. Carlos Robles-Heredia¹

¹Laboratorio de biotecnología. Universidad Autónoma del Carmen, Facultad de Química. Calle 56. No.4. Avenida Concordia. Colonia Benito Juárez. Ciudad del Carmen, 24180. Campeche, México. (aruiz@pampano.unacar.mx).

ABSTRACT

Fermentation technologies were developed to improve the production of ethanol and an alternative is the immobilization technology, which offers advantages in comparison with free cells culture, such as the possibility of efficiently incorporating symbiotic bacteria in the same matrix. The aim of this study was to evaluate, in equivalent medium, the use of mango (*Mangifera indica*) waste to produce ethanol. The study compared the production of ethanol by using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in free cells culture, immobilized and coimmobilized in calcium alginate in a culture medium equivalent to mango juice. It also included an evaluation of the effect of glucose concentration on productivity in a coimmobilized system. The experimental design was triplicate cultures in a Chemostat reactor Ommi Culture Plus for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* in free cell culture, immobilized and coimmobilized. The results showed that in free cell culture, the productivity was higher for *Z. mobilis* (5.76 g L⁻¹ h⁻¹) than for *S. cerevisiae* (5.29 g L⁻¹ h⁻¹); in coimmobilized culture, a higher productivity was obtained (8.80 g L⁻¹ h⁻¹) with respect to *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* immobilized (8.45 g L⁻¹ h⁻¹ and 8.70 g L⁻¹ h⁻¹). The conversion of glucose to ethanol was higher (6.91 mol ethanol) for culture with 50 g L⁻¹ of glucose compared to 200 g L⁻¹ of glucose (5.82 mol ethanol). Productivity values were higher in immobilized and coimmobilized cultures than in those with free cells, and represent an opportunity for the reuse of organic residues to alcohol production.

Key words: *Mangifera indica*, immobilization, coimmobilization, ethanol, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

Las tecnologías de fermentación se desarrollaron para mejorar la producción de etanol y una alternativa es la tecnología de inmovilización, la cual ofrece ventajas sobre los cultivos de células libres, como la posibilidad de incorporar bacterias simbióticas de forma efectiva en la misma matriz. El objetivo de este estudio fue evaluar, en un medio equivalente, el uso del residuo de mango (*Mangifera indica*) para producir etanol. El estudio comparó la producción de etanol usando *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo de células libres, inmovilizadas y coinmovilizadas en alginato de calcio en un medio de cultivo equivalente al jugo de mango. También incluyó una evaluación del efecto de concentrado de glucosa en la productividad en un sistema coinmovilizado. El diseño experimental fue cultivos por triplicado en un reactor Chemostat Ommi Culture Plus para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* en cultivo de células libres, inmovilizadas y coinmovilizadas. Los resultados mostraron que en cultivo de célula libre, la productividad fue mayor para *Z. mobilis* (5.76 g L⁻¹ h⁻¹) que para *S. cerevisiae* (5.29 g L⁻¹ h⁻¹); en los cultivos coinmovilizados se obtuvo una productividad mayor (8.80 g L⁻¹ h⁻¹) con respecto a *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* inmovilizados (8.45 g L⁻¹ h⁻¹ y 8.70 g L⁻¹ h⁻¹). La conversión de glucosa a etanol fue mayor (6.91 mol etanol) para cultivo con 50 g L⁻¹ de glucosa comparado con 200 g L⁻¹ de glucosa (5.82 mol etanol). Los valores de productividad fueron mayores en cultivos inmovilizados y coinmovilizados que en los de células libres, y representan una oportunidad para reusar de residuos orgánicos para la producción de alcohol.

Palabras clave: *Mangifera indica*, inmovilización, coinmovilización, etanol, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2015. Aprobado: mayo, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 551-563. 2016.

INTRODUCTION

Researches were developed in order to increase the productivity of alcoholic fermentation processes. The productivity, expressed as grams of ethanol produced per hour per unit of fermentation volume, can be increased by optimizing the composition of the culture medium, the selection of an appropriate microorganism strain or through the adaptation of the design of reactors (Amin *et al.*, 1983). One challenge is to reduce ethanol production costs and an alternative is to low the cost of the culture media, which can represent about 30 % of the final production costs (Sivers *et al.*, 1994).

Some fermentation technologies were developed to improve the production of ethanol and the concentration in the culture media (Amin and Verachtert, 1982; Demirci *et al.*, 1997; Siripattanakul-Ratpukdi, 2012). Among these, the immobilization technology offers advantages in contrast to free cell cultures, such as increased retention time in bioreactors, high cellular metabolic activity, high cell load and protection of the cells (Tam *et al.*, 1994; Siripattanakul-Ratpukdi, 2012).

The immobilization cell technologies were applied for purposes as the production of hydrogen (Wu *et al.*, 2003) and compounds commercially used in the food industry (Kawaguti *et al.*, 2006). Some studies were developed with immobilized algal cells to remove nutrients (N and P) from wastewater; phenol and hexavalent chromium (Bandhyopadhyay *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Humphries *et al.*, 2005; Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Other studies for bio-ethanol production from waste materials used strains of *Zymomonas* and *Saccharomyces* (Amin and Verachtert, 1982; Amin *et al.*, 1983; Krishnan *et al.*, 2000; Vallejo-Becerra *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Siripattanakul-Ratpukdi, 2012).

The immobilization technology provides the possibility of efficiently symbiotic bacteria incorporation (Travieso *et al.*, 1996; De-Bashan *et al.*, 2002). The interaction between two microorganisms in the same matrix is called coimmobilization and this association can be positive with higher growth and production. However, there are less applications in the ethanol production involving the immobilization of mixed-culture systems and coimmobilized cultures.

INTRODUCCIÓN

Investigaciones se han realizado para aumentar la productividad de los procesos de fermentación alcohólica. La productividad, expresada como gramos de etanol producido por hora por unidad de volumen de fermentación, se puede aumentar con la optimización del medio de cultivo, la selección de una cepa adecuada de microorganismos o la adaptación del diseño de reactores (Amin *et al.*, 1983). Un desafío es reducir los costos de producción de etanol y una alternativa es bajar el costo del medio de cultivo, que puede ser cerca de 30 % de los costos finales de producción (Sivers *et al.*, 1994).

Algunas tecnologías de fermentación se desarrollaron para mejorar la producción de etanol y la concentración en el medio de cultivo (Amin y Verachtert, 1982; Demirci *et al.*, 1997; Siripattanakul-Ratpukdi, 2012). Entre ellas, la tecnología de inmovilización ofrece ventajas en contraste con los cultivos de células libres, como un tiempo mayor de retención en bioreactores, una actividad metabólica celular alta, una carga celular alta y la protección de las células (Tam *et al.*, 1994; Siripattanakul-Ratpukdi, 2012).

Las tecnologías de inmovilización celular se aplicaron para propósitos como la producción de hidrógeno (Wu *et al.*, 2003) y compuestos de uso comercial en la industria alimenticia (Kawaguti *et al.*, 2006). Algunos estudios se desarrollaron con células de algas inmovilizadas para extraer nutrientes (N y P) de aguas residuales; fenol y cromo hexavalente (Bandhyopadhyay *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Humphries *et al.*, 2005; Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Otros estudios para producir bio-etanol con materiales residuales usaron cepas de *Zymomonas* y *Saccharomyces* (Amin y Verachtert, 1982; Amin *et al.*, 1983; Krishnan *et al.*, 2000; Vallejo-Becerra *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Siripattanakul-Ratpukdi, 2012).

