

PRODUCCIÓN DE ETANOL CON CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Zymomonas mobilis* spp.

Adriana Matiz, Claudia Torres, *Raúl A. Poutou

Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia.
*Correspondencia: rp000274@javeriana.edu.co

RESUMEN

La producción de etanol en Colombia representa uno de los renglones económicos más importantes, producido como alcohol antiséptico, solvente y aditivo para la gasolina. El objetivo de este trabajo fue aumentar la eficiencia en la producción de etanol y encontrar microorganismos que representen una alternativa en producción frente a *Saccharomyces cerevisiae*. Cepas de *Zymomonas mobilis*, var. *mobilis* (Zmm1 y Zmm2) y pomaceae (Zmp1 y Zmp2), fueron aisladas de muestras de melazas de caña con el propósito de realizar un estudio comparativo con resultados reportados anteriormente a partir de células libres. Fue utilizada una cepa control *Zymomonas mobilis mobilis* (CETC) 560, considerada alta productora de etanol. Células libres en fermentador de 1L y se inmovilizaron en matriz de alginato de calcio. Al final del proceso de fermentación fue determinada la producción de etanol por picnometría. Los resultados revelaron a una concentración de inmovilización del 2% p/v, un rendimiento de 92.1%, por parte de las cepas nativas Zmm1 y Zmm2 y de 97.85%, con Zmm 560, comparado con los rendimientos de etanol obtenidos a partir de células libres, de 72.9% por parte de Zmm1 y 76.74% con Zmm 560. El análisis de estos datos, demuestran las ventajas de la utilización de células inmovilizadas frente a células libres, en procesos de fermentación y representan grandes posibilidades para el desarrollo Biotecnológico de nuestro país, ya que permiten considerar a *Zymomonas mobilis* sp., como alternativa para producción de etanol a escala industrial, especialmente las cepas autóctonas Zmm1 y Zmm2 que hicieron parte de este estudio.

Palabras claves: Fermentación, *Zymomonas mobilis*, etanol, células inmovilizadas

ABSTRACT

The ethanol production in Colombia represents one of the more important economic lines, produced like antiseptic, reliable alcohol and additive for the gasoline. The purpose of this work was of to increase the efficiency in the production of ethanol and to find a microorganism that represents an alternative in production, in front a *Saccharomyces cerevisiae*. Stocks of *Zymomonas mobilis* var. *mobilis* (Zmm1 and Zmm2) and pomaceae (Zmp1 and Zmp2), they were isolated of samples of molasses of sugar cane in order to previously make a comparative study with results reported from free cells. A stock was used control *Zymomonas mobilis mobilis* (CETC) 560, considered high ethanol producer. Free cells in fermentador of 1L and were immobilized in matrix of calcium alginate. At the end of the fermentation process the ethanol production was determined by picnometry; results revealed to a concentration of immobilization of 2% p/v, a yield of 92.1%, on the part of the native stocks Zmm1 and Zmm2 and of 97.85%, with Zmm compared 560, with the obtained yields of ethanol from free cells, 72.9% on the part of Zmm1 and 76.74% with Zmm 560. The analysis of these data, demonstrates to the

advantages of the use of immobilized cells forehead to free cells, in fermentation processes, representing a great possibilities for the Biotechnological development of our country, since they allow to consider a *Zymomonas mobilis* sp. like an alternative for ethanol production on industrial scale, specially the native stocks Zmm1 and Zmm2 that was part of this study.

Key words: Fermentation, *Zymomonas mobilis*, ethanol, immobilized cells

INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción de alcohol es considerable a nivel de bebidas alcohólicas, pero también un alto porcentaje es producido como alcohol antiséptico, como solvente y aditivo para la gasolina, por lo tanto, aumentar la eficiencia en la producción de etanol ha sido objetivo de muchos investigadores, así como encontrar un microorganismo que represente una alternativa en producción de etanol, frente a *Saccharomyces cerevisiae*, tradicionalmente utilizado (García 1993; Bringer 1985; Osman 1985; Roger 1982).

La utilización de células inmovilizadas ha sido considerado un método eficaz en el aumento de producción de metabolitos por parte de las células ya que permite la utilización de células por largos periodos de tiempo, aumenta la estabilidad de las células, permite ventajas en la configuración de reactores entre las que se incluyen un rápido control de pH y temperatura, permite mantener altas concentraciones de células y no requiere sistemas de agitación. En general disminuye de manera considerable los costos de producción (Trevan 1993; Rosevear 1993; Walker 1993; Kosaric 1983; Linko 1981).

