



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Saccharomyces  
cerevisiae* EN FLOCULACIÓN INDUCIDA POR  
ADHESIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO  
FUNCIONALIZADOS**

**TESIS**

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de  
Ingeniería Química como requisito parcial para obtener el grado  
de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

Presentada por:

**Anahí Márquez López**

**Director de Tesis: Dr. en Ciencias en Ingeniería Química**

**Rafael Maya Yescas**

**Co-asesor: Dr. en Ciencias Juan Carlos González**

**Hernández**

**Morelia, Michoacán. Agosto de 2015.**

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue la producción de etanol en un proceso de fermentación mediante un biocatalizador constituido por flóculos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* inducidos por adhesión de nanotubos de carbono funcionalizados.

Los Nanotubos de Carbono fueron obtenidos por medio del método de rocío pirolítico, y funcionalizados con grupos carboxilo para permitir la interacción con la pared celular de la levadura.

El proceso de fermentación se llevó a cabo a nivel laboratorio, variando los factores que podrían influir en la variable de respuesta como, tiempo, temperatura, concentración de Nanotubos de carbono.

Se determinaron las mejores condiciones para llevar a cabo la fermentación en base a los porcentajes de etanol obtenidos son 30°C y 14 mg de nanotubos de carbono, además de que se determinó la influencia de cada uno de los factores mediante un programa estadístico.

**Palabras clave:** Nanotubos de carbono, etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentación, biocatalizador.

## Abstract

The objective of this work was to produce ethanol in a fermentation process using a biocatalyst consisting of *Saccharomyces cerevisiae* yeast flocs induced adhesion of functionalized carbon nanotubes.

Carbon nanotubes were obtained by the spray pyrolysis method, and functionalized with carboxyl groups to allow interaction with the cell Wall of yeast.

The fermentation process was conducted at laboratory level, varying the factors that might influence in the response variable as time, temperature, concentration of carbon nanotubes.

The best conditions were determined to perform based fermentation ethanol obtained percentages are 30°C and 14 mg of carbon nanotubes, in addition to the influence of each of the factors by statistical program was determined.

**Keywords:** Carbon nanotubes, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, biocatalyst.

# Contenido

Resumen .....	iv
Lista de tablas .....	viii
Lista de figuras.....	ix
Capítulo 1. Introducción .....	11
1.1 Antecedentes .....	12
1.2 Justificación.....	13
1.3 Planteamiento del problema.....	13
1.4 Hipótesis.....	13
1.5 Objetivo General .....	14
1.5.1 Objetivos Particulares .....	14
Capítulo 2. Marco teórico .....	14
2.1 Proceso de elaboración de la cerveza. ....	14
2.2 Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
2.2.1 Fases de crecimiento.....	16
2.3 Estructura de la pared celular de la levadura .....	18
2.4 Floculación .....	20
2.4.1 Teoría de las lectinas .....	21
2.4.2 Factores que afectan la floculación.....	21
2.5 Nanotubos de carbono .....	25
2.5.1 Técnicas de síntesis.....	26
2.5.2 Purificación.....	27
2.5.3 Funcionalización.....	28
2.5.4 Toxicidad de los nanotubos de carbono .....	29
Capítulo 3. Metodología .....	29
3.1 Síntesis de nanotubos de carbono por el método de rocío pirolítico .....	29
3.1.1 Preparación de la mezcla .....	30
3.1.2 Inyección de la mezcla al horno de reacción.....	30

3.2 Purificación y funcionalización de los nanotubos de carbono .....	31
3.2.1 Purificación.....	32
3.2.2 Funcionalización.....	32
3.3 Determinación de sitios activos.....	33
3.4 Inoculación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio extracto de levadura peptona glucosa (YEPD) cepa ale safale US-05 para su crecimiento.....	34
3.5 Inducción de la floculación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con nanotubos de carbono funcionalizados.....	35
3.6 Diseño de experimentos.....	36
Capítulo 4. Resultados.....	38
4.1 Síntesis de nanotubos de carbono por el método de rocío pirolítico .....	38
4.2 Purificación y funcionalización de nanotubos de carbono.....	39
4.3 Inducción de la floculación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con nanotubos de carbono funcionalizados .....	41
4.3.1 pH .....	45
4.3.2 Biomasa y sustrato .....	48
4.4 Número y tamaño de flóculos.....	50
4.5 Determinación de alcohol.....	54
4.6 Solución estadística del diseño de experimentos. ....	57
Capítulo 5. Conclusiones.....	67
Referencias Bibliográficas .....	68
Apéndice A. La cerveza como bebida .....	71
1. Ingredientes de la cerveza.....	71
1.1 Agua.....	71
1.2 Malta.....	72
1.3 Lúpulo .....	72
1.4 Levadura .....	72
2. Proceso de elaboración.....	73
2.1 Malteado.....	73
2.2 Macerado .....	74
2.3 Adición del Lúpulo .....	75

2.4 Fermentación .....	75
2.3 Envasado .....	76
3. Norma Oficial Mexicana para bebidas alcohólicas.....	76
Apéndice B. Formulación de medios de cultivo .....	78
Apéndice C. Determinación de sitios activos .....	78
Apéndice D. Determinación de peso seco .....	80
Apéndice E. Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS .....	81
Apéndice F. Conteo en cámara de Neubauer .....	83
Apéndice E. Cromatografía de gases .....	85
Apéndice F. Programa ImageJ .....	88

## Lista de tablas

Tabla 3. 1 Factores y variables del experimento.....	36
Tabla 3. 2 Variables fijas del experimento.....	36
Tabla 3. 3 Influencia de los niveles del experimento en los factores.....	37
Tabla 3. 4 Aleatorización de los experimentos.....	38
Tabla 4. 1 Nanotubos de carbono sintetizados. ....	39
Tabla 4. 2 Resumen de resultados de la levadura <i>S. cerevisiae</i> . ....	50
Tabla 4. 3 Porcentaje de etanol obtenido a diferentes condiciones de fermentación.....	54
Tabla 4. 4 Comparación del porcentaje de etanol obtenido en esta investigación con otras similares y con el proceso a nivel industrial. ....	55
Tabla 4. 5 Comparación del porcentaje de etanol obtenido en esta investigación con otras similares y con el proceso a nivel industrial. ....	56
Tabla 4. 6 Análisis de varianza. ....	58
Tabla 4. 7 Análisis de varianza. ....	63
Tabla 4. 8 Resumen de los factores que más influyen en las respuestas. ....	66

## Lista de figuras

Figura 2. 1 Proceso de elaboración de la cerveza. ....	15
Figura 2.2 Metabolismo fermentativo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	18
Figura 2.3 Estructura de la pared celular. ....	20
Figura 2.4 Formas alotrópicas del carbón. ....	26
Figura 2.5 Tipos de nanotubos de carbono según el número de capas.....	26
Figura 2.6 Método de roció pirolítico para la síntesis de nanotubos. ....	27
Figura 2.7 Fases del proceso oxidativo mediante tratamiento ácido: 1) Nanotubo con estructura completa, 2) Oxidación inicial en las puntas, 3) Oxidación final con grupos carboxílicos en las puntas. ....	28
Figura 2.8 Funcionalización covalente en las paredes del nanotubo. ....	28
Figura 3. 1 Preparación de la solución ferroceno/ $\alpha$ -pineno.....	30
Figura 3. 2 Síntesis de nanotubos de carbono. ....	31
Figura 3. 3 Proceso de purificación de nanotubos de carbono.....	32
Figura 3. 4 Proceso de funcionalización de nanotubos de carbono.....	33
Figura 4. 1 Nanotubos de carbono (NTC).....	39
Figura 4. 2 Comparación de la dispersión de nanotubos de carbono funcionalizados (izquierda) y sin funcionalizar (derecha).....	40
Figura 4. 3 Cinética de crecimiento de la levadura <i>S. cerevisiae</i> a diferentes temperaturas en mosto sin nanotubos de carbono. ....	42
Figura 4. 4 Comparación del crecimiento celular a 25°C entre el blanco y el medio con nanotubos de carbono.....	43
Figura 4. 5 Comparación del crecimiento celular a 30°C entre el blanco y el medio con nanotubos de carbono. ....	44
Figura 4. 6 Comparación del crecimiento celular a 35°C entre el blanco y el medio con nanotubos de carbono.....	44
Figura 4. 7 Monitoreo del pH del mosto de fermentación a 25°C.....	46
Figura 4. 8 Monitoreo del pH del mosto de fermentación a 30°C.....	46
Figura 4. 9 Monitoreo del pH del mosto de fermentación a 35°C.....	47
Figura 4. 10 Consumo de sustrato y producción de biomasa, 25°C.....	48

Figura 4. 11 Consumo de sustrato y producción de biomasa, 30°C.....	49
Figura 4. 12 Consumo de sustrato y producción de biomasa, 35°C.....	49
Figura 4. 13 Imágenes de flóculos procesadas en ImageJ.....	51
Figura 4. 14 Número de flóculos formados respecto al tiempo de reacción para cada condición.....	51
Figura 4. 15 Tamaño de flóculo, 25 °C, 10 mg de Nanotubo de Carbono. ....	52
Figura 4. 16 Tamaño de flóculo, 25 °C, 18 mg de Nanotubos de carbono. ....	52
Figura 4. 17 Tamaño de flóculo, 30 °C, 14 mg de Nanotubos de Carbono. ....	53
Figura 4. 18 Tamaño de flóculo, 35 °C, 10 mg de Nanotubo de Carbono. ....	53
Figura 4. 19 Tamaño de flóculo, 35 °C, 18 mg de Nanotubos de carbono. ....	54
Figura 4. 20 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados, $\alpha=0.05$ . Respuesta etanol.....	58
Figura 4. 21 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados, $\alpha=0.1$ . Respuesta etanol.....	59
Figura 4. 22 Gráfica normal de efectos estandarizados. $\alpha= 0.10$ . ....	59
Figura 4. 23 Gráfica de respuestas (medias ajustadas) de etanol.....	60
Figura 4. 24 Gráfica de efectos principales para etanol.....	60
Figura 4. 25 Gráfica de superficie de etanol vs. Tiempo, temperatura. ....	61
Figura 4. 26 Gráfica de superficie de etanol vs. NTC, temperatura.....	61
Figura 4. 27 Gráfica de contorno de etanol vs. Tiempo, temperatura.....	62
Figura 4. 28 Gráfica de superficie Etanol vs. Tiempo, temperatura, testigo sin Nanotubos de Carbono. ....	62
Figura 4. 29 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados. $\alpha= 0.05$ . Respuesta No. de flóculos.....	63
Figura 4. 30 Gráfica normal de efectos estandarizados. $\alpha= 0.1$ . ....	64
Figura 4. 31 Gráfica de línea ajustada.....	65
Figura 4. 32 Gráfica de superficie de No. de flóculos vs. NTC, temperatura. ....	65
Figura 4. 33 Gráfica de superficie de No. de flóculos vs. Tiempo, temperatura. ....	66

## Capítulo 1. Introducción

La producción de cerveza se lleva a cabo por medio de un proceso discontinuo, a través del metabolismo de células de levadura, que son microorganismos que llevan a cabo un fenómeno de particular importancia en la industria cervecera, denominado floculación, que engloba distintos aspectos fisiológicos, bioquímicos y genéticos de las levaduras, además de influir en los costos de producción de la cerveza como producto final (Valero, 2008).

Es un mecanismo de agregación celular asexual, donde la célula se adhiere, reversiblemente, a otra célula, para formar flóculos microscópicos que sedimentan en la suspensión. Posteriormente, pueden ser retiradas del fondo y empleadas para una siguiente fermentación (Walker, 1998).

Al ser la floculación un proceso reversible, la misma cepa de levadura puede ser usada para distintas fermentaciones, o distintos procesos de elaboración de cerveza.

Esta característica de formar aglomerados celulares, ha suscitado el interés de esta investigación para la producción de un biocatalizador, utilizando nanotubos de carbono funcionalizados como soporte, para inducir la floculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, facilitando la separación del medio, además de mantener la capacidad fermentativa de la levadura reflejada en la producción de etanol.

## 1.1 Antecedentes

La producción de cerveza en un proceso semicontínuo puede ser considerada como la primera industria desarrollada por la humanidad, hace más de 5,000 años. Con la finalidad de reutilizar la levadura utilizada para la fermentación, disminuyendo las dificultades por transferencia de masa interna y extra, así como evitar cambios en el sabor debido al material utilizado como soporte, se comenzó a realizar la síntesis de biocatalizadores por adhesión utilizando diversos soportes como:

- Bagazo de cerveza, realizado por Brányik (2004), quien logró retención de células, sin embargo, este método no es óptimo para fermentaciones ya que la unión se realizó por la incrustación de la levadura en los huecos del soporte, haciéndola poco estable.
- Yu (2007) utilizó como soporte bagazo de sorgo, pero al igual que el anterior su adhesión se realizó en los huecos del soporte, dando como resultado que la unión fuese poco estable.
- También partes de frutos como, pedazos de manzana (Kourkoutas, 2002) y cascaras de naranja (Plessas, 2007) han sido utilizados como soporte. Estos soportes presentaron baja cantidad de levadura inmovilizada y la desventaja de que son productos perecederos, por los que su reutilización está limitada.

La síntesis de biocatalizadores de levadura *S. cerevisiae* por adhesión de nanotubos de carbono funcionalizados a su estructura no ha sido reportada en literatura. Algunas investigaciones previas a este trabajo son:

- López-Tinoco (2009) perfeccionó el método de síntesis de nanotubos de carbono por rocío pirolítico, utilizando como hidrocarburo  $\alpha$ -pineno y ferroceno como catalizador, llegando a tener 1.88 gr de nanotubos por 0.015 mol/litro de  $\alpha$ -pineno, siendo un método viable para la síntesis de nanotubos de carbono.
- Higginson (2010) utilizó nanotubos de carbono en alambres de acero inoxidable, los nanotubos no fueron funcionalizados y la levadura se adhirió a los huecos presentes entre los nanotubos de carbono que formaban la capa; su inmovilización no fue exitosa.
- Mamvura (2010) utilizó el concepto de unir los nanotubos de carbono a la levadura, usando iones de calcio para inducir la floculación. La inmovilización la realizó en agar extracto de malta variando las condiciones de temperatura, pH, concentraciones de calcio, concentración de nanotubos de carbono y velocidad de agitación. Con esto determinó las condiciones apropiadas para la inmovilización exitosa por floculación utilizando

nanotubos de carbono. Sin embargo, al someter el biocatalizador a un medio de extracto de malta para la fermentación, la levadura se separó del nanotubo, deshaciéndose los flóculos, indicando que este es un proceso reversible por lo cual no es apto para condiciones de fermentación.