La tecnología de inmovilización da la posibilidad de incorporar bacterias, eficientemente simbióticas, (Travieso *et al.*, 1996; De-Bashan *et al.*, 2002). La interacción entre dos microorganismos en la misma matriz se llama coinmovilización y esta asociación puede ser positiva con mayor crecimiento y producción. Sin embargo, hay menos aplicaciones en la producción de etanol que involucran la inmovilización de sistemas de cultivos mixtos y cultivos coinmovilizados.

In a petroleum deficiency situation, bio-ethanol from yeast and bacterial fermentation has become a promising alternative source for fuel. Agricultural and industrial waste containing sugar, starch, and cellulose, such as cassava peels, fruit bunches, and the effluents from sugar and pineapple cannery productions were successfully applied for the bio-ethanol production (Nigan 2000; Kassim *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2012; Colognesi *et al.*, 2015). According to Liu *et al.*, (2010), high concentration studies showed ethanol production, from corn cob residues of 57.2 g L⁻¹ during 141.5 h fermentation, and ethanol yield of 26.1 and 85.2 % conversion of substrate.

The municipality of Ciudad del Carmen, Campeche, Mexico, has an annual production of 2868 ha mango (*Mangifera indica*). The lack of local market and the poor fruit distribution to other locations causes the product becomes a waste, with significant losses. Hence the need to seek alternatives to use these wastes and generate added value in the economy of the region.

The aim of this study was to determine whether the association between *S. cerevisiae* coimmobilized with *Z. mobilis* improves growth and ethanol production, and to create an opportunity for using a regional fruit (*M. indica*) for ethanol production. In this study, both microorganisms were confined in small alginate beads, a practical means of using microorganisms for environmental applications.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and medium

The yeast strain *S. cerevisiae* (ATCC[®] 2601) and bacteria *Z. mobilis* (ATCC[®] 8938) were obtained from the laboratory Microbiologis[®] and used for fermentation in coimmobilized and immobilized systems. Both microorganisms were cultured in a medium (g L⁻¹), as described by Demirci *et al.* (1997): 20 g glucose, 6 g yeast extract, 0.23 g CaCl₂•2H₂O, 4g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄•7H₂O, and 1.5 g KH₂PO₄, autoclaved. Strains were maintained in 250 mL of culture at 30 °C and pH 4.5 with manual shaking three times every day. Transfers of fresh medium were made every 24 h for 3 consecutive d prior to use in experiments. The selected culture medium allows favorable growth for both microorganisms, similar to the reported for the culture medium described by Ramasamy and Paramasamy, (2001) for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis*, allowing adjustment of total sugars content (20 %) relative to the mango juice.

En una situación de deficiencia de petróleo, el bio-etanol de levadura y fermentación bacteriana es una fuente alternativa prometedora de combustible. Los residuos agrícolas e industriales que contienen azúcar, almidón y celulosa, tal como cáscaras de yuca, racimos de frutas y residuos líquidos de la producción de azúcar y piña enlatada, se usaron con éxito para producir etanol (Nigan 2000; Kassim *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2012; Colognesi *et al.*, 2015). Según Liu *et al.* (2010), estudios de concentración alta mostraron una producción de etanol, desde residuos de olote (coronta), de 57.2 g L⁻¹ durante 141.5 h de fermentación, con un rendimiento de etanol de 26.1 y 85.2 % conversión de sustrato.

El municipio de Ciudad del Carmen, Campeche, México, tiene una producción anual de 2868 ha de mango (*Mangifera indica*). La falta de un mercado local y la deficiente distribución de frutas a otros lugares hace que el producto se desperdicie, con pérdidas significativas. Por ello se debe buscar alternativas para usar estos residuos y generar un valor agregado en la economía de la región.

El objetivo de este estudio fue determinar si la relación entre *S. cerevisiae* coinmovilizada con *Z. mobilis* mejora el crecimiento y la producción de etanol, y crear una oportunidad para usar una fruta regional (*M. indica*) para producir etanol. En este estudio, ambos microorganismos estaban confinados en pequeñas esferas de alginato, una forma práctica de usar microorganismos para aplicaciones ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medio

La cepa de levadura *S. cerevisiae* (ATCC[®] 2601) y la bacteria *Z. mobilis* (ATCC[®] 8938) se obtuvieron del laboratorio Microbiologis[®] y usaron para la fermentación en sistemas coinmovilizados e inmovilizados. Ambos microorganismos se cultivaron en un medio (g L⁻¹), según lo descrito por Demirci *et al.* (1997): 20 g glucosa, 6 g extracto de levadura, 0.23 g CaCl₂•2H₂O, 4g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄•7H₂O, y 1.5 g KH₂PO₄, esterilizado en autoclave. Las cepas se mantuvieron en 250 mL de cultivo a 30 °C, pH 4.5, y agitadas a mano tres veces al día. Las transferencias de medio fresco se realizaron cada 24 h por 3 d previo al uso en experimentos. El medio de cultivo seleccionado permite crecimiento favorable para ambos microorganismos, similar a lo reportado para el medio de cultivo (Ramasamy y Paramasamy, 2001) para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*, y permite el ajuste de contenido de azúcares totales (20 %) respecto al jugo de mango.

Preparation of immobilized and coimmobilized cells

For the preparation of immobilized cells we used the technique described by Tam and Wong (2000). Both microorganisms were harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. The bacteria and yeast cells were resuspended in 50 mL of distilled water to get a concentrated cell suspension. The suspension was then mixed with a 4 % sodium alginate solution (1:1 v:v) to obtain a mixture of 2 % microorganism–alginate suspension. The mixture was transferred to a 50 mL burette and drops were formed when titrated into a calcium chloride solution (2 %). This method produced approximately 6500 uniform alginate beads of 2.5 mm in diameter with biomass content for *Z. mobilis*-alginate beads of 0.0055 g per bead, and for *S. cerevisiae* of 0.00317 g per bead for every 100 mL of the microorganism–alginate mixture. The beads were kept for hardening in the CaCl_2 solution for 4 h at 25 ± 2 °C; then rinsed with sterile saline solution (0.85 % NaCl) and subsequently with distilled water. A concentration of 2.6 beads mL^{-1} of medium (equivalent to 1:25 bead: medium v/v) were placed in a Chemostat Omni Culture Plus (Virtis) containing 2 L of culture medium. The reactor was maintained at 120 rpm and 30 °C.

A similar procedure was used for coimmobilization. The difference was that the concentrate of bacteria (25 mL) and yeast (25 mL) was mixed first, and afterwards mixed with 50 mL of alginate. This procedure allowed retaining the same concentration of cells in all experiments.

Experimental setup and procedure

This study evaluated growth in cultures with free cells, immobilized and coimmobilized, as well as ethanol production. It also evaluated the effect of glucose concentration (50-100 g L^{-1}) in the production of ethanol in the system selected in the first experiment, based on the ethanol productivity. A low concentration of substrate was used in order to prevent the inhibition effect of substrate and products.

Fermentation was carried out in a Chemostat Omni Culture Plus (Virtis) with a volume of 2 L operation, adjusting stirring at 120 rpm and at 30 °C. The medium was similar to that described by Demirci *et al.* (1997), by adjusting the composition to a concentration of 200 g L^{-1} glucose (20 % total sugars and 4.5 % reducing sugars), equivalent to that observed in the mango juice.