Dentro de los microorganismos de interés como alternativa en producción de etanol, se encuentra *Zymomonas mobilis* (Zm), quien por su consumo rápido de glucosa en procesos de fermentación y bajas de pH en el medio, han despertado interés desde la década de los 30. De esta manera uno de los objetivos de este estudio fue la inmovilización de células de Zm. nativas en matriz de alginato de calcio, con el fin de aumentar la eficiencia en producción de etanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se realizaron por triplicado, se incubaron a 30°C, en condiciones de microaerofilia. Es importante resaltar que la cepa

control Zmm 560, es considerada alta productora de etanol a escala industrial, razón por la cual, fue empleada como control en este proyecto de investigación (Belloch 1998; De ley y Swings 1977; Tanaka y col. 1990).

Cepas

Zymomonas mobilis mobilis 1 (Zmm1), *Zymomonas mobilis mobilis* 2 (Zmm2), *Zymomonas mobilis pomaceae* 1 (Zmp1), *Zymomonas mobilis pomaceae* 2 (Zmp2) y *Zymomonas mobilis mobilis* 560. Caracterizadas y conservadas en Banco de células primario, en medio líquido «Medio Líquido Estándar» (MLS), más 30% v/v de glicerol, a -70°C (Agrawal y Basappa 1994; Ardila 1998; De ley y Swings 1977; Frank 1992; Matiz 1999; Merck 1994; Poutou et al 1994; Torres 1999).

Reconstitución de viales

Se tomaron viales de 1ml, provenientes del Banco de células primario de cada una de las diferentes cepas. Fueron reconstituidos en 5 ml de Medio Líquido Estándar (MLS), composición en gramos por litro: Extracto de levadura, 5; glucosa, 20; penicilina, 0.004; ciclohexamida, 0.004; pH, 5.5, ajustado con H₂SO₄, a 30°C, 150 r.p.m., bajo condiciones de microaerofilia, por 72 horas (De ley y Swings 1977; Matiz 1999; Poutou y col. 1994).

Producción de biomasa

Posteriormente los 5 ml que contenían la bacteria reconstituida fueron mezclados con 50 ml de MLS, a 1.500 r.p.m., 30°C, en condiciones de microaerofilia, por 48 h. (De ley y Swings 1977; Matiz 1999).

Inmovilización de células

Se realizó el proceso de inmovilización en matriz de alginato de calcio a concentraciones de: 1.35%, 1.5%, 2.0% y 3.2% p/v, manteniendo la relación de 1g de células en 34 ml de mezcla de inmovilización.

La mezcla de alginato-células se goteó en una solución de CaCl_2 , 0.1M, en agitación hasta obtener la perla. Las perlas fueron conservadas en CaCl_2 24 horas, 4°C (Amin 1982; Chibata 1983; Fukushima 1982; Grote 1980; Han 1992; Jain 1985; Jain et al 1992; Linko 1981; Margaritis 1982).

Fermentación

Las perlas fueron empacadas en un reactor de inmovilización, con Medio de Fermentación Sintético Modificado (MFSM), composición en gramos por litro: Extracto de levadura, 10; glucosa, 100; KH_2PO_4 , 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; ajuste a PH, 5.0, con KOH 1.0 M, donde se llevó a cabo el proceso de fermentación, para cada una de las cepas inmovilizadas, a las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente, a 30°C, en microaerofilia por 36 horas, sin agitación. Al final de la fermentación se realizó la determinación de azúcares reductores mediante la técnica de Acido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) y de etanol por medio de destilación (Abate 1996; Galaj 1994; Grote 1980; Han 1992; Linko 1981; McGhee 1982; Osman 1985; Roger 1983; Skotnický 1981).

Determinación de azúcares reductores

Fueron determinados al final de cada uno de los procesos de fermentación, mediante la técnica de Acido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1951; Matiz 1999; Nelson 1954; Somogy 1952).

Determinación de etanol

Se retiraron las perlas del medio de fermentación, MFSM, después de las 36 horas de fermentación, de cada una de las cepas, para la obtención de extracto crudo que fue sometido posteriormente a un proceso de destilación por picnometría (Berg 1963).