En base a estos antecedentes surge la idea de adherir nanotubos de carbono funcionalizados a la pared celular de la levadura para crear flóculos creando enlaces estables que puedan someterse a condiciones de fermentación y sean eficientes. El método mejorado de síntesis de nanotubos de carbono propuesto por López-Tinoco (2009) será utilizado en este trabajo.

## 1.2 Justificación

En el proceso de producción de cerveza la separación de la levadura del medio de fermentación, representa un costo adicional, una forma de favorecer a este proceso sería utilizando nanotubos de carbono funcionalizados afines a la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de inducir la floculación controlada de esta levadura, favoreciendo la producción de etanol y facilitando su separación (mecánica) tras la etapa de fermentación.

## 1.3 Planteamiento del problema

La producción de cerveza se realiza por un proceso discontinuo, con células de levadura libres para realizar la fermentación, que requiere de ultra-filtración para separar la levadura. Esto ha suscitado el interés por la investigación del uso de flóculos de células en el proceso, para reducir tiempos de producción, mantener la producción de etanol y facilitar la separación mecánica de los microorganismos. Sin embargo, a la fecha, no se ha encontrado una técnica de síntesis de un biocatalizador mediante la inducción de formación de flóculos de levadura. En este trabajo, esta inducción se realizará utilizando nanotubos de carbono, debido a su resistencia mecánica y a que se pueden funcionalizar con grupos afines a la levadura, formando biocatalizadores que se puedan ser reutilizados.

## 1.4 Hipótesis

Si los nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilo interactúan con la pared celular de la levadura, se formarán flóculos favoreciendo la separación mecánica de los microorganismos sin disminuir la producción de etanol por fermentación.

## 1. 5 Objetivo General

Producir etanol en un proceso de fermentación mediante un biocatalizador constituido por flóculos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* inducidos por adhesión de nanotubos de carbono funcionalizados.

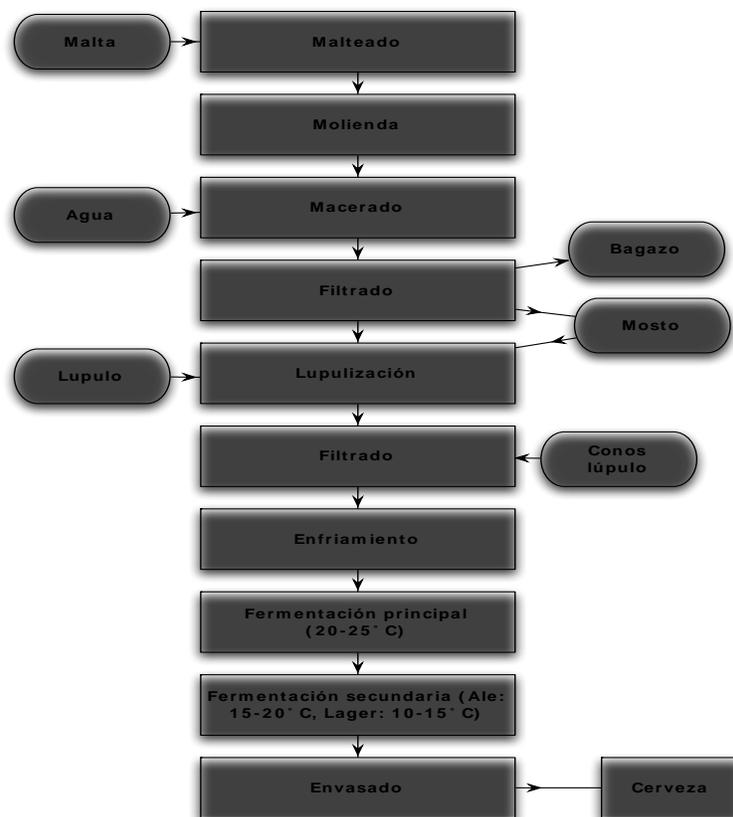
### 1.5.1 Objetivos Particulares

1. Obtener nanotubos de carbono de pared múltiple (por el método de rocío pirolítico), y funcionalizarlos con grupos carboxilo.
2. Evaluar efectos de temperatura, tiempo y concentración de nanotubos de carbono sobre la capacidad de floculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Realizar fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae*, en ausencia y presencia de nanotubos de carbono, para evaluar la producción de etanol en un medio cervecero.
4. Determinar el perímetro del flóculo y su evolución durante la fermentación.

## Capítulo 2. Marco teórico

### 2.1 Proceso de elaboración de la cerveza.

La cerveza es la bebida fermentada hecha a partir de granos de cereal malteados. Actualmente, su elaboración se realiza en un proceso por lotes.



**Figura 2. 1 Proceso de elaboración de la cerveza.**

El sabor de la cerveza depende de múltiples factores, tales como los iones presentes en el agua, la temperatura de malteado de la cebada, la cepa de levadura, así como de las condiciones de fermentación. La levadura que se utiliza para la fermentación alcohólica en la industria cervecera es *S. cerevisiae*, de fermentación alta para producir cervezas tipo ale o de fermentación baja para cervezas tipo lager (ver Apéndice A).

## 2.2 Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son microorganismos unicelulares, pertenecen al reino protista, con características de células superiores, no fotosintéticas y con pared celular rígida (Jin y Speers, 1998); se clasifican dentro de la familia de los hongos. Se pueden reproducir de dos maneras:

- Asexualmente, por gemación o por fisión binaria.- La formación de la yema, desde la célula madre es el primer paso. Una vez que se ha alcanzado el

tamaño de la célula madre, ocurre la división nuclear y el contenido genético de la madre pasa a la célula hija. Finalmente se da la división de la pared celular y la separación de la levadura en dos células individuales (Walker, 1998).

- Sexualmente, mediante la formación de ascosporas o basidiosporas (Carlile et al., 2001).

La gran importancia de las levaduras para los seres humanos radica en su alta capacidad de crecimiento en soluciones ricas en nutrientes, especialmente en soluciones ricas en azúcares, de ahí su significado en la producción o deterioro de gran número de alimentos o bebidas (Campbell, 2000).

La más conocida de las levaduras es *S. cerevisiae*. Es un habitante natural de la superficie de frutas, y ha sido usada desde hace mucho tiempo en la producción de bebidas alcohólicas y panificación (Jin y Speers, 1998). *S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo. Las células son ovals o elípticas, su tamaño varía entre 5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , (Kunze, 1999). Bioquímica y genéticamente es uno de los organismos más estudiados, usándose como modelo para el estudio de manipulación genética y biotecnología encaminadas a otros organismos (Carlile y cols., 2001).

### 2.2.1 Fases de crecimiento

*S. cerevisiae* presenta metabolismo respiratorio y fermentativo, dependiendo de la presencia o no de oxígeno y puede duplicarse en alrededor de 90 minutos (Walker, 1998). La fuente de carbono que prefieren es la glucosa; la incorporación de ésta al interior de la célula se realiza a través de transporte trans-membrana por proteínas de alta especificidad, o por difusión cuando el equilibrio entre el interior y exterior de la célula debe ser alcanzado. Los disacáridos pueden ser transportados al interior de la célula o hidrolizados a monosacáridos más asimilables, por enzimas extracelulares (sacarosas) (Carlile et al., 2001). Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono (Folch-Mallol, 2004):

- a) Fase lag.- Es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse.
- b) Fase logarítmica.- Las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo metabolismo fermentativo del que se produce etanol.
- c) Cambio diáuxico.- Al disminuir la concentración de glucosa las células atraviesan este cambio, en este periodo no hay división, y la célula cambia de metabolismo fermentativo a respiratorio.
- d) Fase postdiáuxica.- Las células usan como fuente de carbono, el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente.
- e) Fase estacionaria.- se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y ya no hay división celular.

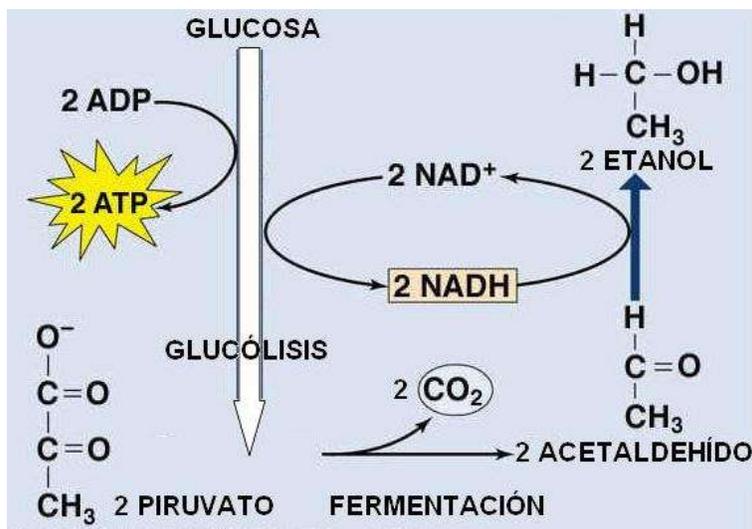
Durante la fase logarítmica la conversión de azúcares a alcohol por esta levadura está dada por la ecuación:



El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO<sub>2</sub> por 1 g de glucosa (Chu, 1991). En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90 y 95% del teórico, es decir de 0.469 a 0.485 g de etanol/ g de glucosa. Los rendimientos en la industria varían de 70-80% del rendimiento teórico (García et al., 2004).

El proceso de fermentación se divide en dos etapas, llamadas fermentación principal y secundaria. Durante la primera se lleva a cabo la descomposición de los hidratos de carbono presentes en el mosto mediante la glucólisis en el citoplasma de la célula a través de la ruta de Embden-Meyerhof (Higgison, 2010). Las mitocondrias se encargan de la producción de ATP en condiciones aerobias. El contenido de oxígeno disuelto determina la forma de crecimiento de la levadura; cuando es alto se presenta mayor crecimiento de biomasa, sin embargo la producción de etanol es baja; anaerobio en el que el contenido de oxígeno es bajo, hay mayor conversión a etanol y menor producción de

biomasa. La vía metabólica para la producción de etanol se muestra en la Figura 2.2.



**Figura 1.2 Metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Este proceso fermentativo también produce compuestos como glicerol, ésteres, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes superiores, ceto ácidos,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , diacetilo, y muchos otros productos en concentraciones extremadamente bajas, los cuales proporcionan sabor a la cerveza (Higgison, 2010).

### 2.3 Estructura de la pared celular de la levadura

La pared celular de la levadura es una estructura con gran plasticidad, que le da forma a la célula, controla la permeabilidad celular y la protege de los cambios osmóticos (Klis, 2002). Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, por lo cual conocer su estructura es de suma importancia para este proyecto.

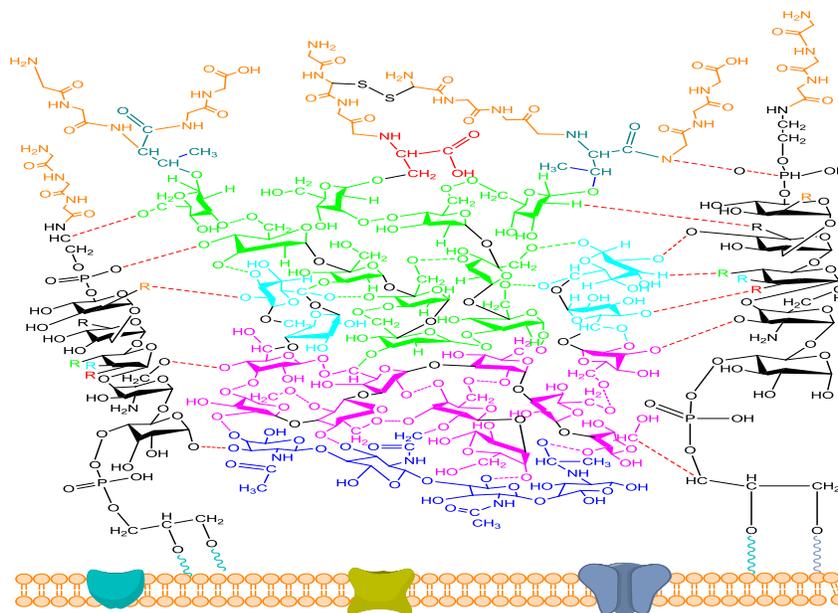
La pared celular representa entre el 20 y el 30% de la célula en peso seco (Aguilar, 2005), está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos se encuentran: quitina (que representa el 1-2% del peso seco de la pared celular), glucanos que están presentes como  $\beta$ -1,6-glucano (5-10% peso seco),  $\beta$ -1,3-glucano (50-55% peso seco) y manosa que están unidas a proteínas formando las manoproteínas (35-40% peso seco) (Klis, 2002). Para su estudio y comprensión se dice que la pared celular está

compuesta por dos capas, una compuesta de glucanos y otra de manoproteínas, ambas capas no están separadas (Aguilar, 2005).

- **Glucanos:** El glucano es el polisacárido estructural más importante. Los polímeros de glucanos están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,6-glucano y  $\beta$ -1,3-glucano, siendo este último el componente estructural más importante al que se le unen otros componentes. El  $\beta$ -1,3-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, llamadas glucano sintetasas, que catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1500 residuos de glucosa por enlaces  $\beta$ -1,3. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas (Klis, 2002). Los  $\beta$ -1,6-glucano están formados por aproximadamente 150 glucosas, se interconecta con los  $\beta$ -1,3-glucanos y las manoproteínas.
- **Quitina:** Consiste de alrededor de 190 monómeros de N-acetilglucosamina, está unida a  $\beta$ -glucanos. Juega un papel importante durante la morfología y formación de células durante el ciclo, y su principal función es formar la cicatriz durante la separación madre e hija (Aguilar, 2005).
- **Manoproteínas:** Las manoproteínas se encuentran ubicadas en la capa externa ancladas a la capa interna de  $\beta$ -glucanos. Son las responsables de la pared, juegan un rol de filtro selectivo. Químicamente las proteínas con proteoglucanos que contienen de 5 a 20% de porción peptídica y entre un 80 y 95% de cadenas de azúcar manosa, la cual está unida a proteínas por restos de serina o treonina (Klis, 2002), entre los aminoácidos restantes que conforman la cadena peptídica se encuentran: alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, tirosina, prolina, triptófano, valina, ácido glutámico y ácido aspártico (Klis, 2002).