The experimental design consisted of triplicate cultures in a Chemostat reactor Omni Culture Plus for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* in free cell culture, immobilized and coimmobilized. For each experiment, the biomass was collected, as well as samples of the culture medium to the end of the logarithmic phase every 20 h.

For determination of ash-free dry weights, five beads were dissolved in 5 mL of 0.25 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution (pH 7.0)

Preparación de células inmovilizadas y coimmobilizadas

Para preparar de células inmovilizadas se usó la técnica descrita por Tam y Wong (2000). Ambos microorganismos se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm por 10 min. Las bacterias y células de levadura se resuspendieron en 50 mL de agua destilada para obtener una suspensión celular concentrada. La suspensión se mezcló con una solución de alginato de sodio al 4 % (1:1 v:v) para obtener una mezcla de suspensión de 2 % microorganismos–alginato. La mezcla se transfirió a una bureta (50 mL) y se formaron gotas cuando se tituló a una solución de cloruro de calcio (2 %). Este método produjo unas 6500 esferas de alginato de 2.5 mm de diámetro con un contenido de biomasa para las esferas de *Z. mobilis*-alginato de 0.0055 g y para *S. cerevisiae*, de 0.00317 g por esfera por cada 100 mL de la mezcla microorganismo–alginato. Las esferas se mantuvieron 4 h en la solución de CaCl_2 a 25 ± 2 °C; para que se endurecieran, se enjuagaron con una solución salina estéril (0.85 % NaCl) y después con agua destilada. Una concentración de 2.6 esferas mL^{-1} de medio (equivalente a 1:25 esfera: medio v/v) se colocó en un Chemostat Omni Culture Plus (Virtis) con 2 L de medio de cultivo. El reactor se mantuvo a 120 rpm y 30 °C.

Un procedimiento similar se usó para la coimmobilización. La diferencia fue que el concentrado de bacterias (25 mL) y levadura (25 mL) se mezcló primero, y luego se mezcló con 50 mL de alginato. Este procedimiento permitió retener la misma concentración de células en todos los experimentos.

Diseño experimental y procedimiento

En este estudio se evaluó el crecimiento en cultivos con células libres, inmovilizadas y coimmobilizadas, así como y la producción de etanol. También se evaluó el efecto de la concentración (50-100 g L^{-1}) en la producción de etanol en el sistema elegido en el primer experimento, con base en la productividad de etanol. Una concentración baja de sustrato se usó para prevenir el efecto inhibitorio del sustrato y los productos.

La fermentación se realizó en un Chemostat Omni Culture Plus (Virtis) con un volumen de operación de 2 L, ajustando la agitación a 120 rpm y 30 °C. El medio fue similar al descrito por Demirci *et al.* (1997), ajustando la composición a una concentración de 200 g L^{-1} glucosa (20 % azúcares totales y 4.5 % azúcares reductoras), equivalente al observado en el jugo de mango.

El diseño experimental consistió de cultivos triplicados en un reactor Chemostat Omni Culture Plus para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* en un cultivo de células libres, inmovilizadas y coimmobilizadas. Para cada experimento se recolectó la biomasa, así como muestras del medio de cultivo al final de cada fase logarítmica cada 20 h.

in triplicate and filtered through a GF-C glass fiber filter (2.5 cm diameter), previously rinsed with distilled water, and incinerated at 470 °C for 4 h. The samples were dried at 120 °C and put to constant weight for 2 h in a conventional oven and then in a muffle furnace at 450 °C for 3 h. The soluble solids of each fermenting medium was determined every 20 h by taking 1 mL aliquot from each reactor and testing for the °Brix level in a refractometer.

Ethanol content (% v:v) was obtained using the Anton Paar DMA 4100M instrument, which determines the density of the mixture in relation to the standard OIML-STD-90, which can determine the content of distillate ethanol (v:v, %). According to the ethanol density recorded, it was possible to obtain the ethanol content (g of ethanol per L of culture) produced for each experiment. Prior to the determination of the ethanol content, a distillation of cultures was carried out with a plate column distiller PS-DA-005/PE of four plates, at small-scale. The cooling water flow was 3 L h⁻¹ at 15 °C. An aliquot of 3 L was distilled for 4 h, maintaining the operating conditions at atmospheric pressure, without reflux and with a temperature ramp in the heating jacket of 30 °C up to 80 °C.

Statistical analysis

STATISTICA 7.0 software was used for statistical analysis, and the mean and standard deviation for each treatment were calculated. The covariance analysis (ANCOVA) was used ($p \leq 0.05$) to evaluate the grown in free cell cultures, immobilized and coimmobilized; besides, the Tukey test ($p \leq 0.05$) was utilized.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth

In free cell cultures, the growth was observed immediately after being inoculated in the reactor of 2 L. Growth kinetics shows an exponential phase for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* of 120 h. After this period of cultivation, both species showed a decline in the production of biomass, finalizing treatment after 200 h of culture. The maximum values of biomass concentration were 14.18 g L⁻¹ and 11.80 g L⁻¹ dry weight for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis*, respectively. Both microorganisms grew satisfactorily under the culture conditions used in this study (Figure 1A), with a higher specific growth rate (μ) for *S. cerevisiae* (0.0547 d⁻¹) than *Z. mobilis* (0.0418 d⁻¹). Specific growth rates in free cell cultures for both microorganisms were not different ($p > 0.05$).

Para determinar los pesos libres de ceniza, cinco esferas se disolvieron en 5 mL de solución de 0.25 M de Na₂HPO₄·7H₂O (pH 7.0) por triplicado y filtradas con un filtro GF-C de fibra de vidrio (2.5 cm de diámetro), enjuagado con agua destilada e incinerada a 470 °C por 4 h. Las muestras se secaron a 120 °C y se dejaron 2 h a un peso constante en un horno convencional, luego en un horno de mufla 3 h a 450 °C. Los sólidos solubles de cada medio de fermentación se determinaron cada 20 h tomando 1 mL de alícuota de cada reactor y probando el nivel de °Brix en un refractómetro.

El contenido de etanol (% v:v) se obtuvo usando el instrumento Anton Paar DMA 4100M, que determina la densidad de la mezcla en relación al estándar OIML-STD-90, que puede determinar el contenido de etanol destilado (v:v, %). Según la densidad de etanol registrada, se pudo obtener el contenido de etanol (g de etanol por L de cultivo) producido por cada experimento. Antes de determinar el contenido de etanol, se realizó una destilación de cultivos con un destilador de columnas de platos PS-DA-005/PE de cuatro platos, a pequeña escala. El flujo de agua para enfriamiento fue 3 L h⁻¹ a 15 °C. Una alícuota de 3 L se destiló 4 h, manteniendo las condiciones de operación a presión atmosférica, sin reflujo y con una rampa de temperatura en el chaqueta de calentamiento de 30 °C hasta 80 °C.