Al final del procedimiento con cada cepa, se realizaron los siguientes cálculos:

$$\frac{W \text{ destilado} - W \text{ pic. Vacío}}{W \text{ H}_2\text{O} - W \text{ pic. Vacío}}$$

- $W \text{ destilado} = \text{Peso del picnómetro con el destilado}$
- $W \text{ pic. Vacío} = \text{Peso del picnómetro vacío}$
- $W \text{ H}_2\text{O} = \text{Peso del picnómetro con agua destilada}$

El resultado de estos cálculos será equivalente a la densidad relativa del destilado (Berg 1963).

$$\text{Densidad relativa} = \frac{\text{densidad del destilado}}{\text{Densidad del agua (18°C)}}$$

Entonces:

$$\text{Densidad del destilado} = \text{densidad del destilado} \times \text{densidad del agua}$$

Este resultado permite determinar % en peso del etanol presente y a partir de este, se obtienen gramos de etanol total y rendimiento (Perry 1968).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 1, el mayor porcentaje de etanol fue obtenido por parte de la cepa control Zmm 560 y las cepas nativas Zmm 1 y Zmm 2, con valores de 9.0% y 8.0%, en alginato de sodio 2% p/v, comparado con el porcentaje de etanol obtenido, por parte de las cepas nativas Zmp 1 y Zmp 2 a otras concentraciones de alginato de sodio diferentes como son: 1.35%, 1.5% y 3.2%, p/v, donde el porcentaje de etanol presente oscila entre 5% y un máximo de 8%. En general el comportamiento de las cepas en cuanto a producción de etanol se refiere, fue superior en la matriz de inmovilización de 2% p/v, determinando así la mejor concentración de inmovilización para Zm sp., en producción de etanol (Ryu 1997).

De acuerdo con los resultados reportados en células libres de *Zymomonas mobilis* nativas, se observa que las cepas Zmm 1, Zmm 2, Zmp 1 y Zmp 2, obtuvieron porcentajes de etanol de 6%, 4.5%, 5.0% y 4.5% respectivamente en procesos de fermentación realizados en MFSM, bajo las mismas condiciones de aire, tiempo y temperatura. Estos análisis demuestran que, el proceso de inmovilización aumenta la producción de etanol por parte de Zm sp., incluso en concentraciones de inmovilización poco eficientes como son: 1.35%, 1.5% y 3.2%, p/v, donde se observan porcentajes de etanol producido, superiores a los obtenidos con células libres (Matiz 1999).

Como se observa en la Tabla 2, el mayor rendimiento de etanol se presenta igualmente a la concentración de inmovilización de 2% p/v de alginato de sodio, siendo las cepas nativas Zmm 1 y Zmm 2 las que presentan un rendimiento de etanol superior de 92.1%, frente al observado en las cepas nativas Zmp 1 y Zmp 2, de 63.95% y 67.15% respectivamente.

Tabla 1. Determinación de porcentaje de Etanol por picnometría. Fermentación en medio MFSM, 36 horas, condiciones de microaerofilia, 30°C. Cepas nativas y control. Células inmovilizadas.

CEPA	% de Etanol por Picnometría			
	Concentración de alginato de sodio % p/v			
	1.35	1.5	2.0	3.2
Zmm 1	6.0	6.0	8.0	7.0
Zmm 2	5.0	5.0	8.0	6.0
Zmp 1	5.0	7.0	6.0	6.0
Zmp 2	6.0	7.0	7.0	5.0
Zmm 560	6.0	6.0	9.0	8.0

Símbolos: Zmm1, *Zymomonas mobilis mobilis*1; Zmm2, *Zymomonas mobilis mobilis*2; Zmp1, *Zymomonas mobilis pomaceae*1; Zmp2, *Zymomonas mobilis pomaceae*2; Zmm560, Cepa control *Zymomonas mobilis mobilis* 560.

Tabla 2. Determinación de rendimiento, moles y gramos de etanol. Fermentación en medio MFSM, 36 horas, condiciones de microaerofilia, 30°C. Cepas nativas y control. Células inmovilizadas.