La composición cuantitativa de la pared celular cambia dependiendo de las condiciones del medio, como concentración y pH, así como la edad de las células (Aguilar, 2005). De acuerdo a los estudios realizados por Aguilar Usanas, donde sometió la levadura a diferentes fuentes de carbono y diferentes pH, se encontró que a pH de 5 (que es cercano al óptimo de fermentación) y usando glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa, se presenta mayor concentración de manoproteínas, lo cual indica que es la estructura que puede servir para que la levadura sea anclada a un soporte.

De acuerdo con la información proporcionada por Klis (2002), la estructura de la pared celular se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.2 Estructura de la pared celular.**

- Quitina, ●  $\beta$ -1,3 glucano, ●  $\beta$ -1, 6 glucano, ●  $\alpha$ -1,5 manosa, ● GPI (Glucosil Fosfatil Inositol), ● proteínas, ● Serina, ● Treonina, ●  $\alpha$ -1,2 manosa, ● Fosfoetanolamina, ● Galactosa, ● N-acetilglucosamina.

## 2.4 Floculación

La levadura de cerveza *S. cerevisiae* tiene capacidad de adherirse a superficies inertes, así como a otras células de levadura, formando flóculos, proceso que se le conoce como "floculación" (Dengis et al., 1995). Este es un proceso reversible, el cual tiene inicio al final de la fermentación alcohólica, cuando los azúcares disponibles han sido transformados en etanol y dióxido de carbono, y se observa un proceso de adherencia célula—célula. Dependiendo de la levadura que se utilice, los flóculos pueden sedimentar o flotar (Verstrepen et al., 2006).

Las proteínas presentes en la pared celular de una célula se adhieren a los residuos presentes en la pared celular de otra célula adyacente. Sin embargo, la definición del término adherencia en mohos y levaduras define el mecanismo mediante el cual estos organismos se fijan al tejido de un hospedador para establecer su sitio de infección (Verstrepen et al., 2006). La diferencia radica

en que, para cada caso, se expresa en la superficie celular un grupo diferente de proteínas, que para el caso de la levadura son llamadas floculinas o adhesinas, (Lesage et al., 2006).

### 2.4.1 Teoría de las lectinas

Propuesta por Miki et al. (1982) para explicar el proceso de floculación. Las lectinas son proteínas específicas presentes en la pared celular de las células floculantes, que en presencia de calcio adoptan su conformación activa y son capaces de unirse a azúcares residuales, que funcionan como receptores en la superficie celular formando glucoproteínas y provocando la floculación (Soares et al., 2004). Las lectinas de la pared celular de las levaduras son las floculinas (FLO), término propuestos para designar a las proteínas presentes en la pared celular relacionadas con el proceso de floculación en levaduras, específicamente en *S. cerevisiae*, la floculina Flo1, es la lectina involucrada en el proceso de floculación, polipéptido rico en serina y treonina (Straver et al., 1994).

Durante la fase de crecimiento de la levadura, las lectinas y los receptores no están presentes en la superficie celular o se encuentran presentes pero no activos. Se han reportado dos mecanismos de acción en el proceso de floculación:

- 1) Adhesión entre lectinas. También conocida como adhesión sensible a azúcares, como su nombre lo indica, la adhesión depende de la unión de las lectinas a los residuos de azúcares de las células vecinas, debido a que las lectinas contienen un sitio de unión a fin a los carbohidratos, siendo específica para cada uno.
- 2) Adhesión no sensible a azúcares. Las lectinas enlazan péptidos en lugar de azúcares, o incrementan la hidrofobicidad de la superficie celular, lo que promueve las interacciones hidrofóbicas entre las células y ciertas superficies abióticas (Verstrepen et al., 2006).

### 2.4.2 Factores que afectan la floculación.

#### **a) Factores genéticos**

La floculación de levaduras cerveceras está genéticamente determinada. Estas diferencias se deben por la composición de la pared celular entre cepas. Distintos tipos de poblaciones celulares han sido identificadas como fenotipos

de floculación basados en su capacidad de ser inhibidos por azúcares y enzimas proteolíticas. Cuatro fenotipos han sido propuestos, tomando en cuenta la presencia de la floculina (FLO), pH, sensibilidad a la inhibición por azúcares y los requerimientos de etanol para producir la floculación, (Jin y Speers, 1998):

- FLO: Inhibida por manosa.
- NewFLO: inhibida por manosa, maltosa, glucosa y sacarosa.
- MI: no sensible a manosa.
- Etanol- dependiente.

La mayoría de las cepas de levadura cervecera, pertenecen al fenotipo NewFLO, que floculan en la fase estacionaria de crecimiento y son inhibidas por manosa, maltosa, glucosa y sacarosa (Jin y Speers, 1998; Verstrepen et al., 2006).

Las levaduras cerveceras son recogidas al final de la fermentación para ser reutilizadas alrededor de 10-15 fermentaciones sucesivas, debido al número de divisiones que acarrea durante los procesos. A consecuencia de la edad, las células sufren modificaciones en términos de fisiología, morfología y expresión genética, llegando a repercutir en su capacidad de metabolizar azúcares, alcohol y la pérdida en la capacidad de floculación (Powell et al, 2003).

#### **b) Factores físicos y químicos**

- *Presencia de calcio.* Se encuentra reportado en literatura el calcio como un modulador de la interacción de las lectinas entre levaduras, formando uniones carboxílicas entre estas y disminuyendo la repulsión electrostática. Además puede ser revertido por la adición de agentes quelantes. La presencia de magnesio, sodio o potasio, se induce la floculación por la estimular la liberación de iones de calcio intracelulares (Jin y Speers, 1998).
- *pH.* El pH es determinante en la floculación. Está directamente relacionado con el punto isoeléctrico de las proteínas de membrana. Valores muy altos de pH alteran los grupos de ionización de dichas proteínas y causan cambios en su conformación. La floculación ocurre hacia el fin de la fermentación, cuando el valor del pH en el mosto se ha reducido de 5,2 hasta 4,0-4,5 (Jin y Speers, 1998). Dengis et al. (1995)

encontraron que cepas de levaduras de fermentación alta flocculan a pH entre 3-4,5 y las cepas de fermentación baja lo hacen a pH entre 3,5-6. Cambios en el pH óptimo de floculación pueden inducir a alteraciones como la no floculación de las células (Stratford, 1996). En las cepas de fermentación alta, pH mayores de 5,2 inducen a la pérdida de la capacidad de floculación (Dengis et al., 1995). De acuerdo con Stratford y Assinder (1991), algunas cepas fermentan en el mosto pero muestran poca o ninguna floculación en medios de cultivo de laboratorio, como YEPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa). El medio YEPD posee un pH inicial de 6,2 y la alta capacidad reguladora genera al final un pH de alrededor de 5,3 que no es apropiado para la floculación.

- *Azúcares*. La presencia de carbohidratos fermentables,  $\alpha$ -aminoácidos y otros nutrientes son determinantes para que se produzca el crecimiento de la levadura, y por ende, la disminución de estos compuestos conlleva a la floculación (Jin y Speers, 1998). Estudios han demostrado la preferencia de la levadura *S. cerevisiae* para metabolizar primariamente la glucosa dentro del tanque de fermentación, y la fructosa, maltosa, manosa y otros azúcares son usados de manera análoga con la glucosa (Berthels et al., 2004). Cuando la glucosa está disponible en el medio de cultivo, se activa un sistema de regulación que reprime la expresión de los genes implicados en el proceso de respiración y de la utilización de otras fuentes de carbono. Una vez que se agota la glucosa, un nuevo grupo de genes que codifican para otro azúcar son activados.
- *Etanol*. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol, donde se utiliza glucosa como principal fuente de carbono (Cunha et al., 2008). Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, que es un periodo breve en el cual no hay división y la célula cambia del metabolismo fermentativo al respiratorio. En la fase post-diáuxica las células utilizan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés. Esta utilización del etanol le

indica a la célula que los nutrientes del medio se han agotado, por lo que el etanol y otros alcoholes tienen un efecto promotor de la floculación (Jin y Speers, 1998). El etanol induce cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular. El alcohol se absorbe a la superficie celular, pues como solvente orgánico se asocia a las proteínas de superficie vía interacciones hidrófobas, y al ser miscible en agua reduce la constante dieléctrica de la solución (Jin et al., 2001; Jin y Speers, 1998). Ciertas células en la etapa exponencial de crecimiento pierden la capacidad de floculación con la adición de etanol al medio de crecimiento (Dengis y cols., 1995). Se ha reportado que la adición de etanol no influye en la floculación durante la fase estacionaria de levaduras de fermentación baja pero sí en las de fermentación alta (Jin y Speers, 1998).

- *Oxígeno.* La agitación causada por corrientes convectivas dentro del tanque fermentador y el tamaño y la geometría son determinantes en la cantidad del oxígeno disuelto dentro del medio (Jin y Speers, 1998). El oxígeno es utilizado en etapas tempranas de la fermentación para la producción de ácidos grasos insaturados y esteroides esenciales en la constitución de la membrana celular de las levaduras. Cuando el oxígeno es insuficiente, se dificulta el crecimiento de la célula. La floculación temprana de las levaduras se observa cuando disminuye el oxígeno disuelto en el mosto (Jin et al., 2001; Jin y Speers, 1998). En los sistemas bien agitados las células experimentan mayor probabilidad de colisionar entre sí, llegando a formar flóculos. Aunque la agitación y la floculación exhiben una correlación positiva, un aumento en la intensidad de agitación conduce a la disminución del tamaño de los flóculos, mientras que una agitación suave disminuye su tamaño (Mamvura, 2010).
- *Temperatura.* El intervalo de temperatura de floculación en levaduras cerveceras se encuentra entre 15-35° C, coincidiendo con el óptimo de crecimiento de éstas. Un incremento de 10 a 15° C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de

proteína llamadas HSP (de las siglas en inglés Heat Shock Proteins), proteasas y chaperonas moleculares involucradas en la desnaturalización o desnaturalización de proteínas, la degradación de proteína mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos (Folch-Mallol et al., 2004). La disolución de los flóculos puede ser alcanzada calentando el medio hasta 50-60°C (Jin y Speers, 1998). Dicha defloculación puede ser revertida con el enfriamiento.

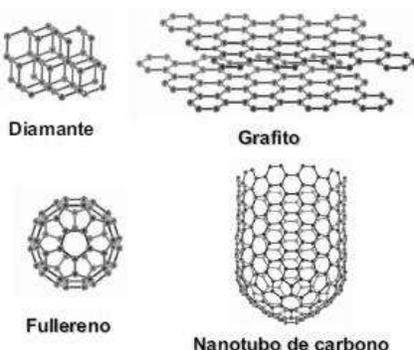
- *Hidrofobicidad.* Investigaciones han sugerido que la carga de la superficie celular, o hidrofobicidad, es determinante en la capacidad de floculación de levaduras (Walker, 1998). El comienzo de la floculación coincide con un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular (Dengis et al., 1995), ya que su interacción con el agua disminuye, facilitándose así el retiro de la misma de la superficie celular para permitir el contacto de las proteínas de membrana de células adyacentes (Jin et al., 2001). Verstrepen y colaboradores (2001) demostraron que la hidrofobicidad se manifiesta durante la fase estacionaria, cuando FLO1 esta expresado. No se observan diferencias durante la fase exponencial, donde no hay expresión de estos genes. Amory y Rouxhet (1988) determinaron que las levaduras de fermentación alta son sistemáticamente más hidrofobicas y con baja carga negativa, a pH 4, que las levaduras de fermentación baja. Se ha estudiado la hidrofobicidad de la superficie celular de cepas de levaduras cerveceras en relación con el estrés fisiológico. Dengis y colaboradores (1995) indican que cambios en la carga superficial de la cepa de levadura pueden ser observados al cambiar las condiciones de cultivo, niveles de calcio y etanol, cuando se somete la célula a condiciones extremas.

## 2.5 Nanotubos de carbono

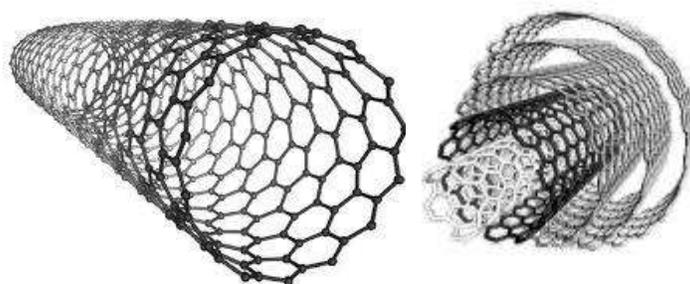
En 1991, Iijima caracterizó una nueva forma alotrópica del carbón (Figura 2.4), a la que denominó nanotubo de carbono (NTC). Los NTC se pueden clasificar en dos tipos diferentes según el número de capas (Figura 2.5):

- a) De capa múltiple, que son aquellos formados por capas concéntricas y

b) De capa simple, que se describen como una capa de grafito enrollada una sola vez, formando un cilindro.



**Figura 2.3 Formas alotrópicas del carbón.**



**Figura 2.4 Tipos de nanotubos de carbono según el número de capas.**

Algunas de las características principales que hacen a los nanotubos de carbono aptos para su utilización en procesos biológicos son: resistencia mecánica, no son degradables, baja densidad, flexibles a deformaciones perpendiculares al eje (Higgison, 2010), pero sobre todo la posibilidad de funcionalización, dando como resultado cambios en las propiedades físico-químicas de la superficie, que permiten solubilidad y dispersión en medios acuosos, pudiendo exhibir mejor interacción con moléculas biológicas.