Análisis estadístico

STATISTICA 7.0 se usó para el análisis estadístico, y se calculó el promedio y la desviación estándar para cada tratamiento. El análisis de covarianza (ANCOVA) se usó ($p \leq 0.05$) para evaluar el crecimiento en los cultivos de células libres, inmovilizadas y coinmovilizadas; además se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento

En cultivos de células libres, el crecimiento se observó de inmediato después de la inoculación en el reactor de 2 L. La cinética del crecimiento muestra una fase exponencial para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* de 120 h. Luego de este período de cultivo, ambas especies mostraron una reducción en la producción de biomasa, finalizando el tratamiento después de 200 h de cultivo. Los valores máximos de concentración de biomasa peso seco fueron de 14.18 g L⁻¹ y 11.80 g L⁻¹ para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*, respectivamente. Ambos microorganismos crecieron de manera satisfactoria bajo las condiciones de cultivo usadas en este estudio (Figura 1A), con una tasa de crecimiento específico (μ) mayor para *S. cerevisiae* (0.0547 d⁻¹) que para *Z. mobilis* (0.0418 d⁻¹). Las

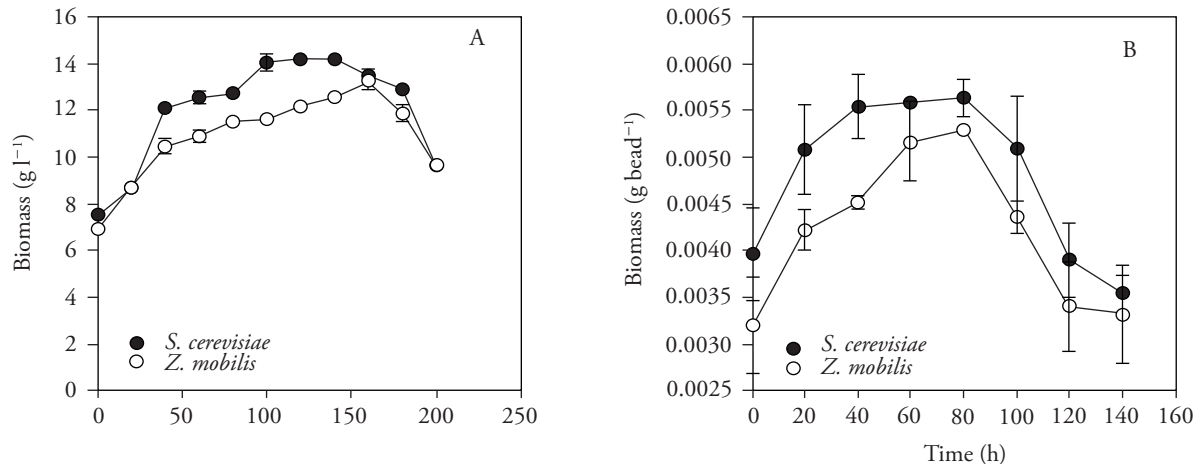


Figure 1. Average increase of biomass for *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* in free culture (A) and immobilized cells (B).

Figura 1. Incremento promedio de biomasa para *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* en cultivo de células libres (A) e inmovilizadas (B).

For immobilized cells, both yeast and bacteria presented immediate growth after adding the beads to the culture medium. In both treatments the exponential phase of growth reached a maximum of 80 h. Although both microorganisms were immobilized under the same procedure, the content of biomass per bead at the beginning of treatment was lower for *Z. mobilis* (0.0031 g) than *S. cerevisiae* (0.0039 g). Despite these differences, both microorganisms tolerated immobilization (Figure 1B), reaching maximum biomass content values of 0.0055 and 0.0047 g per bead for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis*; this showed a similar specific growth rate (0.142 d⁻¹) as *S. cerevisiae* (0.106 d⁻¹).

Glucose-substrate removal

The decrease of substrate showed significant differences (Tukey test; $p \leq 0.0001$) between treatments with free and immobilized cells for both species (Table 1). However, the two species in free culture were not different ($p > 0.05$) in 200 h of treatment. For the immobilized and coimmobilized cell cultures, only the immobilized *Z. mobilis* showed no significant differences ($p = 0.245$) during removal of the substrate with the coimmobilized system during 140 h of culture (Table 1).

The consumed substrate was greater in free culture for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* from 200 g L⁻¹ to 80 g

tasas de crecimiento específicas en cultivos de células libres para ambos microorganismos no fueron diferentes ($p > 0.05$).

Para las células inmovilizadas, tanto la levadura como las bacterias presentaron crecimiento inmediato después de agregar las esferas al medio de cultivo. En ambos tratamientos la fase exponencial de crecimiento alcanzó un máximo de 80 h. Aunque ambos microorganismos fueron inmovilizados con el mismo procedimiento, el contenido de biomasa por esfera al principio del tratamiento fue más bajo para *Z. mobilis* (0.0031 g) que *S. cerevisiae* (0.0039 g). A pesar de estas diferencias, ambos microorganismos toleraron la inmovilización (Figura 1B), con valores máximos de contenido de biomasa de 0.0055 y 0.0047 g por esfera para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*; esto mostró una tasa de crecimiento específico similar (0.142 d⁻¹) al igual que *S. cerevisiae* (0.106 d⁻¹).

Extracción de sustrato de glucosa

La reducción del sustrato presentó diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre tratamientos con células libres e inmovilizadas para ambas especies (Cuadro 1). Sin embargo, las dos especies en cultivo libre no fueron diferentes (prueba de Tukey; $p > 0.05$) en 200 h de tratamiento. Para los cultivos inmovilizados y coimmobilizados, sólo *Z. mobilis* inmovilizada no mostró diferencias significativas ($p = 0.245$) durante

Table 1. Uptake rate, productivity (Y) and ethanol mole produced per glucose mole for *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* in free culture, immobilized and coimmobilized.
Cuadro 1. Tasa de remoción, productividad (Y) y mole de etanol producido por mole de glucosa para *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* en cultivo libre, inmovilizado y coinmovilizado.

Culture	Cells	Ethanol formed (% v/v)	Y (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Glucose consumed (g L ⁻¹)	Uptake rate (g substrate removed / g biomass day)	moles Eth / mole Glc
Free cells	<i>S. cerevisiae</i>	80.6	5.29 ^a	90 ^a	2.71 ^a	2.76
	<i>Z. mobilis</i>	87.7	5.76 ^a	80 ^a	2.0 ^a	3.38
Immobilized cells	<i>S. cerevisiae</i>	86.0	8.45 ^b	60 ^b	0.165 ^b	4.42
	<i>Z. mobilis</i>	87.7	8.70 ^b	43 ^b	0.056 ^b	6.29
Coimmobilized cells	<i>Z. mobilis</i> & <i>S. cerevisiae</i>	88.7	8.80 ^c	47 ^c	0.235 ^c	5.82

*Means with different letters are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Promedios con letras diferentes son diferentes estadísticamente (Tukey; $p \leq 0.05$).

L⁻¹ (60 % removal) after the 200 h treatment period (Table 1), compared to the immobilized system with 40 % removal for *S. cerevisiae* (120 to 200 g L⁻¹) and 30 % removal for *Z. mobilis* (140 to 200 g L⁻¹). In those cultures of coimmobilized cells consumption ranged from 130 to 200 g L⁻¹ (35 % removal) (Table 1).

The average consumption analysis, based on removal rates determined during the exponential growth for both species, showed that free culture *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* reached removal rates of 2.0 and 2.7 g substrate g⁻¹ biomass d⁻¹. This suggested greater productivity for the bacteria (5.76 g h⁻¹) than yeast (5.29 g h⁻¹) (Table 1).