CEPA	Rendimiento de Etanol (%)				Moles de Etanol				Gramos de Etanol			
	Concentración de Alginato (%)				Concentración de Alginato (%)				Concentración de Alginato (%)			
	1.35	1.5	2.0	3.2	1.35	1.5	2.0	3.2	1.35	1.5	2.0	3.2
Zmm 1	54.36	63.20	92.10	51.80	1.05	1.20	1.80	0.99	48.3	56.3	82.90	46.0
Zmm 2	27.20	23.02	92.02	34.53	0.44	0.52	1.80	0.66	20.4	24.1	82.9	32.2
Zmp 1	44.76	51.08	64.95	32.60	0.86	0.98	1.23	0.63	41.4	45.3	56.8	29.0
Zmp 2	31.65	67.15	67.15	43.50	0.61	1.30	1.30	0.84	28.1	59.7	59.8	38.6
Zmm 560	59.48	69.07	97.85	94.65	1.14	1.33	1.88	1.82	52.8	61.4	87.5	82.9

Símbolos: Zmm1, *Zymomonas mobilis mobilis*1; Zmm2, *Zymomonas mobilis mobilis*2; Zmp1, *Zymomonas mobilis pomaceae*1; Zmp2, *Zymomonas mobilis pomaceae*2; Zmm560, Cepa control *Zymomonas mobilis mobilis* 560.

El comportamiento de las cepas nativas Zmm 1 y Zmm 2 frente a la cepa control Zmm 560, muestra una diferencia en rendimiento aproximadamente del 5%, a una concentración de 2% p/v de inmovilización, es decir, que el rendimiento obtenido por parte de las cepas nativas puede considerado dentro

De igual manera se aprecia claramente una diferencia en rendimiento, moles y gramos de etanol producidos, por parte de las cepas nativas Zmm 1 y Zmm 2, frente a Zmp 1 y Zmp 2, estas últimas con un rendimiento de etanol de 64.95% y 67.15%, al 2% p/v de inmovilización. Se observa así mismo, comparando con los resultados reportados en células libres, que el proceso de inmovilización aumenta el rendimiento, moles y gramos de etanol producidos al final del proceso de fermentación ya que, Zmm 1, Zmm 2, Zmp 1, Zmp 2 y Zmm 560, con células libres, presentaron rendimientos de 72.9%, 57.56%, 65.22%, 54.01% y 76.74% respectivamente, inferiores a los obtenidos por inmovilización al 2% p/v (Lee et al 1981; Skotnicki 1983).

En cuanto a los moles de etanol producidos por las cepas Zmm 1 y Zmm 2, de 1.8, al ser comparados

con los obtenidos por parte de la cepa control Zmm 560, 1.88, se observa una diferencia mínima de 0.08 moles, a una concentración de alginato de sodio del 2%, p/v, demostrando de esta manera no solamente la eficiencia de las cepas nativas, sino la posibilidad de considerar a Zmm como alternativa en la producción industrial de etanol. Estos datos obtenidos son comparables con ensayos realizados anteriormente por Kluyver, Gibbs y Abate, quienes reportan rendimientos teóricos de aproximadamente 1.9 moles de etanol por mol de glucosa consumida, por parte de Zm sp. (Abate 1996; Gibbs y De Moss 1951; Doelle 1993; Kluyver y Hoppenbrouwers 1931; Swings y DeLey 1977).

En la Tabla 3 se observa una glucosa residual en g/l de 0.9662 para Zmm1, Zmm 2, Zmp 2 y Zmm 560, al 2% p/v de concentración de matriz de inmovilización, lo que demuestra una mayor eficiencia, comparada con las diferentes concentraciones de inmovilización. Esto demuestra una vez más, la gran posibilidad que tiene *Zymomonas mobilis* como alternativa en producción de etanol, ya que este es un factor determinante en los procesos de fermentación.

Tabla 3. Determinación de glucosa residual . Fermentación en medio MFSM, 36 horas, condiciones de microaerofilia, 30°C. Cepas nativas y control. Células inmovilizadas.

CEPA	Azúcar residual (g/l)			
	Concentración de Alginato de sodio % p/v			
	1.35	1.5	2.0	3.2
Zmm 1	1.7260	2.4860	0.9662	1.7261
Zmm 2	2.4860	1.7260	0.9662	1.7260
Zmp 1	2.4860	3.2430	1.7261	1.7261
Zmp 2	0.6660	3.2430	0.9662	1.7261
Zmm 560	2.4860	2.4860	0.9662	0.9662

Símbolos: Zmm1, *Zymomonas mobilis mobilis*1; Zmm2, *Zymomonas mobilis mobilis*2; Zmp1, *Zymomonas mobilis pomaceae*1; Zmp2, *Zymomonas mobilis pomaceae*2; Zmm560, Cepa control *Zymomonas mobilis mobilis* 560.