### 2.5.1 Técnicas de síntesis

Los nanotubos de carbono se pueden sintetizar por diversos métodos, entre los que se encuentran ablación laser, descarga de arco eléctrico, deposición química en fase de vapor (Chemical Vapor Deposition, CVD) (Gou, 1995) y roció pirolítico (Kumar, 2004). El método CVD es el más popular para sintetizar nanotubos de carbono, sin embargo el método de roció pirolítico es más simple y barato que los demás métodos. El método de roció pirolítico se deriva del

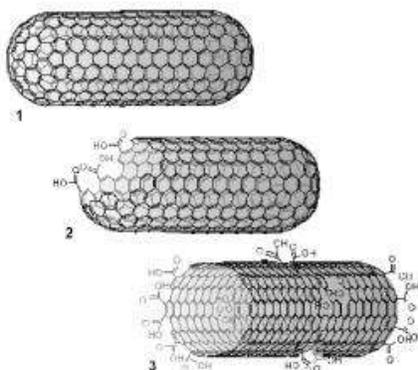
método CVD, su principal diferencia es que la pirólisis de la fuente de carbono y el depósito de los nanotubos de carbono ocurre simultáneamente en el horno, mientras que en CVD ocurre en dos pasos (en dos hornos). La síntesis por rocío pirolítico se realiza por la nebulización de un hidrocarburo con un catalizador que comúnmente es una aleación metálica hierro, cobalto y el níquel (Díaz, 2008) a 800°C, y se utiliza un gas inerte de arrastre que transporta las partículas nebulizadas hacia el horno. Las partículas de catalizador se depositan en la pared del horno y se comienzan a incorporar especies de carbón hasta formar los nanotubos.



**Figura 2.5 Método de rocío pirolítico para la síntesis de nanotubos.**

### 2.5.2 Purificación

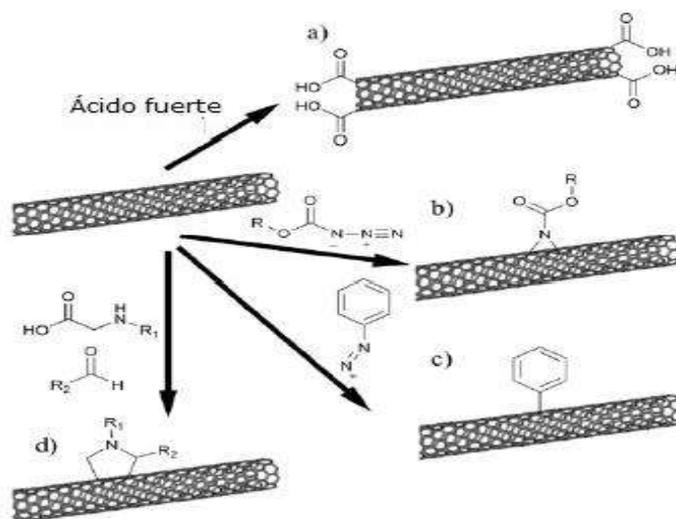
Para eliminar impurezas metálicas del nanotubo de carbono se realiza una purificación, la cual consiste en el tratamiento a temperaturas moderadas o altas con un ácido fuerte, como ácido clorhídrico. Bajo estas condiciones se produce la disolución del residuo metálico junto con la oxidación parcial del nanotubo de carbono y de residuos de carbón amorfos. Dependiendo del tamaño de estos últimos y de la temperatura y la concentración de ácido empleada, se puede producir acortamiento de la longitud de los nanotubos de carbono por degradación oxidativa de los enlaces C-C, provocando la ruptura de las puntas de los nanotubos y obteniéndose la funcionalización con grupos carboxilo.



**Figura 2.6 Fases del proceso oxidativo mediante tratamiento ácido: 1) Nanotubo con estructura completa, 2) Oxidación inicial en las puntas, 3) Oxidación final con grupos carboxílicos en las puntas.**

### 2.5.3 Funcionalización

La funcionalización se define como la modificación de propiedades por adsorción de átomos o generación de moléculas en las paredes exteriores de los nanotubos de carbono, mediante la oxidación a partir de la reacción con ácido nítrico y una mezcla de ácido nítrico con ácido sulfúrico. Con este tratamiento se producen grupos carboxílicos, y en muchos casos su activación a cloruros de acilo, permite el acoplamiento de moléculas por medio de unión covalente formando enlaces tipo éster y amida (Figura 2.8).



**Figura 2.7 Funcionalización covalente en las paredes del nanotubo.**

La funcionalización por medio de enlaces covalentes ha resultado muy prometedora, ya que forma un enlace fuerte entre los grupos funcionales adicionados y la pared del nanotubos de carbono. Sin embargo, pueden existir dos tipos de funcionalización: a) covalentes, en las cuales se introducen grupos funcionales creando un enlace descrito anteriormente, y b) unión por medio de adsorción, que se realiza con antraceno y derivados (Andrade, 2012).

Los grupos funcionales presentes en el nanotubo pueden interaccionar con otras moléculas químicas para formar enlaces. Esta característica ha sido atractiva para poder unir levaduras cerveceras a los nanotubos de carbono. Sin embargo, existe controversia por la toxicidad potencial de este material.

#### 2.5.4 Toxicidad de los nanotubos de carbono

Existe controversia sobre si la utilización de nanotubos de carbono es perjudicial a la salud. Se realizó una revisión bibliográfica encontrando diversas aplicaciones biológicas de este material, entre las que se encuentran la funcionalización de nanotubos de carbono para la interacción con moléculas de ADN, proteínas y enzimas para su uso como biosensores electroquímicos. La unión de anticuerpos específicos para su utilización en pruebas de detección de cáncer así como aplicación como tratamientos alternativos (Yang, 2007).

Se han desarrollado filtros para la inactivación microbiana, teniendo como resultado la inactivación de *E. coli* y *Staphylococcus epidermis*. Además son utilizados en el transporte y suministro de fármacos (Andrade, 2012). Debido a estos estudios previos en procesos biológicos, es de interés su utilización, además por sus características que podrían inducir la floculación de *S. cerevisiae*.

## Capítulo 3. Metodología

### 3.1 Síntesis de nanotubos de carbono por el método de rocío pirolítico

#### **Reactivos**

- Ferroceno (98%,Alrich)
- $\alpha$ -pineno (98%,Aldrich)

- Argón (99.99%, INFRA)

### Equipo

- Tubo de cuarzo tipo Vycor
- Horno tubular eléctrico de reacción Barnstead Thermolyne modelo 21100
- Nebulizador
- Bomba peristáltica

### 3.1.1 Preparación de la mezcla

Se midieron 25 ml de  $\alpha$ -pineno y se mezclaron con 0.93 g de ferroceno, esta solución se puso en el ultrasonido para la disolución de las partículas de ferroceno.



**Figura 3. 1 Preparación de la solución ferroceno/ $\alpha$ -pineno.**

### 3.1.2 Inyección de la mezcla al horno de reacción

Se inyecta la solución ferroceno/ $\alpha$ -pineno a un tubo de cuarzo, el cual se encuentra dentro de un horno de reacción a 800° C. Esta solución se hizo pasar a través de un nebulizador utilizando 2.5 lpm de argón como gas de arrastre, además se utilizó una bomba peristáltica para mantener un nivel constante en el nebulizador de 4 cm<sup>3</sup> y el llenado del mismo.



**Figura 3. 2 Síntesis de nanotubos de carbono.**

### 3.2 Purificación y funcionalización de los nanotubos de carbono

Los reactivos y equipos utilizados para la purificación de los nanotubos de carbono son:

#### **Reactivos:**

- Ácido clorhídrico.(J. T. Baker, 99% pureza)
- Agua desionizada
- Ácido nítrico. (J. T. Baker, 65% pureza)
- Ácido sulfúrico .(J. T. Baker, 99% pureza)

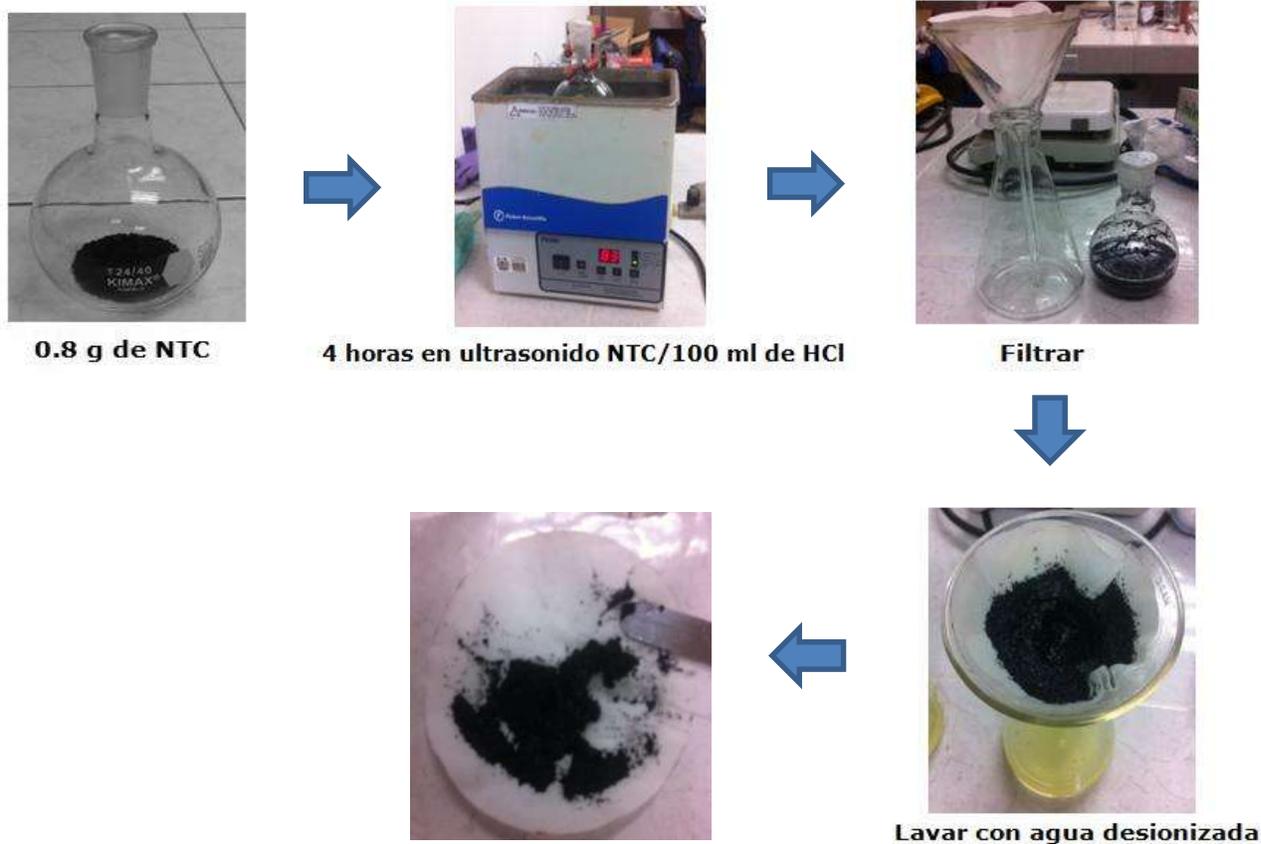
#### **Equipos:**

- Ultrasonido(Fisher Scientific, modelo FS30D)
- Parrilla eléctrica
- Horno (Felisa, modelo FE-2910)
- Matraz de bola de 1 boca
- Sistema de enfriamiento

Para llevar a cabo la purificación y funcionalización de los nanotubos de carbono se utilizó el método lixiviación de ácidos.

### 3.2.1 Purificación

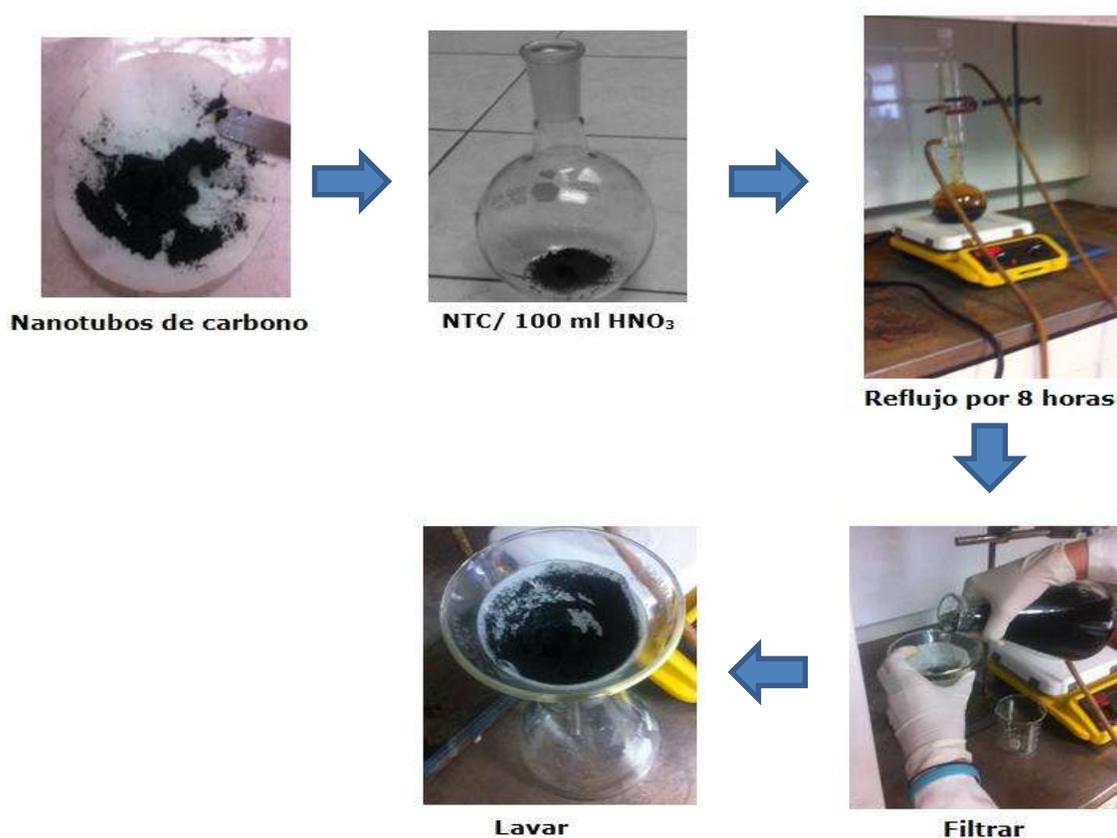
Se dispersaron 0.8 gr de nanotubos de carbono de pared múltiple en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado durante 4 horas, posteriormente los nanotubos de carbono se filtraron y lavaron con agua desionizada.