In cultures with immobilized cells, the removal rate in the exponential phase (80 h) was greater for *S. cerevisiae* (0.165 g substrate g⁻¹ biomass d⁻¹) than *Z. mobilis* (0.056 g substrate g⁻¹ biomass d⁻¹), but in coimmobilized culture it was greater (0.235 g substrate g⁻¹ biomass d⁻¹) since both species contributed to reducing glucose and increasing the removal rate. Similar results were observed in the productivity, where the coimmobilized cell culture showed higher values (8.80 g L⁻¹ h⁻¹) than the immobilized cells of *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* (Table 1). The highest productivity levels were recorded in

la extracción del sustrato con el sistema coinmovilizado durante 140 h de cultivo (Cuadro 1).

El sustrato consumido fue mayor en el cultivo libre para *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* de 200 g L⁻¹ a 80 g L⁻¹ (60 % remoción) después del período de tratamiento de 200 h (Tabla 1), en comparación con el sistema inmovilizado con remoción del 40 % para *S. cerevisiae* (120 a 200 g L⁻¹) y 30 % de sustrato removido para *Z. mobilis* (140 a 200 g L⁻¹). En los cultivos de células coinmovilizadas, el consumo varió de 130 a 200 g L⁻¹ (35 % remoción) (Cuadro 1).

El análisis del consumo promedio basado en tasas de remoción determinadas durante el crecimiento exponencial para ambas especies mostró que el cultivo libre *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* alcanzó tasas de remoción de 2.0 y 2.7 g sustrato g⁻¹ biomasa d⁻¹. Esto sugirió una mayor productividad para las bacterias (5.76 g h⁻¹) que la levadura (5.29 g h⁻¹) (Cuadro 1).

En cultivos con células inmovilizadas, la tasa de remoción en la fase exponencial (80 h) fue mayor para *S. cerevisiae* (0.165 g sustrato g⁻¹ biomasa d⁻¹) que para *Z. mobilis* (0.056 g sustrato g⁻¹ biomasa d⁻¹), pero en el cultivo coinmovilizado fue mayor (0.235 g sustrato g⁻¹ biomasa d⁻¹), ya que ambas especies contribuyeron a reducir la glucosa y a aumentar la tasa de remoción. En la productividad los resultados

coimmobilized and immobilized cultures because the shorter ethanol production time (80 h) than free cultures (120 h).

Effect of initial concentration of glucose on ethanol production

For the coimmobilized of *Z. mobilis* and *S. cerevisiae* within alginate beads there was an immediate increase in biomass concentration. Although the biomass concentration for both treatment showed significant differences ($p \leq 0.002$), the results suggest that both concentration of substrate allowed favorable bacteria and yeast growth (Figure 2). The maximum biomass concentration in the treatment of glucose to 50 g L^{-1} (Gl_{50}) was obtained in the first 100 h of culture with 0.0063 g per beads; whereas for the treatment of 200 g L^{-1} glucose (Gl_{200}) was 0.053 g per beads during 80 h (Figure 2).

The alcohol produced (% v:v) had no significant differences ($p > 0.05$) with respect to glucose concentration. However, uptake rates exhibit a decline as the glucose content in the reactor decreases (Table 2). The highest uptake rate occurred at a concentration of 200 g L^{-1} glucose with a 76.5 % removal, compared to 50 g L^{-1} glucose. Although the production of alcohol was similar in both treatments, the ratio mol-ethanol produced per consumed mol-glucose was higher in cultures of 50 g L^{-1} glucose with a value of 6.91, in comparison to 200 g L^{-1}

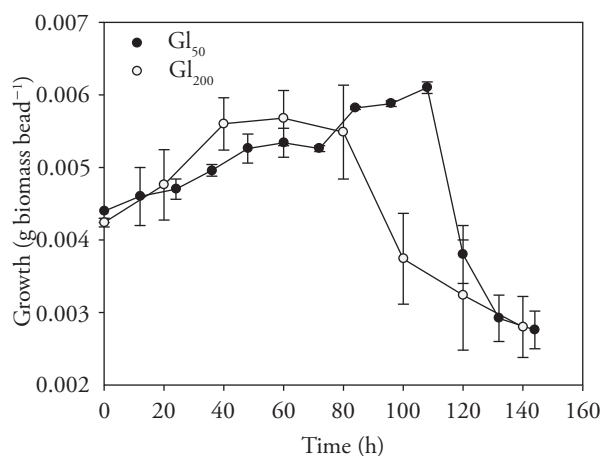


Figure 2. Growth ($\text{g biomass bead}^{-1}$) in coimmobilized system at different substrate concentrations.

Figura 2. Crecimiento ($\text{g biomasa esfera}^{-1}$) en el sistema coimmobilizado a diferentes concentraciones de sustrato.

fueron similares: el cultivo de células coimmobilizadas tuvo valores mayores ($8.80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que las células inmovilizadas de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* (Tabla 1). Los mayores niveles de productividad se observaron en cultivos coimmobilizados e inmovilizados, debido al menor tiempo de producción de etanol (80 h) que en los cultivos libres (120 h).

Efecto de concentración inicial de glucosa sobre la producción de etanol

Para los coimmobilizados de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* dentro de las esferas de alginato hubo un aumento inmediato en la concentración de la biomasa. La concentración de la biomasa para ambos tratamientos presentó diferencias significativas ($p \leq 0.002$), pero los resultados sugieren que ambas concentraciones de sustrato permitieron el crecimiento favorable de bacterias y de levadura (Figura 2). La concentración mayor de biomasa en el tratamiento de glucosa a 50 g L^{-1} (Gl_{50}) se obtuvo en las primeras 100 h de cultivo con 0.0063 g por esferas; mientras que para el tratamiento de 200 g L^{-1} glucosa (Gl_{200}) fue 0.053 g por esfera durante 80 h (Figura 2).

El alcohol producido (% v:v) no tuvo diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto a la concentración de glucosa. Sin embargo, las tasas de remoción muestran un declive al bajar el contenido de glucosa en el reactor (Cuadro 2). La tasa de remoción más alta fue con una concentración de 200 g L^{-1} de glucosa con una remoción de 76.5 %, comparado con 50 g L^{-1} de glucosa. La producción de alcohol fue similar en ambos tratamientos, pero la proporción mol-etanol producida por mol-glucosa consumida fue mayor en cultivos de 50 g L^{-1} glucosa con un valor de 6.91, comparado con 200 g L^{-1} glucosa con una proporción de 5.82 mol etanol producida por mol glucosa consumida (Cuadro 2). De manera similar, la productividad fue mayor con una concentración menor de glucosa, comparada con los medios con una concentración alta de glucosa.

Los sistemas inmovilizados tienen capacidad mayor de crecimiento celular y una alta actividad metabólica (Cohen, 2000; Mallick, 2002); esto es consistente con los resultados de nuestro estudio. El resultado mostró tasa alta de crecimiento específica para *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* inmovilizados con respecto a cultivos de células libres. Esto sugiere que la inmovilización afecta de forma positiva el crecimiento de

Table 2. Productivity (Y), uptake rate and ethanol mole produced per glucose with minimum content of glucose for coimmobilized *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Cuadro 2. Productividad (Y), tasa de remoción y mol de etanol producido por glucosa con un contenido mínimo de glucosa para *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilizadas.