Así mismo se observa a esta misma concentración de inmovilización, que la menor utilización de sustrato es por parte de la cepa nativa Zmp 1, con una glucosa residual de 1.7261 g/l. Esta cepa presentó el más bajo rendimiento de etanol, de 64.95%, frente a la mayor utilización de sustrato por parte de las cepas nativas Zmm 1, Zmm 2 y Zmm 560, que presentaron los mayores rendimientos de etanol.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de glucosa residual con la utilización de células libres, Zmm 1, Zmm 2, Zmp1, Zmp 2 y Zmm 560, en g/l, 2.4860, 8.5654, 8.5654, 17.3845 y 0.9662, respectivamente, se observa un aumento considerable en la utilización de sustrato, especialmente para las cepas nativas. Con estos resultados se confirma que la inmovilización de células permite un mayor aprovechamiento del sustrato y por lo tanto permite un aumento en la productividad de etanol por parte de Zm sp. a partir de glucosa.

Se evidenció claramente la importancia de la utilización de células inmovilizadas en matriz de alginato de calcio utilizadas para el proceso de producción de etanol, frente a los resultados obtenidos a partir de células libres. La eficiencia en producción de etanol por parte de las cepas nativas Zmm 1 y Zmm 2 fue demostrada, en el resultado del análisis comparativo con la cepa control Zmm 560, cuya importancia se refleja en ser consideradas como posible alternativa en la producción de etanol a nivel industrial.

Se determinó la concentración óptima en proceso de inmovilización en matriz de alginato de calcio para *Zymomonas mobilis* sp., que de acuerdo al análisis de resultados es del 2%, p/v, para producción de etanol a partir de glucosa. El resultado de este estudio, representa un hallazgo en la búsqueda de nuevos microorganismos productores de etanol, que puedan ser considerados como alternativa en la producción de etanol a nivel industrial, en este caso, las cepas nativas Zmm1 y Zmm2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abate C, Callieri D, Rodríguez E, Garro O. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996; 45:580-583.
2. Agrawal R, Basappa S.C. Fermentation of paddy malt mash to ethanol by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* ZM4 with penicillin G. *Journal of Fermentation and Bioengineering (Japan)*. 1994; 77 (2) 218-220.
3. Agrawal R, Basappa S.C. Role of antimicrobial agents in simultaneous saccharification and fermentation of paddy malt mash to ethanol by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* PHO3 and *Zymomonas mobilis* ZM4. *Biotechnology Letters*, 1996; 18 (6) 673-678.
4. Amin G. Conversion of sugar-beet particles to ethanol by the bacterium *Zymomonas mobilis* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 1992; 14 (6): 499-504.
5. Amin G, Verachtert H. Comparative study of ethanol production by immobilized-cell systems using *Zymomonas mobilis* or *Saccharomyces bayanus*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. 1982; 14: 59-63.
6. Ardila M.V. Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. *Bacteriología*. Santafé de Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 1998
7. Belloch C, López L, Esteve B, Martínez M.D, Uruburu F. Catálogo de cepas. Colección española de cultivos tipo CECT. Edición 4ª. *Universitat de València*. 1998
8. Berg E. W. *Physical and Chemical Methods of Separation*. New York. McGraw-Hill Book Company, 1963; 9-17.
9. Bringer S, Sahn H. Jetzt industriereif: Ethanol – Produktion durch Bakterien. *BioEngineering*. 1985; 1: 30-36.