**Figura 3. 3 Proceso de purificación de nanotubos de carbono.**

### 3.2.2 Funcionalización

Los nanotubos de carbono se llevaron a reflujo por 8 horas con 100 ml de ácido nítrico (65% de pureza) en un matraz de bola de 1 boca de 250 ml unido a un sistema de enfriamiento con agua. Los nanotubos de carbono resultantes se filtraron y se lavaron con agua desionizada hasta obtener un pH entre 6-7, y posteriormente se secaron en un horno a 100° C durante 24 horas.



**Figura 3. 4 Proceso de funcionalización de nanotubos de carbono.**

### 3.3 Determinación de sitios activos

La concentración de sitios activos de los nanotubos de carbono se determinó experimentalmente adicionando 0.0007 g de nanotubos y 50 ml de una solución neutralizante a un recipiente de plástico de 75 ml, el recipiente se selló con una película Parafilm y se cerró con su tapa. Posteriormente, el recipiente se sumergió en un baño de temperatura constante a 25°C por 5 días y se colocó en el shaker a 180 rpm. Al transcurrir dicho periodo, se tomó una alícuota y se tituló con solución valorada. La concentración de los sitios activos se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$C_A = \frac{V_O(C_{IN} - C_{FN})}{m}$$

Aquí:

- $C_A$  = Concentración de los sitios activos (meq/g).
- $C_{IN}$  = Concentración inicial de la solución neutralizante, (meq/L).
- $C_{FN}$  = Concentración final de la solución neutralizante, (meq/L).
- $m$  = Masa del adsorbente, (g).
- $V_O$  = Volumen inicial de solución neutralizante, (L).

La concentración final de la solución neutralizante se determinó por medio de la expresión siguiente:

$$C_{FN} = \frac{V_T C_T}{V_M}$$

Aquí:

- $C_T$  = Concentración de la solución titulante, (meq/L).
- $V_T$  = Volumen empleado de la solución titulante, (L).
- $V_M$  = Volumen de la muestra de la solución neutralizante, (L).

### 3.4 Inoculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio extracto de levadura peptona glucosa (YEPD) cepa ale safale US-05 para su crecimiento

- 3.4.1 Preparación del medio: Se preparó 100 ml de agar YEPD, se esterilizó a 121 °C por 10 minutos en autoclave Felisa. Se dejó enfriar a 20-25° C y se vació de 5-10 ml en cajas de Petri estériles.
- 3.4.2 Rehidratación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*: En 3 ml de agua estéril se colocó 1 g de levadura liofilizada, se agitó hasta uniformizar la mezcla.
- 3.4.3 Inoculación de la levadura: En las cajas de Petri con agar, se colocó 0.5 ml de la mezcla agua estéril/levadura, se movió la caja en círculos para que la mezcla cubriera la superficie.
- 3.4.4 Incubación de la levadura: se colocó la caja de Petri boca arriba en la incubadora EK-36 a 30°C durante 24 horas para que se evaporara el agua, al transcurso de las 24 horas se tomó una asada de levadura y se sembró en el cajas de Petri

con medio YEPD sólido, y se colocaron en incubación a 30°C. la resiembra del microorganismo se realiza cada 2 semanas.

3.4.5 Viabilidad de la levadura: para determinar la viabilidad de la levadura se realizó la cinética de crecimiento, que se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) Pre-inoculo: en medio YPED líquido se colocó con el asa de siembra previamente esterilizada levadura, se agito y se colocó en agitación en el Shaker SI-300R a 30 °C y 180 rpm por 12 horas.
- b) Conteo celular: se colocaron 100 µl de inculo, 890 µl de agua estéril y 10 µl de azul de metileno en un tubo eppendorf, se tomaron 100 µl y se colocó en la cámara de Neubauer. Se observó en el microscopio (modelo), se realizó del conteo de las células presentes en los cuadrantes, y se determinó el volumen del inculo para tener una cantidad de  $3 \times 10^6$  células viables, este volumen de inculo se agregó a un matraz que contenía medio YEPD liquido estéril para comenzar a realizar la cinética.
- c) Cinética de crecimiento: cada dos horas se tomó 1 ml del medio con inculo, se colocó por duplicado en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 2 min para separar la biomasa del líquido, el cual se guardó en el ultracongelador MDF-U5486SC-PA a -79 °C para su conservación. Posteriormente la levadura se lavó, se colocó en recipientes para hacer determinación de biomasa, este último paso se realizó cada cuatro horas. La cinética de crecimiento fue medida durante 32 horas seguidas.

### 3.5 Inducción de la floculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con nanotubos de carbono funcionalizados.

- a) Se preparó 100 ml de medio de mosto como medio de cultivo y se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- b) Se esterilizo el material y el mosto en autoclave Felisa a 121° C por 10 minutos y se dejó enfriar a 20-25° C.

- c) Se colocó el inóculo de levaduras con  $50 \times 10^6$  células/ml, en el shaker IS-300R a 25, 30, 35 °C, a 180 rpm las cuales son las condiciones óptimas que se determinaron de acuerdo a las pruebas exploratorias que se realizaron. Se colocaron dos testigos, uno sin la presencia de nanotubos de carbono, y otro sin levadura.
- d) Se monitoreo la cinética de crecimiento durante 12, 22 y 32 horas y el cambio de pH durante el proceso de inmovilización.
- e) Los pasos anteriores se repitieron utilizando 10, 14, 18 mg/l de nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxílicos adicionarlos al matraz (cada uno por separado).
- f) Se determinó la cantidad de alcohol producido en cada matraz y la cantidad de azúcares totales, así como el tamaño y número de flóculos, para conocer las condiciones óptimas de inmovilización.

### 3.6 Diseño de experimentos

Para realizar los experimentos de manera efectiva y poder determinar los parámetros principales que influyen en la respuesta de la formación de flóculos se realizó un diseño de experimentos con los siguientes factores:

**Tabla 3. 1 Factores y variables del experimento.**

<b>Factores</b>	<b>Variables</b>	<b>Valor</b>
<b>A</b>	Temperatura	25- 30- 35 °C
<b>B</b>	Concentración de nanotubos de carbono	10- 14 - 18 mg/l
<b>C</b>	Tiempo	12- 24 -32 horas

**Tabla 3. 2 Variables fijas del experimento.**

<b>Variables fijas</b>	
<b>pH</b>	Se tomaran mediciones de la variación de pH durante el proceso.
<b>Cantidad de levadura</b>	Se utilizara una concentración inicial fija.
<b>Velocidad de agitación</b>	Se determinó en base a bibliografía.

El diseño a realizar es  $2^3$ , considerando que son dos niveles con 3 factores variables, obteniendo 8 experimentos y se realizarán 5 réplicas en el punto central con condiciones de 30 °C, 14 mg/l de nanotubos de carbono con

tiempo de reacción de 24 horas. Las respuestas a medir son el número de flóculos y porcentaje de etanol.

**Tabla 3. 3 Influencia de los niveles del experimento en los factores.**

	Factores						
	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
(1)	-	-	+	-	+	+	-
A	+	-	-	-	-	+	+
B	-	+	-	-	+	-	+
C	-	-	+	+	-	-	+
Ab	+	+	+	-	-	-	-
Ac	+	-	-	+	+	-	-
Bc	-	+	-	+	-	+	-
Abc	+	+	+	+	+	+	+

**Efectos individuales:**

$$I_A = \frac{1}{2} (a - b - c + abc)$$

$$I_B = \frac{1}{2} (-a + b - c + abc)$$

$$I_C = \frac{1}{2} (-a - b + c + abc)$$

**Efectos cruzados:**

$$I_{AB} = \frac{1}{2} (-a - b + c + abc) = I_C$$

$$I_{AC} = \frac{1}{2} (-a + b - c + abc) = I_B$$

$$I_{BC} = \frac{1}{2} (a - b - c + abc) = I_A$$

En base al diseño de experimentos se determina que la influencia de los efectos dobles es iguales a los efectos individuales, por lo cual se determina que se puede obtener respuesta significativa realizando la mitad de los experimentos con 5 réplicas en el punto central.

El conjunto de experimentos a realizar queda de la siguiente manera:

$$a \left\{ 35^\circ \text{C}, 10 \frac{\text{mg}}{\text{l}}, 12 \text{ horas} \right\}$$

$$b \left\{ 25^\circ \text{C}, 18 \frac{\text{mg}}{\text{l}}, 12 \text{ horas} \right\}$$

$$c \left\{ 25^\circ \text{C}, 10 \frac{\text{mg}}{\text{l}}, 22 \text{ horas} \right\}$$

$$\text{abc} \left\{ 35 \text{ }^\circ\text{C}, 18 \frac{\text{mg}}{\text{l}}, 32 \text{ horas} \right\}$$

$$\text{Punto central} \left\{ 30 \text{ }^\circ\text{C}, 14 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}, 22 \text{ horas} \right\}$$

Aleatorizado los experimentos se realizarán en el siguiente orden:

**Tabla 3. 4 Aleatorización de los experimentos.**

<b>Clave</b>		
<b>1</b>	Punto central	30°C, 14 mg/l, 22 horas
<b>2</b>	Punto central	30°C, 14 mg/l, 22 horas
<b>3</b>	B	25°C, 18 mg/l, 12 horas
<b>4</b>	Abc	35°C, 18 mg/l, 32 horas
<b>5</b>	A	25°C, 10 mg/l, 12 horas
<b>6</b>	C	35°C, 10 mg/l, 22 horas
<b>7</b>	Punto central	30°C, 14 mg/l, 22 horas
<b>8</b>	Punto central	30°C, 14 mg/l, 22 horas
<b>9</b>	Punto central	30°C, 14 mg/l, 22 horas

Se utilizó un blanco sin nanotubos de carbono y un blanco sin levadura.

## Capítulo 4. Resultados

### 4.1 Síntesis de nanotubos de carbono por el método de rocío pirolítico

Se obtuvieron nanotubos de carbono de pared múltiple, se realizaron las siguientes corridas:

**Tabla 4. 1 Nanotubos de carbono sintetizados.**

<b>No. Corrida</b>	<b>Nanotubos de carbono (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>1</b>	1	4.67
<b>2</b>	0.80	3.73

Para determinar el rendimiento en base a la cantidad de  $\alpha$ -pineno se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso de nanotubos de carbono}}{\text{ml de } \alpha - \text{pineno} * \text{densidad}}$$



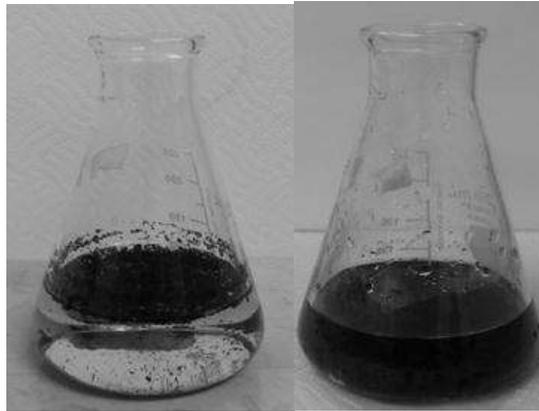
**Figura 4. 1 Nanotubos de carbono (NTC).**

El rendimiento óptimo es de 3.72% obteniendo 0.8 g de nanotubos de carbono por corrida, teniendo un rendimiento favorable en los experimentos realizados.

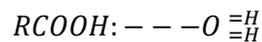
## 4.2 Purificación y funcionalización de nanotubos de carbono

La purificación y funcionalización de los nanotubos de carbono se llevó a cabo en corridas de 0.8 g.

Para corroborar que la funcionalización se efectuó adecuadamente, los nanotubos de carbono se colocaron en agua (Figura 4.2), debido a que el grupo carboxilo es polar, permite la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos carboxilos y el agua. Los grupos carboxilos tienen el grupo hidroxilo, que puede actuar como aceptor y dador de hidrogeno, y el C=O como aceptor en la formación de puentes de hidrogeno, lo cual explica su miscibilidad en agua. Los ácidos carboxílicos que pueden estar presentes en la pared de los nanotubos de carbono, son ácidos de cadena carbonada de cuatro carbonos máximo, ya que la parte carbonada es de carácter hidrófobo y la función carboxílica es hidrófila, mientras más grande sea la cadena carbonada la solubilidad en agua disminuye.



**Figura 4. 2 Comparación de la dispersión de nanotubos de carbono funcionalizados (izquierda) y sin funcionalizar (derecha).**



Formación de puentes de hidrogeno entre grupos carboxilo y el agua.

Para cuantificar la cantidad de sitios activos, se utilizó 0.0007 g de nanotubos de carbono en 50 ml de solución de  $\text{NaHCO}_3$ , y se emplearon 0.0459 L de una solución valorada de Hall, se determinó la concentración final de la solución de  $\text{NaHCO}_3$ :

$$C_{FN} = \frac{V_T C_T}{V_M} = \frac{(0.0459L)(0.1 \text{ eq/g})}{0.05L} = 0.0918 \frac{\text{eq}}{\text{g}}$$

Con la concentración final es empleada en la siguiente ecuación para determinar los sitios activos:

$$C_A = \frac{V_O(C_{IN} - C_{FN})}{m} = \frac{0.5L(0.1 - 0.0918eq/g)}{0.0007g} = 0.58571 \frac{eq}{g} = 585.71 meq/g$$

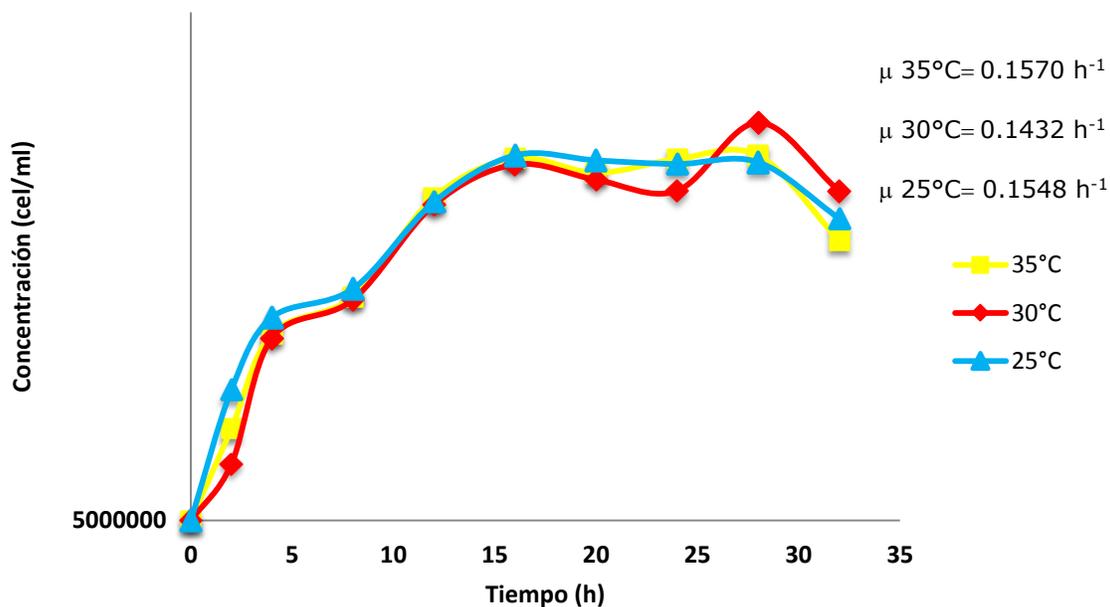
Los ácidos carboxílicos reaccionan con el bicarbonato de sodio acuoso, como se muestra en la reacción:



### 4.3 Inducción de la floculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con nanotubos de carbono funcionalizados

La floculación se indujo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml en donde se colocó levadura y nanotubos de carbono utilizando mosto como medio de fermentación.