C_0	Ethanol formed (% v/v)	Y ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$)	Glucose consumed ($g\ L^{-1}$)	Uptake rate $\frac{g\ substrate\ removed}{g\ biomass\ day}$	$\frac{moles\ Eth}{mole\ Glc}$
50	89.63 ^a	8.85 ^a	40.0	0.080 ^a	6.91 ^a
200	88.70 ^a	8.80 ^b	47.0	0.235 ^b	5.82 ^b

C_0 : Initial concentration of glucose ($g\ L^{-1}$). Means with different letters are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ C_0 : Concentración inicial de glucosa ($g\ L^{-1}$). Medias con letras diferentes son diferentes estadísticamente (Tukey; $p \leq 0.05$).

glucose with a ratio of 5.82 mol ethanol produced per consumed mol glucose (Table 2). Similarly, higher productivity was obtained at a lower glucose concentration compared to a medium with high glucose content.

Immobilized systems have a greater capacity of cell growth and high metabolic activity (Cohen, 2000; Mallick, 2002); this is consistent with the results obtained in our study. The result showed a high specific growth rates for immobilized *Z. mobilis* and *S. cerevisiae* with respect to free cell cultures, suggesting that immobilization positively affects the growth for both microorganisms and increase the biomass concentrations. Furthermore, this high metabolic activity in immobilized cell was observed with a decrease of substrate concentration in a shorter time of treatment compared to free cell cultures. The short time of treatment for immobilized cell culture could be attributed to the increase of biomass within the beads and, consequently, an immediate decay of the substrate. However, this indicates that with increasing cell population, within the beads, nutrients can be limited, especially for cells located at the center of the beads, causing a decrease in cellular activity (Uemoto and Saiki, 2000; Mallick, 2002).

The rapid decline in the cell density for immobilized cells culture could be attributed to the production of CO_2 due to fermentation activity. Adverse effect of CO_2 results because its diffusion is lower than its production, and it will accumulate inside of alginate bead (Kim and Choi, 1984). In our study, the CO_2 observed in the reactor as bubbles attached on the surface of the beads suggests that the spread of CO_2 in the first 80 h did not inhibit growth and alcohol production. Although CO_2

ambos microorganismos y aumenta las concentraciones de biomasa. Además, la alta actividad metabólica en células inmovilizadas se observó con una reducción en la concentración de sustrato en un tiempo menor de tratamiento, comparado con otros cultivos de células libres. El tiempo breve de tratamiento para el cultivo de células inmovilizadas puede atribuirse al aumento de biomasa dentro de las esferas y, en consecuencia, un consumo inmediato del sustrato. Sin embargo, esto indica que con el aumento de la población celular, dentro de las esferas, los nutrientes pueden ser limitados, en especial para las células localizadas en el centro de las esferas, causando una reducción de la actividad celular (Uemoto y Saiki, 2000; Mallick, 2002).

La rápida caída en la densidad celular para el cultivo de células inmovilizadas se podría atribuir a la producción de CO_2 debido a la actividad de fermentación. El efecto adverso del CO_2 se debe a que su difusión es menor que su producción y se acumula dentro de las esferas de alginato (Kim y Choi, 1984). En nuestro estudio, el CO_2 observado en el reactor como burbujas en la superficie de las esferas sugiere que la difusión de CO_2 en las primeras 80 h no inhibió el crecimiento ni la producción de alcohol. Aunque la concentración de CO_2 no se determinó en nuestro estudio, después de este tiempo la saturación de gas en el reactor probablemente fue alta y afectó la difusión de CO_2 . Esto quizá se deba a una limitación en el transporte de nutrientes y la inhibición subsecuente del crecimiento y causó un menor consumo de glucosa, comparado con las células libres (Cuadro 1).

Para el cultivo de células libres, el porcentaje bajo de alcohol obtenido por la levadura durante el período de cultivo de fermentación puede atribuirse a que esto

concentration was not determined in our study, after this time the gas saturation in the reactor was probably high, affecting the CO₂ diffusion. This is probably due to a limitation in the nutrients transport and subsequent inhibition of growth, which caused lower glucose consumption compared to free cells (Table 1).

For the free cells culture, the low percentage of alcohol obtained by yeast during the fermentation culture period could be attributed to the fact that this is affected (inhibit metabolism and decrease efficiency) by the ethanol concentration in the culture medium, as reported by Nuwamanya *et al.* (2012); unlike bacteria *Z. mobilis* as observed by Kim and Choi (1984).

In our study, the lowest biomass produced by the bacteria (0.0047 g L⁻¹) with respect to yeast (0.0055 g L⁻¹) may be practical from the standpoint of waste generation. This result is similar to those reported by Amin and Verachtert (1982) for *Z. mobilis* and *S. bayanus* immobilized in carrageenan with 5.6 g L⁻¹ and 9.9 g L⁻¹, respectively.

Ethanol production was not inhibited in immobilized or coimmobilized systems, and even showed higher productivity than to free cells (Table 1), suggesting a high sugar-conversion efficiency for the immobilized cells system. The productivity (Y) obtained for *Z. mobilis* alginate-immobilized (8.7 g L⁻¹ h⁻¹) was higher than 1.6 g L⁻¹ h⁻¹ reported for *Z. mobilis* immobilized in carrageenan (Krishnan *et al.*, 2000). This difference may be attributed to the lower glucose concentration in the culture medium (32 g L⁻¹) than the 200 g L⁻¹ used. The result suggest a high conversion of substrate for immobilized systems than free cells of yeast and bacteria. These results were higher than those reported by Amin and Verachtert (1982) for *Z. mobilis* and *S. bayanus* immobilized in carrageenan, with 1.8 to 1.9 mole of ethanol produced per mole of consumed glucose. Gunasekaran *et al.* (1986) and Krishnan *et al.* (2000) suggest that *Z. mobilis* is a good candidate to obtain alcohol with 1.9 mole ethanol per mole of glucose. According to Rogers *et al.* (1979) specific productivity of ethanol (g ethanol g⁻¹ biomass dry weight) is greater for *Zymomonas* than for *S. uvarum*.

Immobilization and coimmobilization exhibited a lower uptake rate than free cells; this shows that there was less substrate consumption (Table 1). Nevertheless, the greater productivity indicates that it

es afectado (inhibición de metabolismo y reducción de eficiencia) por la concentración de etanol en el medio de cultivo, como lo reporta Nuwamanya *et al.* (2012); a diferencia de la bacteria *Z. mobilis* según Kim y Choi (1984).

En nuestro estudio, la biomasa menor producida por la bacteria (0.0047 g L⁻¹) con respecto a la levadura (0.0055 g L⁻¹) puede ser práctica desde el punto de vista de la generación de desechos. Este resultado es similar al reportados por Amin y Verachtert (1982) para *Z. mobilis* y *S. bayanus* inmovilizadas en carragenano con 5.6 g L⁻¹ y 9.9 g L⁻¹, respectivamente.