10. Chang Y. H, Lee S. H, Bang W. G. Production of ethanol by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. Research reports of the College of Agriculture. 1985; 25: 55-64.
11. Chibata I, Tosa T, Sato T. Methods of cell immobilization. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington D. C. 1986
12. Chibata I, Wingard L. B. Immobilized microbial cells. Applied Biochemical and Bioengineering. 1983; 4: 1-349.
13. Crueger W, Crueger A. Biotecnología Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza -España. 1989
14. De Ley J, Swings J. The Biology of *Zymomonas*. Laboratory of Microbiology and Microbial Genetics, Faculty of Sciences, Satate University, B-9000 Gent, Belgium. American Society for Microbiology. Bacteriological Review, 1977; 41 (1), 1-46.
15. Doelle H. W, Kerk L, Crittenden R, Toh H, Doelle M. B. *Zymomonas mobilis* - science and industrial application. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 1993; 13 (1) 57-98.
16. Duarte A. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. Intituto de Biotecnología. 1995
17. Frank P, Simone J. Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cells bank. Review Article. Journal of Parenteral Science & Technology. 1992; 226-232.
18. Fukushima S, Hanai S. Pilot operation for continuous alcohol fermentation of molasses in an immobilized bioreactor. Enzyme Engenieering. 1982; 6: 347-348.
19. Galaj M, Pietrzykowska M, Włodarczyk. Preliminary test of alcoholic fermentation of the different substrates using *Zymomonas mobilis* bacteria and distillery yeast. Przemysl Fermentacyjny i Owocowo Warzywny (Poland). 1994; 38 (9): 13-15.
20. García M, Quintero R, López A. Biotecnología Alimentaria. Primera edición. Limusa Editores. 1993; pp. 617-634.
21. Gibbs M, and Demoss R. D. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. Arch Biochem Biophys. 1977; 34:478-479.
22. Grote W, Lee K. J, Rogers P. L. Continuous ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters. 1980; 2: 481-486.
23. Han M. S, Chung D. H. Etanol production using Alginate immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 1992; 20 (5): 588-596.
24. Jain W. K, Díaz-Toran I, Baratti J. Continuous production of etanol from fructosa by immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis*. Biotechnology and Bioengineering. 1985; 27: 613-320.
25. Kluyver A. J, Hoppenbrouwers W. J. Ein merkwürdiges Gärungsbakterium: Lindner´s Termobacterium mobile. Arch Mikrobiol. 1931; 2:245-260.
26. Kosaric N, Wiecezorek A, Cosentino G. P, Mager R, Prenosil J. Ethanol fermentation. En Biotechnology. Ed. H. Dellweg. 1983; 3 (3): 257-385.
27. Lee K. J, Tribe D. E, Rogers P. L. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentration. Biotechnol. Lett. 1979; 1 (10): 421-426.
28. Linko P, Linko Y. Y. Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor. Biotechnology Letters. 1981; 3: 21-26.
29. McGhee J. E, Detroy R. W. Continuous and satatic fermentation of glucose to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Cells of different ages. Applied and Environmental Microbiology. 1982; 44: 19-22
30. Margaritis C. K, Perlman D. The use of immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in a novel fluized bioreactor to produce ethanol. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1982; 12: 147-159.

31. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annales Chemistry*. 1959; 31: 426-428.
32. Nelson N. A. Fotometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *Journal Biological Chemistry*. 1954; 153: 375-380.
33. Osman Y. A, Inrgam L. O. Mechanism of Ethanol of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *Biotechnology letters*. 1985; 164 (1): 173-180.
34. Perry R, Chilton C. *Biblioteca de Ingeniero Químico*. Quinta Edición. Mc.Graw – Hill, México. 1968; p.p. 3-90 – 3-120
35. Poutou R. A, Amador E, Candelario M. Banco de células primario (BCP): Características y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología Aplicada*. 1994; 11(1):55-59.
36. Poutou R. A, Gómez A, Torres C, Matiz A. Producción de etanol con cepas autóctonas de *Zymomonas mobilis mobilis* spp (Parte I: Aislamiento y caracterización bioquímica). *Revista de Investigación en Ciencias, Pedagogía y Didáctica de la Biología*. DISTRITALIA. Santafé de Bogotá, D.C. Colombia. 2000; 2: (1) 39-49.
37. Poutou R. A, Gómez A, Torres C, Matiz A. Producción de etanol con cepas autóctonas de *Zymomonas mobilis mobilis* spp (Parte II: Cultivo Discontinuo). *Revista de Investigación en Ciencias, Pedagogía y Didáctica de la Biología*. DISTRITALIA. Santafé de Bogotá, D.C. Colombia. 2000; 2: (1) 50-59.
38. Ryu S. R, Lee K. H. Comparison of immobilization matriz for etanol fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1997; 7(6): 438-440.
39. Skotnicki M. L, Lee K. J, Tribe D. E, Rogers P. L. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981; 41 (4): 889-893.
40. Skotnicki M. L, Warr R. G, Goodman A. E, Lee K. J, Rogers P. L. High productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. *Biochem Soc Symp*. 1983; 48: 53-86.
41. Rosevear A. *Biocatalizadores inmovilizados*. Segunda edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza-España. Capitulo 16. 1993
42. Somogy M. Notes on sugar determination. *Journal Biological Chemistry*. 1952; 195: 19-23.
43. Tanaka H, Ishikawa H, Osuga K, Takagi Y. Fermentative ability of *Zymomonas mobilis* under various oxigen supply conditions in batch culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering (Japan)*. 1990; 69:234-239.
44. Trevan M. D, Poltorak O. M, Chukhtrai E. S. Estabilidad en enzimas y células. *Biología Molecular y Biotecnología*. Segunda edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza-España Capitulo 15. 1990