Para corroborar el crecimiento de la levadura, y poder cuantificar el número de células se realizó la cinética de crecimiento, la cual se llevó a cabo para las temperaturas de 25, 30 y 35 °C, cada una con testigo sin nanotubos. Los resultados obtenidos se compraron, como se muestra en la figura 4.3, las temperaturas utilizadas favorecen el crecimiento de la levadura, observándose en la velocidad máxima de duplicación que es similar para los tres casos, determinándose que el intervalo de temperatura utilizado es óptimo.



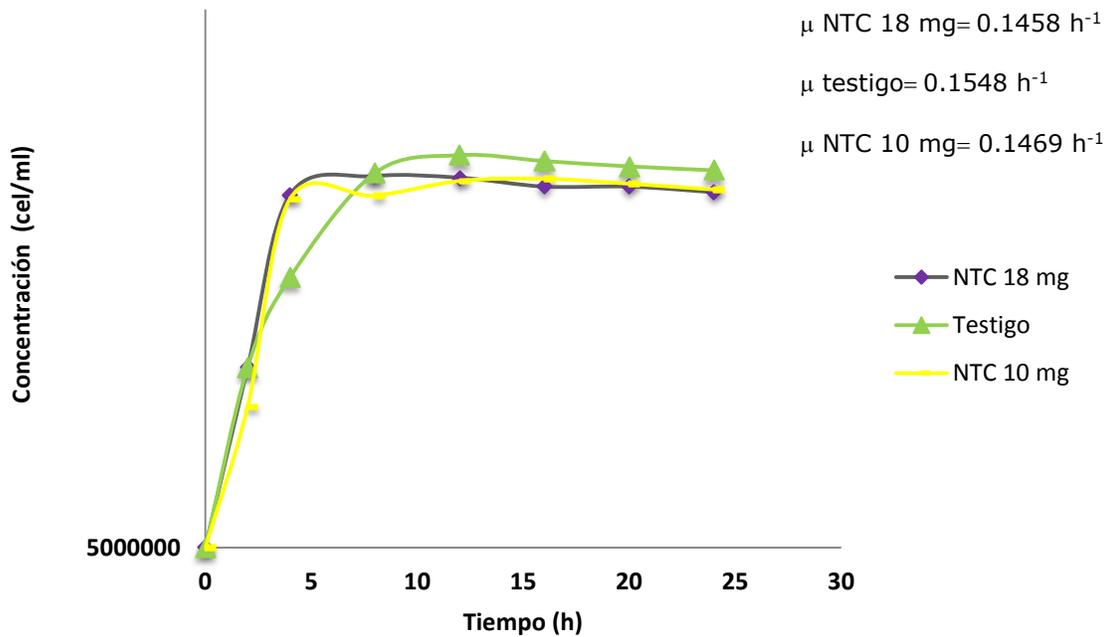
**Figura 4. 3 Cinética de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas en mosto sin nanotubos de carbono.**

Como se puede observar en la gráfica la fase estacionaria, que es cuando el microorganismo deja de reproducirse y comienza a utilizar su metabolismo fermentativo para la producción de alcohol, comienza a las 12 horas, en este periodo la cantidad de células presentes en el medio comienza a ser constante, por lo que se llega al número máximo de células, lo cual permite determinar el tiempo en que puede comenzar la floculación de la levadura.

La primera cinética que se monitoreo con nanotubos de carbono, fue bajo las condiciones de 25°C y 180 rpm, se colocaron 4 matraces en el shaker, sin nanotubos de carbono (testigo1), sin levadura (testigo2), con 10 mg y 18 mg de NTC, respectivamente. Cabe mencionar que en todos los experimentos se utilizaron dos testigos, los resultados respecto al blanco2, para todos los casos fue igual, los nanotubos de carbono se mantuvieron dispersos en el medio, por lo que esta información ya no será repetida en las siguientes condiciones.

Bajo estas condiciones, al transcurrir 12 horas de fermentación se comenzaron a observar los primeros conglomerados de células en los matraces que contenían levadura y nanotubos de carbono, al graficarse los resultados obtenidos se observó que al hacer una comparación con el testigo, ambos matraces presentaban menos número de células libres en el medio. Las

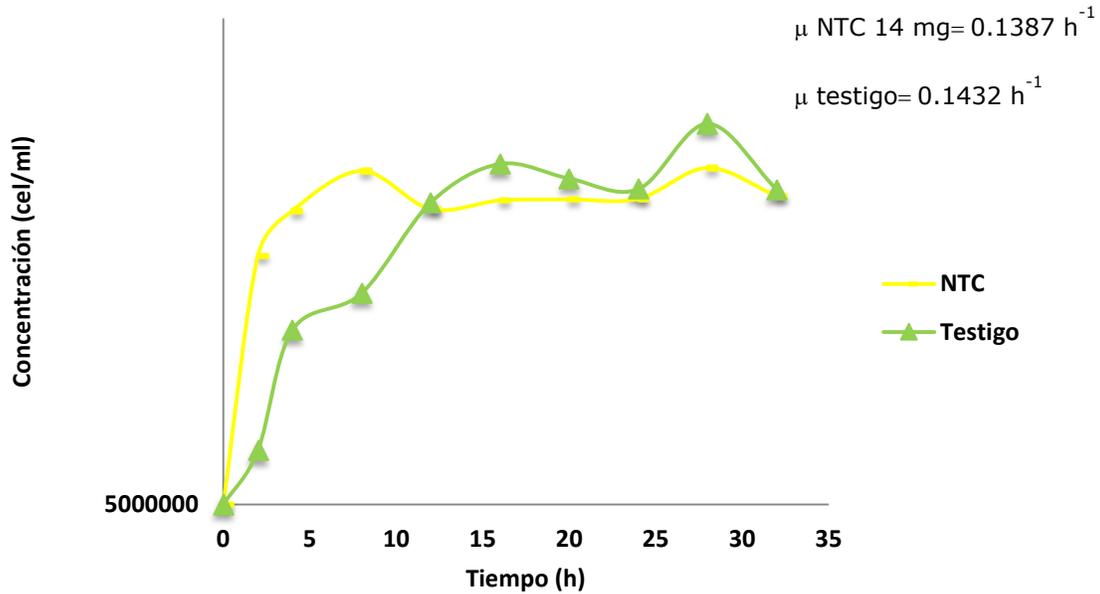
velocidades de crecimiento celular muestran que las células presentes en el testigo crecen a mayor velocidad que las que están presentes en los matraces con nanotubos de carbono.



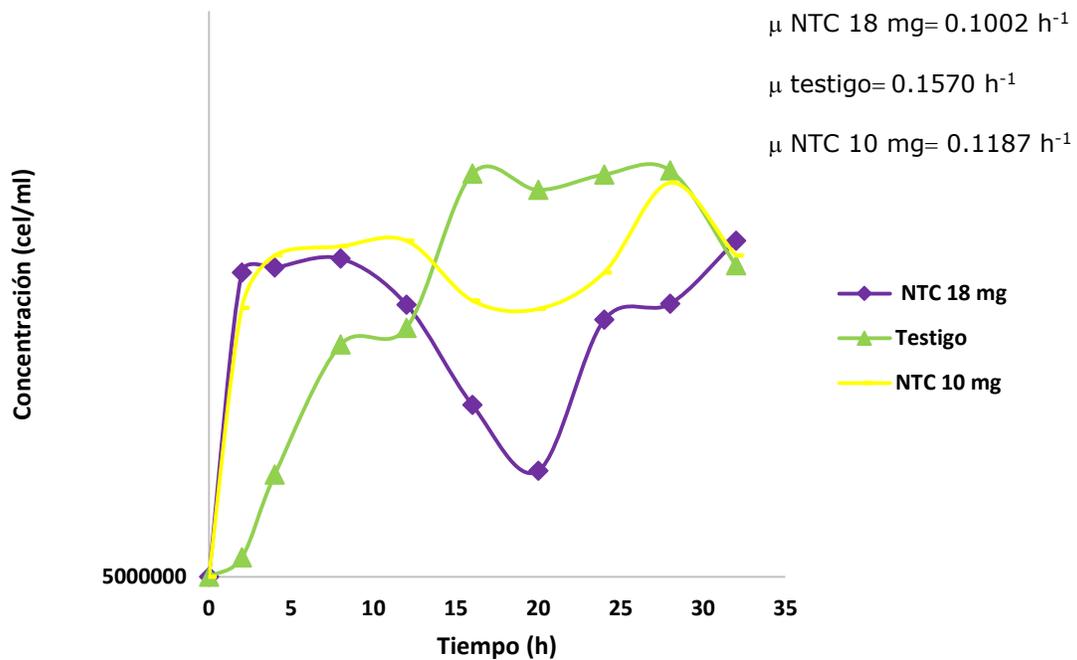
**Figura 4. 4 Comparación del crecimiento celular a 25°C entre el blanco y el medio con nanotubos de carbono.**

Para las condiciones de 30°C y 180 rpm, se colocaron los dos testigos y 5 matraces con 14 mg de nanotubos de carbono, estas condiciones son las del punto central por lo cual se pusieron 5 réplicas.

Al igual que las condiciones anteriores, al graficar el número de células libres en el medio se observa una disminución en los cultivos con nanotubos de carbono, la cual se correlaciona con la formación de flóculos en el medio. Los primeros flóculos observados fue a las 12 horas de fermentación, el tamaño del floculo iba aumentando, mientras que el número de células que se contaban en el medio disminuía. En comparación con las condiciones de 25°C el tamaño de los flóculos fue mayor a 30°C, lo cual da el indicio que la floculación se ve favorecida por la temperatura.



**Figura 4. 5 Comparación del crecimiento celular a 30°C entre el blanco y el medio con nanotubos de carbono.**



**Figura 4. 6 Comparación del crecimiento celular a 35°C entre el blanco y el medio con nanotubos de carbono.**

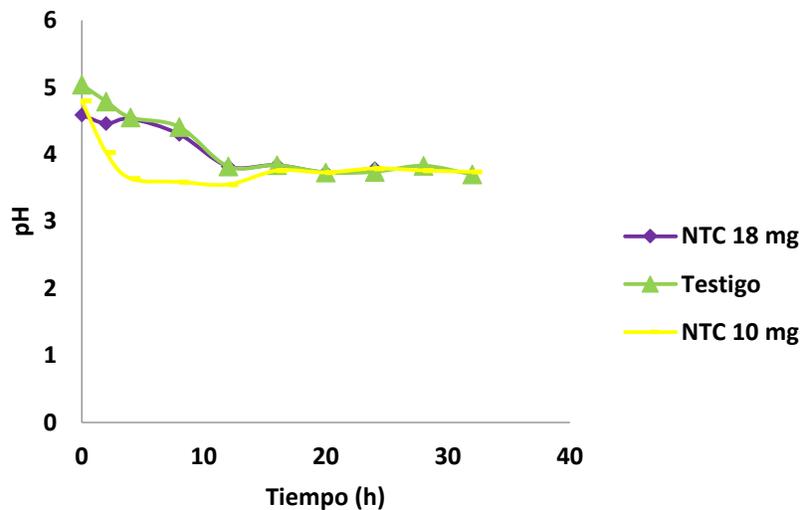
Para las condiciones de 35 °C, se utilizaron dos cantidades de nanotubos de carbono, 10 y 18 mg. Durante esta fermentación se corroboró que efectivamente el aumento de la temperatura favorece la formación de flóculos, se observó a las 14 horas la presencia de flóculos de levadura, estos presentaban mayor tamaño que los que se formaron a 25 y 30°C. De las dos condiciones de NTC que se presentaron, había flóculos de mayor tamaño y cantidad con 18 mg. Al momento de graficar, la tendencia de las cinéticas es a disminuir el número de células libres, que corresponde a las condiciones en donde se formaron flóculos, conforme pasaba el tiempo cercano a las 30 horas disminuían en tamaño y cantidad.

La formación de aglomerados se observa durante la fase estacionaria, de acuerdo a lo reportado por Verstrepen y colaboradores (2001), durante esta fase se tiene la expresión de la lectina FLO1, que participa en el proceso de floculación, y va acompañado del aumento de hidrófobicidad de la superficie.