La producción de etanol no se inhibió en sistemas inmovilizados o coinmovilizados, e incluso presentó una mayor productividad que las células libres (Cuadro 1), lo que sugiere una eficiencia alta de conversión de azúcar para el sistema de células inmovilizadas. La productividad (Y) obtenida para *Z. mobilis* inmovilizada en alginato (8.7 g L⁻¹ h⁻¹) fue mayor a 1.6 g L⁻¹ h⁻¹ reportados para *Z. mobilis* inmovilizada en carragenano (Krishnan *et al.*, 2000). Esta diferencia podría atribuirse a la menor concentración de glucosa en el medio de cultivo (32 g L⁻¹) que los 200 g L⁻¹ usados. El resultado sugiere una mayor conversión de sustrato para los sistemas inmovilizados que para las células libres de levadura y bacteria. Estos resultados fueron mayores que los reportados por Amin y Verachtert (1982) para *Z. mobilis* y *S. bayanus* inmovilizadas en carragenano, con 1.8 a 1.9 moles de etanol producidos por mole de glucosa consumida. Gunasekaran *et al.* (1986) y Krishnan *et al.* (2000) sugieren que *Z. mobilis* es un buen candidato para obtener alcohol con 1.9 moles de etanol por mol de glucosa. Según Rogers *et al.* (1979), la productividad específica de etanol (g etanol g⁻¹ peso seco de biomasa) es mayor para *Zymomonas* que para *S. uvarum*.

La inmovilización y la coinmovilización tuvieron tasa menor de remoción que las células libres, lo que muestra un consumo menor de sustrato (Cuadro 1). Sin embargo, la productividad mayor indica que es posible obtener un contenido alto de alcohol con un requerimiento menor de sustrato, pero la desventaja es la glucosa residual en el medio. Esto se puede resolver con sistemas secuenciados, según Demirci *et al.* (1997). Otra alternativa para solucionar este problema es aumentar el número de células o el tamaño del inóculo dentro del reactor. Esto es razonable porque un número alto de células podría crear una absorción mayor de sustrato (glucosa) dentro de la célula.

is possible to obtain high alcohol content with a lower requirement of substrate, but with the disadvantage of residual glucose in the medium. This problem can be solved with sequenced systems, as suggested by Demirci *et al.* (1997). Another alternative of solving this problem is to increase the cell number or inoculum size within the reactor. This is reasonable because a high number of cells could create a greater sorption of substrate (glucose) into the cell and consumed substrate. However, Siripattanakul-Ratpukdi (2012) suggested that with different cell yeast loads, the same reduction (>90 %) of substrate is obtained at the end of a treatment period of 10 h.

The low glucose reduction in our study in alginate beads can be attributed to the decline in cell density and substrate diffusion within the alginate matrix. The adsorption of substrate by the matrix was observed in the first hours of treatment, with a possible decrease of substrate diffusion within the matrix in a continuous process (Siripattanakul and Khan, 2010).

Robinson *et al.* (1989) suggested that the diffusion rate within the alginate matrix depends on the concentration gradient between the culture medium and matrix; this is, when the nutrient concentration in the culture medium decreases, the diffusion rate occurs within the matrix and therefore the removal rate. In our study, during the first hours of treatment the substrate decreased and probably the matrix had a partial saturation with glucose; but this had not a negative effect on the both microorganisms growth. This, the immobilized cell system successfully decreased glucose by matrix adsorption (immobilized glucose) and biodegradation (bioconversion of glucose), being the main process the biodegradation. This suggests that the main factor that could limit glucose removal might be the high concentration of CO₂ in the reactor. For immobilized cultures, the high concentration of glucose dissolved in the culture medium (200 g L⁻¹) caused an immediate decline in growth, compared to cultures with 50 mg L⁻¹. However, this did not have any growth inhibition and negative effect on productivity and ethanol produced (Table 2).

The high uptake rate for cultures with 200 g L⁻¹ confirms that the high concentration of glucose saturates beads faster, allowing rapid availability of substrate for the microorganisms within the beads (Table 2). However, the cultures with high

la y el sustrato podría ser consumido. Sin embargo, Siripattanakul-Ratpukdi (2012) sugirieron que con diferentes cargas de células de levadura se obtiene la misma reducción (>90 %) de sustrato al final de un tratamiento de 10 h.

La baja disminución de glucosa en nuestro estudio en esferas de alginato se puede deber a la reducción en densidad celular y difusión de sustrato dentro de la matriz de alginato. La adsorción del sustrato por la matriz se observó en las primeras horas del tratamiento, con una posible reducción de difusión de sustrato dentro de la matriz en un proceso continuo (Siripattanakuly Khan, 2010).

Robinson *et al.* (1989) sugieren que la tasa de difusión dentro de la matriz de alginato depende del gradiente de concentración entre el medio de cultivo y la matriz; es decir, cuando se reduce la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, la tasa de difusión ocurre dentro de la matriz y por lo tanto la tasa de extracción. En nuestro estudio, durante las primeras horas de tratamiento el sustrato se redujo y es probable que la matriz tuviese saturación parcial con glucosa; pero esto no tuvo efecto negativo en el crecimiento de ambos microorganismos. Así, el sistema celular inmovilizado redujo la glucosa exitosamente por adsorción de la matriz (glucosa inmovilizada) y biodegradación (bioconversión de glucosa), y la biodegradación fue el proceso principal. Esto sugiere que el factor principal que pudo limitar la extracción de glucosa pudo ser la concentración alta de CO₂ en el reactor. Para cultivos inmovilizados, la concentración alta de glucosa disuelta en el medio de cultivo (200 g L⁻¹) causó reducción inmediata del crecimiento, comparado a cultivos con 50 mg L⁻¹. Sin embargo, esto no inhibió el crecimiento ni tuvo efectos negativos sobre la productividad ni el etanol producido (Cuadro 2).

La tasa alta de absorción para cultivos con 200 g L⁻¹ confirma que la concentración alta de glucosa satura las esferas más rápido, y permite una disponibilidad rápida de sustrato para los microorganismos dentro de las esferas (Cuadro 2). Sin embargo, los cultivos con concentración alta de sustrato no necesariamente sugiere una alta conversión de sustrato; a menor tasa de absorción (concentración mínima de sustrato), es posible obtener conversión mayor comparado con cultivos enriquecidos. Así, la concentración baja de sustrato del medio de cultivo indica la presencia de un transporte suave y acumulación de

concentration of substrate does not necessarily suggest a high substrate conversion; at a lower uptake rate (minimum substrate concentration) it is possible to obtain a higher conversion compared to enriched cultures. Therefore, the low concentration of substrate of the culture medium indicates the presence of a soft transport and substrate accumulation within the matrix, allowing a proper consumption and growth of bacteria and yeast. Thus, this may actually increase the production of alcohol with minimal residual glucose, reaching 6.91 moles of ethanol per mole of glucose, in comparison to a high glucose concentration (Table 2).

CONCLUSIONS

The association of *Z. mobilis* and *S. cerevisiae* was positive, obtaining a higher ethanol content and high conversion of substrate compared to free and immobilized cells. The immobilization technology offers an alternative by increasing productivity and substrate conversion compared with free cells culture systems. Higher conversion capacity to obtain alcohol was observed with lower substrate.

The possible substrate inhibition was not a factor affecting cell growth in both organisms. Therefore the immobilized cell technology successfully reduced glucose by the matrix adsorption (immobilized glucose) and biodegradation (bioconversion of glucose); the latter was the main process. This suggests that the main factor that could limit further growth was the high concentration of CO₂ in the reactor. Furthermore, although no significant differences were detected in the alcohol content in immobilized culture in diluted medium, the conversion from glucose to ethanol is greater in those media with a glucose concentration of 50 g L⁻¹. For practical purposes, it is desirable that the fermentation of waste organic be performed through dilutions to increase the homogeneity of alginate beads within the reactor and, consequently, allow the diffusion of CO₂ and substrate through the beads.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the internal financing of UNACAR-Chemistry Faculty for the support to do carry out study.

sustrato dentro de la matriz, y permite un consumo y crecimiento adecuados de las bacterias y la levadura. Por lo tanto, esto incluso podría aumentar la producción de alcohol con glucosa residual mínima, y alcanzar 6.91 moles de etanol por mol de glucosa, comparado con alta concentración de glucosa (Cuadro 2).

CONCLUSIONES

La asociación de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* fue positiva, se obtuvo un contenido mayor de etanol y conversión alta de sustrato en comparación con las células libres e inmovilizadas. La tecnología de inmovilización es una alternativa para aumentar la productividad y la conversión de sustratos, comparada con sistemas de cultivo de células libres. La capacidad mayor de conversión para obtener alcohol se observó con menos sustrato.

La inhibición posible por sustrato no fue un factor que limitara al crecimiento celular en ambos organismos. Por lo tanto, la tecnología de células inmovilizadas redujo con éxito la glucosa por la adsorción de la matriz (glucosa inmovilizada) y la biodegradación (bioconversión de glucosa); esta última fue el proceso principal. Esto sugiere que el factor principal que podría limitar un mayor crecimiento mayor fue la concentración alta de CO₂ en el reactor. Además, si bien no se detectaron diferencias significativas en el contenido de alcohol en el medio diluido de cultivo inmovilizado, la conversión de glucosa a etanol es mayor en los medios con una concentración de glucosa de 50 g L⁻¹. Para fines prácticos, es deseable que la fermentación de residuos orgánicos se realice a través de diluciones para aumentar la homogeneidad de las esferas de alginato dentro del reactor y, en consecuencia, permitir la difusión de CO₂ y el sustrato a través de las esferas.

—Fin de la versión en Español—

---*---

LITERATURE CITED

- Amin, G., and H. Verachtert. 1982. Comparative study of ethanol production by immobilized -cell systems using *Zymomonas mobilis* or *Saccharomyces bayanus*. Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol. 14: 59-63.

- Amin, G. V., D. Eynde, and E. Verachtert. 1983. Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cell systems of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1-5.
- Bandhyopadhyay, K., D. Das, P. Bhattacharyya, and B. R. Maiti. 2001. Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. *Biochem. Eng. J.* 8: 179-186.
- Cohen, Y. 2000. Biofiltration- the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material. *Bioresource Technol.* 77: 257-274.
- Colognesi, G. de O., L. F. dos Santos, R. J. H. Castro G. S. Maseguer R., and H. H. Suguimoto. 2015. Ethanol production potential of *Saccharomyces fragilis* IZ 275 using cheese whey powder solution. *Agrociencia* 49: 291-298.
- De-Bashan, L. E., M. Moreno, J. P. Hernández, and Y. Bashan. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* 36: 2941 – 2948.
- Demirci, A., A. L. Pometto, and K. L. G. Ho. 1997. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 299-304.
- Gunasekaran, P., T. Karunakaran, and M. Kasthuribai. 1986. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrate a comparative study. *J. Biosci.* 10: 181-186.
- Humphries, A. C., K. P. Nott, L. D. Hall, and L. E. Macaskie. 2005. Reduction of Cr (VI) by immobilized cells of *Desulfovibrio vulgaris* NCIMB 8303 and *Microbacterium* sp. NCIMB 13776. *Biotechnol. Bioeng.* 90: 597-605.
- Kawaguti, H. Y., E. Manrich, and H. H. Sato. 2006. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. *Biochem Eng J.* 29: 270-277.
- Kassim, M. A., L. S. Kheang, N. A. Bakar, A. A. Aziz, and R. M. Som. 2011. Bioethanol production from enzymatically saccharified empty fruit bunches hydrolysate using *Saccharomyces cerevisiae*. *Res J Environ Sci.* 5: 573-586.
- Kim, B. G., and C. Y. Choi. 1984. A study on the ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *KJChE.* 1: 13-19.
- Krishnan, M. S., M. Blanco, K. C. Shattuck, P. N. Nghiem, and B. H. Davison. 2000. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5). *Appl. Biochem. Biotech.* 84-86: 525-541.
- Liu, K., L. Xiaohui, Y. Jun, L. Xuezhai, F. Xu, Z. Mingtian, L. Jianqiang, and Q. Yinbo. 2010. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresource Technol.* 101: 4952-4958.
- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15: 377 – 390.
- Nigan, J. N. 2000. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J. Biotechnol.* 80: 189-193.
- Nuwamanya, E., L. Chiwona-Karltun, S. K. Robert, and B. Yona. 2012. Bio-ethanol production from non-food parts of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Ambio* 41:262-270.
- Park, D. H., J. M. Chab, H. W. Ryu, G. W. Lee, E. Y. Yu, J. I. Rhee, J. J. Park, S. W. Kim, I.W. Lee., Y. I. Joe, Y. W. Ryu, B. K. Hur, J. K. Park, and K. Park. 2002. Hydrogen sulfide removal utilizing immobilized *Thiobacillus* sp. IW with Calcium alginate bead. *Biochem. Eng. J.* 11: 167-173.
- Ramasamy, A., and G. Paramasamy. 2001. Production of ethanol from liquefied Cassava starch using Co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 560-564.
- Robinson, P. K., J. O. Reeve, and K. H. Goulding. 1989. Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous-flow culture. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11: 590 – 596.
- Rogers, P. L., J. L. Jon, and D. E. Tribe. 1979. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration. *Biotechnol. Lett.* 1: 165.
- Ruiz-Marin, A., G. L. Mendoza-Espinosa, and T. Stephenson. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technol.* 101: 58-59.
- Sarkar, N., K. G. Sumanta, B. Satarupa, and A. Kaustav. 2012. Bioethanol production from agriculture wastes: An overview. *Renewa. Energ.* 37: 19-27.
- Siripattanakul, S., and E. Khan. 2010. Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. *In: Shah, V. (ed). Emerging Environmental Technologies 2.* Springer, Berlin. pp. 147-169.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S. 2012. Ethanol production potential from fermented rice noodle wastewater treatment using entrapped yeast cell sequencing batch reactor. *Appl. Water Sci.* 2: 47-53
- Sivers, M. V., G. Zacchi, L. Olsson, and B. Hahn-Hagerdal. 1994. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 10: 555-560.
- Tam, N. F. Y., P. S. Lau, and Y. S. Wong. 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Sci. Technol.* 30: 369-374.
- Tam, N. F. Y., and Y. S. Wong. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollut.* 107: 145-151.
- Travieso, L., F. Benitez, P. Weiland, E. Sanchez, R. Dupeyrón, and A. R. Domínguez. 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresour Technol.* 55: 181-186.
- Uemoto, H., and H. Saiki. 2000. Distribution of nitrosomonas europae and Paracoccus denitrificans immobilized in tubular polymeric gel for nitrogen removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 816-819.
- Vallejo-Becerra, V., J. M. Vazquez-Bahena, J. A. Santiago-Hernández, and M. E. Hidalgo-Lara. 2008. Immobilization of the recombinant invertase INVB from *Zymomonas mobilis* on nylon-6. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1289-1295.
- Wu, S. Y., C. N. Lin, and J. S. Chang. 2003. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 19: 828-832.
- Yu, J., G. Yue, J. Zhong, X. Zhang, and T. Tan. 2010. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production. *Renew. Energy* 35: 1130-1134.