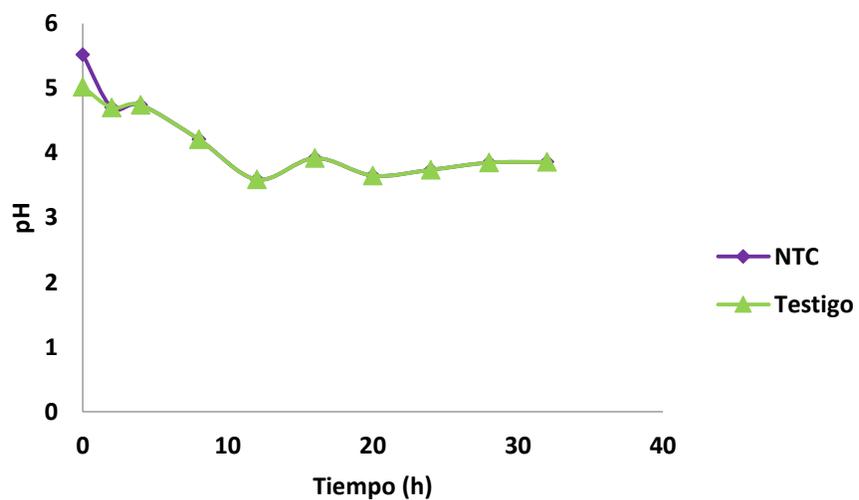
Este aumento de hidrófobicidad coincide con el comienzo de la floculación (Dengis et al., 1995), y el aumento de temperatura favorece las interacciones hidrófobas entre los grupos polares de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en la pared celular, permitiendo el contacto de las proteínas de las membranas de células adyacentes (Jin et al., 2001).

#### 4.3.1 pH

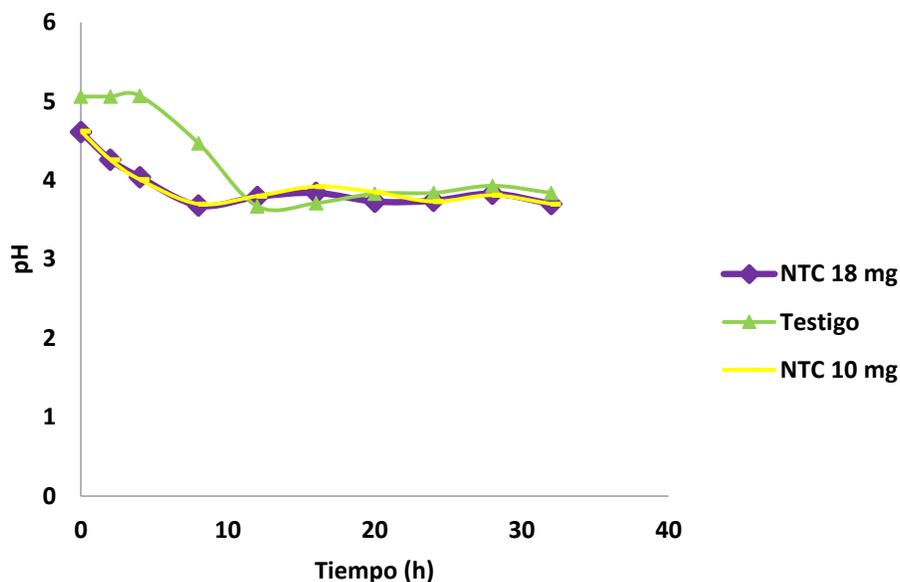
Se monitoreo el pH, debido a que este es un parámetro determinante en la floculación, conforme avanza la fermentación los valores del pH van cambiando, está directamente relacionado con el punto isoeléctrico de las proteínas de membrana. Valores muy altos de pH alteran los grupos de ionización de dichas proteínas y causan cambios en su conformación (Jin y Speers, 1998).



**Figura 4. 7 Monitoreo del pH del mosto de fermentación a 25°C.**



**Figura 4. 8 Monitoreo del pH del mosto de fermentación a 30°C.**



**Figura 4. 9 Monitoreo del pH del mosto de fermentación a 35°C.**

Como se observa en las gráficas anteriores, al comparar los valores de pH, los valores del medio con nanotubos de carbono fueron similares al pH del medio del testigo para todas las condiciones. Lo cual indica que el pH no favoreció el tamaño y el número de flóculos.

La levadura utilizada es una levadura de fermentación alta (ale), y de acuerdo a lo reportado por Dengis y colaboradores (1995) encontraron que cepas de levaduras de fermentación alta floculan a pH entre 3-4,5. Comparando esta referencia con los resultados obtenidos se observa que el intervalo de pH donde flocula la levadura, a partir de las 12 horas, se encuentra entre 3 y 4.5 para todas las condiciones, lo indica que la fermentación se mantiene dentro del óptimo.

Además que el pH se mantenga en este intervalo favorece la hidrófobicidad de la pared celular (Amory y Rouxhet, 1988), reforzando la formación de flóculos favorecidos por el aumento de temperatura.

Se determinó la cantidad de azúcares reductores, que nos muestran la cantidad de azúcares reductores que tiene el mosto y que puede asimilar la levadura para la conversión a etanol.

Se comenzó con mosto con 1040 de densidad relativa, lo cual equivale a 200 g/l de azúcares reductores aproximadamente. Como se observa en las gráficas siguientes se lleva a cabo el consumo de azúcares en el medio y la cantidad de

biomasa, disminuye significativamente, lo cual se le atribuye a que las células están aglomeradas en el nanotubo de carbono.

### 4.3.2 Biomasa y sustrato

De acuerdo a literatura, la floculación se lleva al final de la fermentación, cuando la presencia de azúcares fermentables es nula (Jin y Speers, 1998), esperando que la floculación comience a partir de las 30 horas, sin embargo, se obtuvieron flóculos a partir de las 12 horas de fermentación, aun en presencia de azúcares, por ende, la floculación no se llevó a cabo por reacción de estrés de las células ante la falta de nutrientes.

Respecto a la producción de biomasa se tiene que es menor la cantidad para los medios que tienen nanotubos de carbono, lo cual corrobora la disminución del número de células que se observó en las cinéticas de crecimiento.

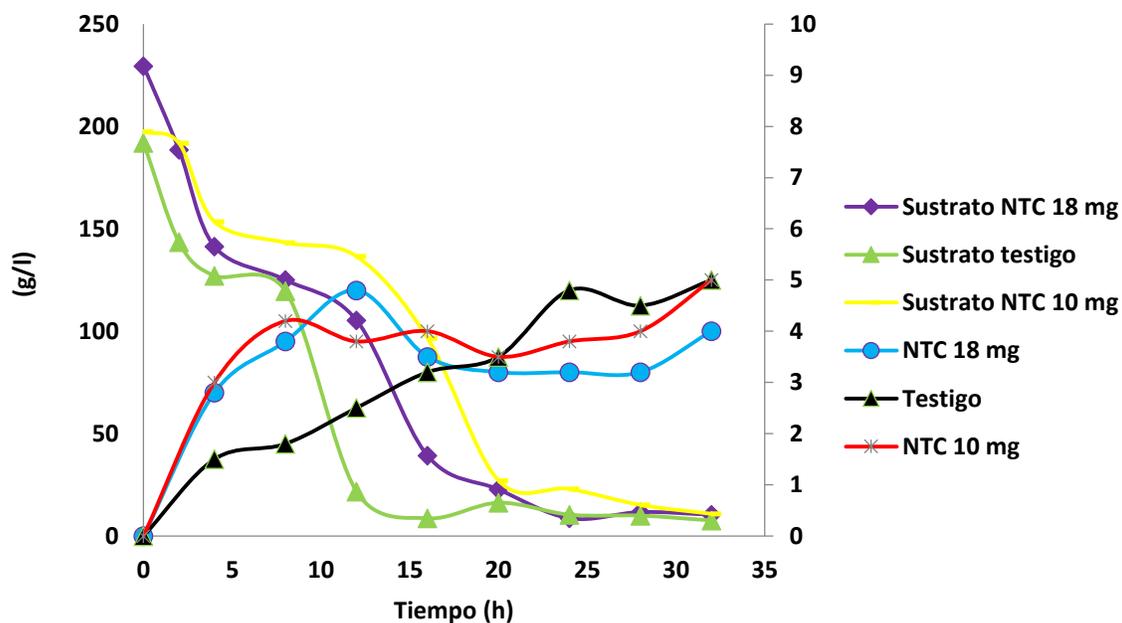


Figura 4. 10 Consumo de sustrato y producción de biomasa, 25°C.

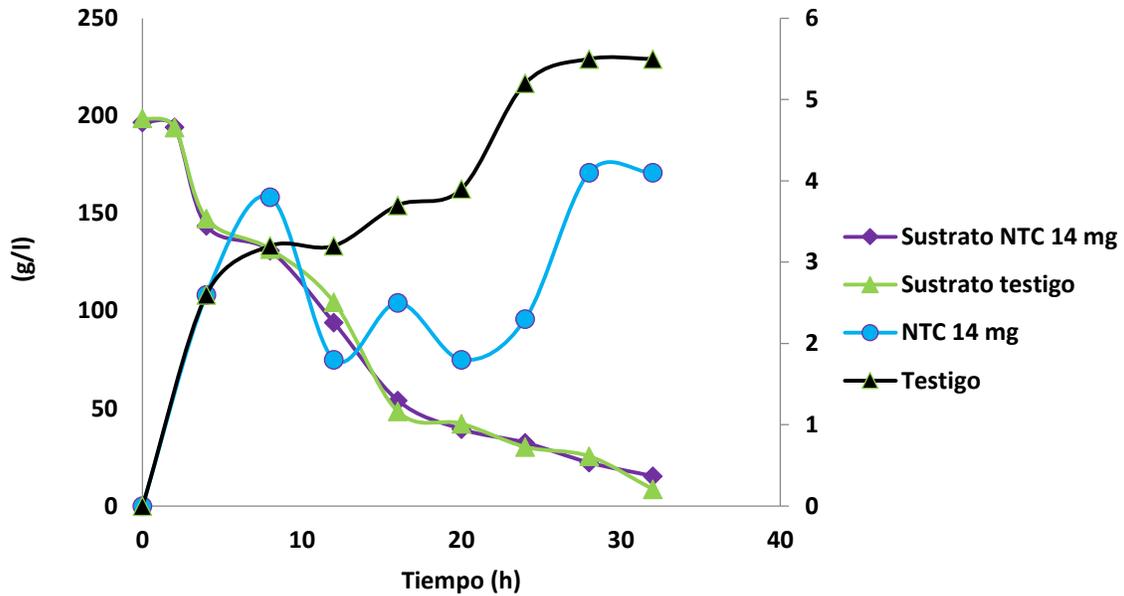


Figura 4. 11 Consumo de sustrato y producción de biomasa, 30°C.

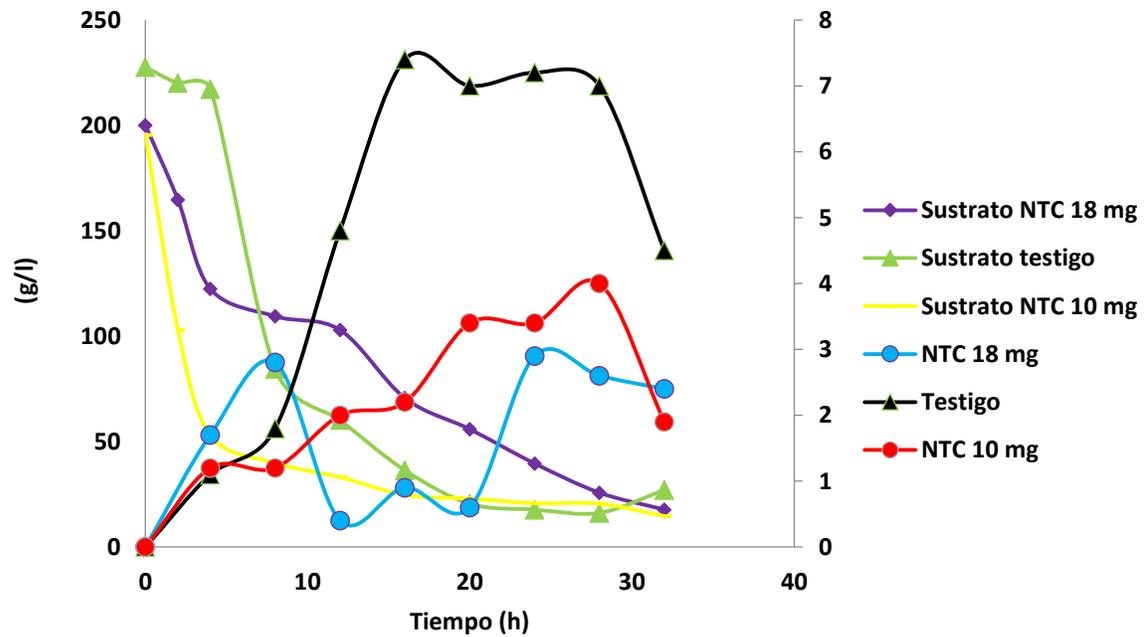


Figura 4. 12 Consumo de sustrato y producción de biomasa, 35°C.

Respecto al rendimiento biomasa/sustrato (tabla 4.2), para los blancos se tiene que el mayor rendimiento así como la mayor cantidad de biomasa se presenta a 30°C, para el caso de los experimentos que tienen nanotubos de carbono, se obtiene que el mayor rendimiento se presenta en condiciones de 35°C con 18 mg de NTC, la cantidad de biomasa producida en estas condiciones es muy baja, sin embargo, esta cuantificación de biomasa corresponde a las células libres en el medio, atribuyendo que la mitad de células, respecto al blanco, están aglomeradas en los NTC. Con esto también se puede concluir que las células que están adheridas a los NTC están activas ya que se presenta consumo de sustrato.

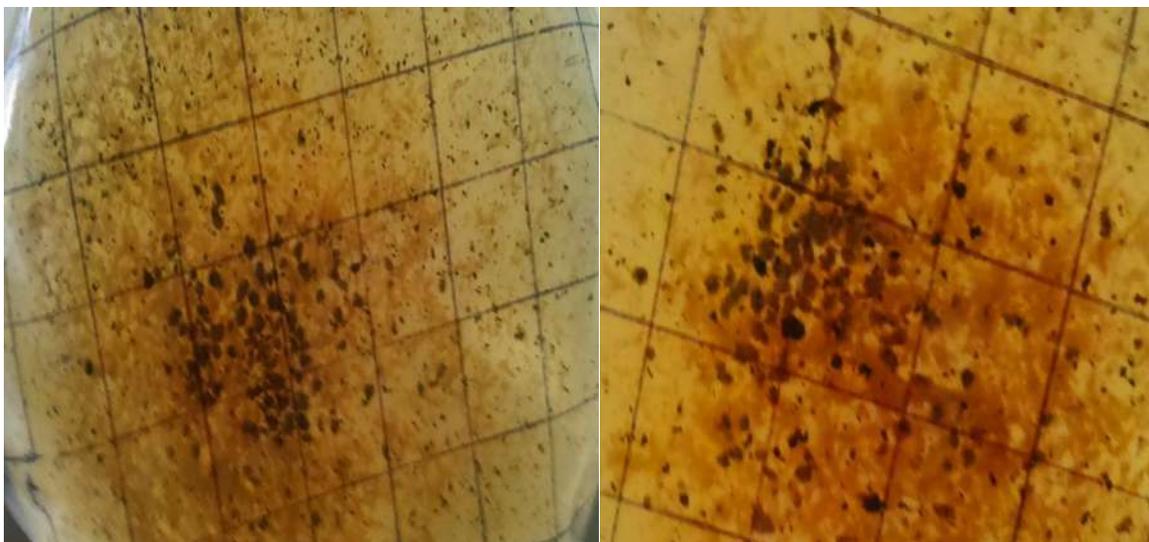
**Tabla 4. 2 Resumen de resultados de la levadura *S. cerevisiae*.**

<b>Experimento</b>		$\mu_{(max)} h^{-1}$	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	<b>Azúcar inicial</b> (g/l)	<b>Azúcar consumido</b> (g/l)	<b>Biomasa producida</b> (g/l)
<b>25°C</b>	NTC 10 mg	0.2938	0.0267	0.0265	197.46	186.66	3.8
	NTC 18 mg	0.2916	0.0182	0.0249	229.55	220.92	3.2
	Testigo	0.3096	0.0271	0.0519	192.04	181.68	4.8
<b>30°C</b>	NTC 14 mg	0.2775	0.0226	0.4319	196.59	181.24	4.1
	Testigo	0.2864	0.0289	0.0318	198.76	190.13	5.2
<b>35°C</b>	NTC 10 mg	0.2375	0.0194	0.0125	195.51	180.81	3.4
	NTC 18 mg	0.2005	0.0234	0.0260	126.56	114.25	2.8
	Testigo	0.3140	0.0238	0.0119	227.59	209.86	5

#### 4.4 Número y tamaño de flóculos

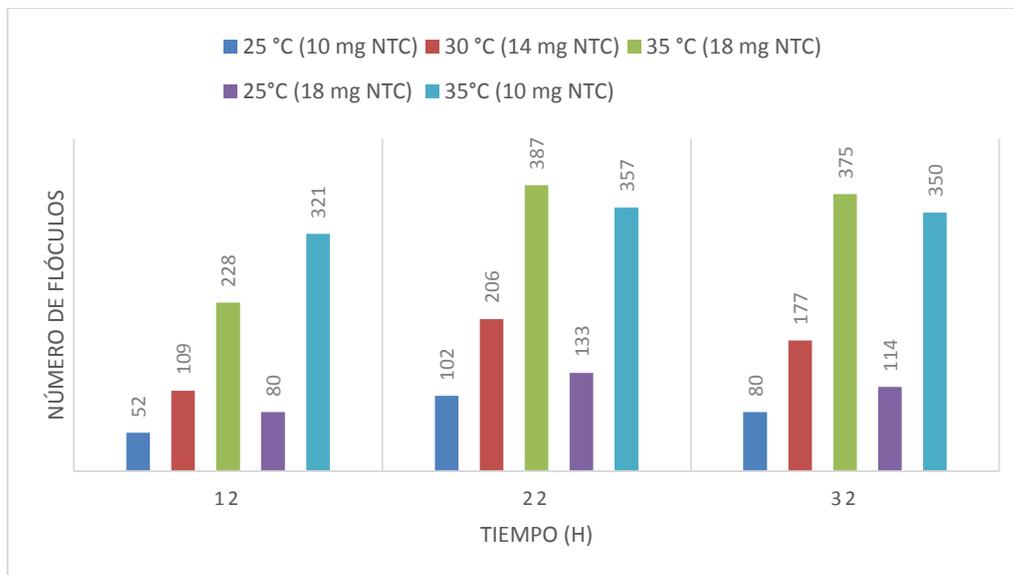
Los flóculos que se obtuvieron se cuantificaron y se determinó su tamaño para cada condición utilizando fotografía digital.

Cada una de las imágenes se procesó en el programa ImageJ (apéndice F), dando a conocer la cantidad de flóculos y su perímetro.



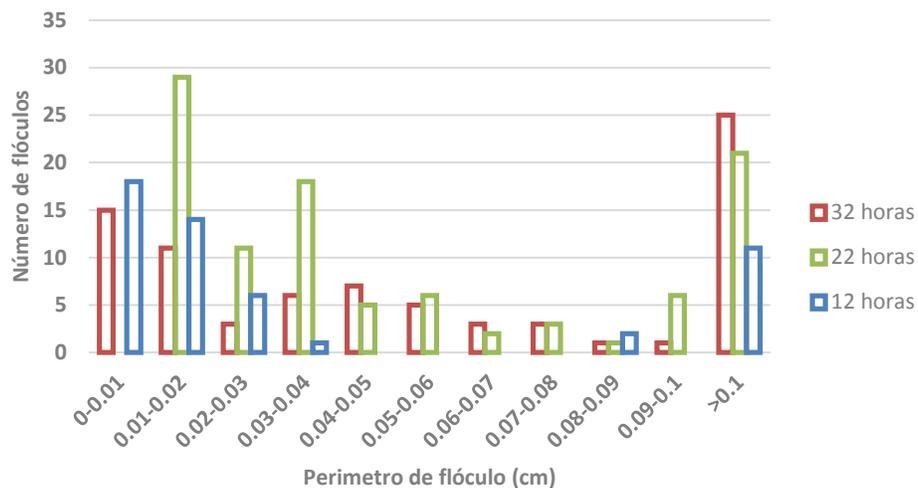
**Figura 4. 13 Imágenes de flóculos procesadas en ImageJ.**

Como se observa en la figura 4.14, la mayor cantidad de flóculos se obtuvieron a 35°C, presentando su máxima cantidad a las 22 horas con 387 flóculos, corroborando el resultado obtenido en las cinéticas de crecimiento con la disminución del número de células durante la formación de flóculos.

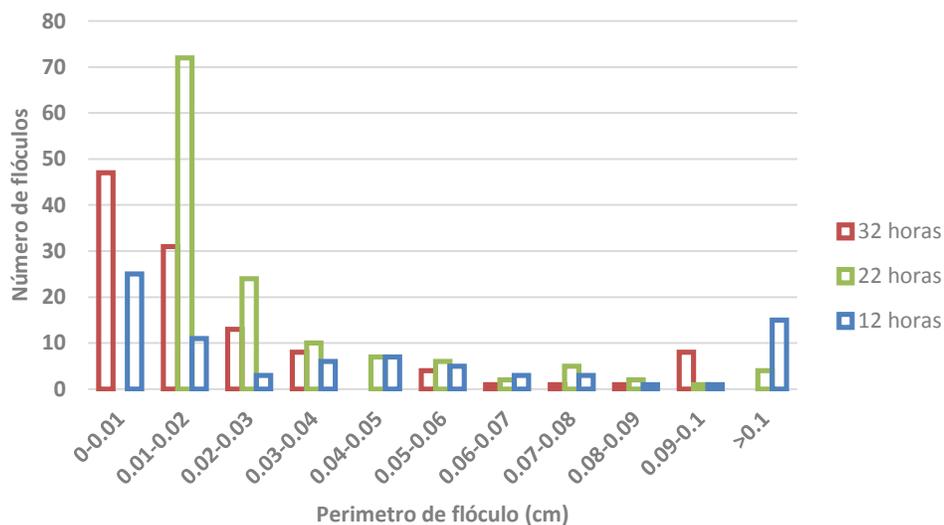


**Figura 4. 14 Número de flóculos formados respecto al tiempo de reacción para cada condición.**

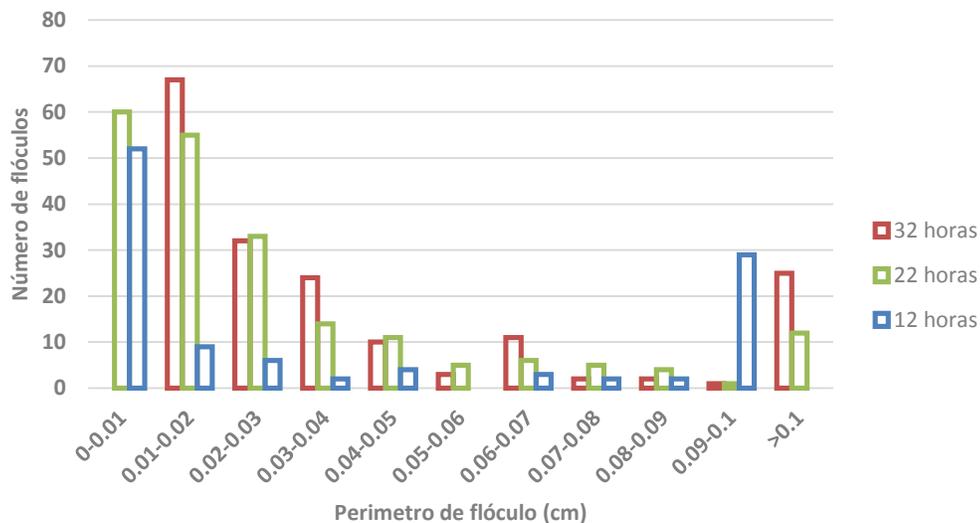
Respecto al tamaño de floculo a 25°C su tamaño y cantidad era menor, conforme aumentaba la temperatura se veía un aumento en ambas variables.



**Figura 4. 15 Tamaño de flóculo, 25 °C, 10 mg de Nanotubo de Carbono.**

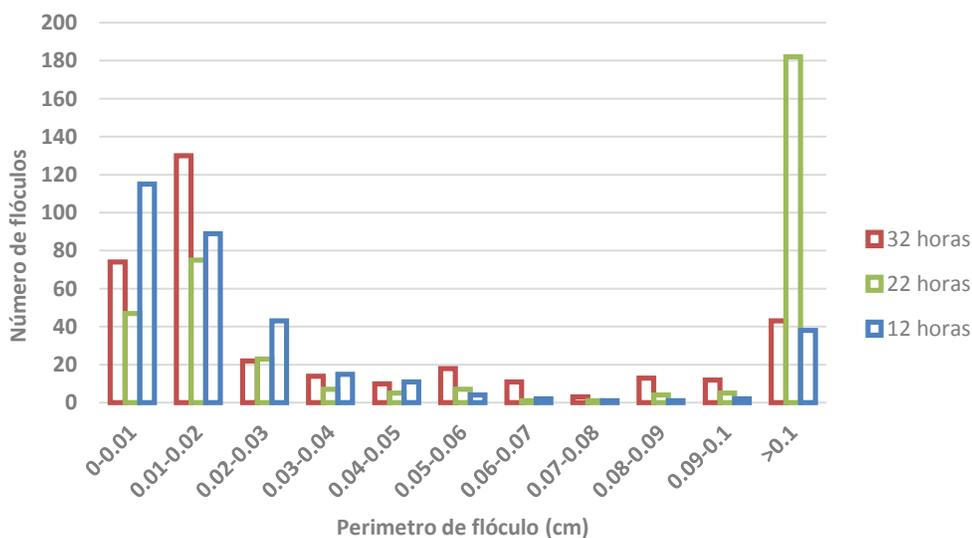


**Figura 4. 16 Tamaño de flóculo, 25 °C, 18 mg de Nanotubos de carbono.**

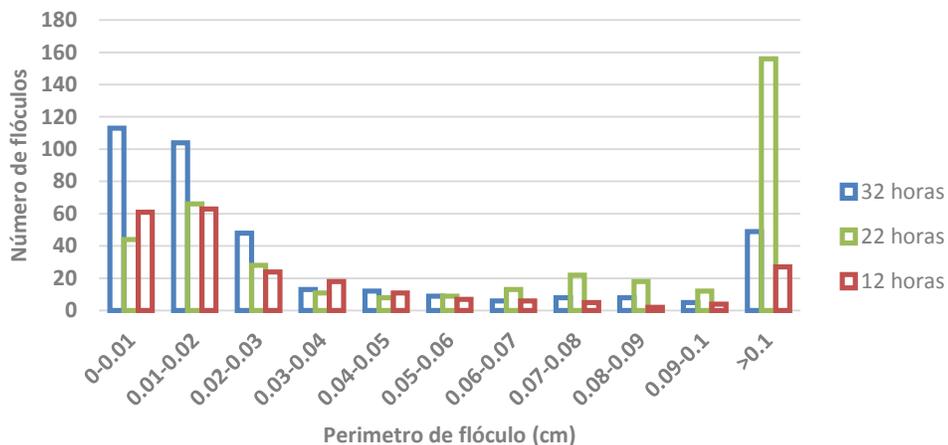


**Figura 4. 17 Tamaño de floculo, 30 °C, 14 mg de Nanotubos de Carbono.**

En las gráficas anteriores se observa que la distribución de la media del número de floculo tiende a ser mayor en los extremos, es decir, en el perímetro menor a 0.03 cm, conforme avanza el tiempo el perímetro del floculo va disminuyendo, que se puede atribuir a desagregación inducida por choque entre ellos.



**Figura 4. 18 Tamaño de floculo, 35 °C, 10 mg de Nanotubo de Carbono.**



**Figura 4. 19 Tamaño de floculo, 35 °C, 18 mg de Nanotubos de carbono.**

Para 35°C se observa, que la distribución de la media se encuentra a los extremos, a las 22 horas se aprecia que para ambas condiciones de nanotubos de carbono se forman la mayor cantidad de floculos de mayor tamaño, la temperatura favorece la formación de los conglomerados, y al igual que en las otras condiciones conforme pasa el tiempo el número de tamaño de floculos aumenta para perímetros menor a 0.03 cm.

#### 4.5 Determinación de alcohol

De los resultados obtenidos, se observa en la tabla 4.3 que la condición de 35°C, es apropiada para la formación de floculos de levadura, sin embargo, el porcentaje de producción de etanol es la tercera parte en comparación con lo obtenido en las condiciones de 30°C. A 25°C la producción de etanol fue menos en comparación del punto central, por lo tanto, se determina que las mejores condiciones para la producción de etanol induciendo la floculación de la levadura, son 30°C y 14 mg de nanotubos de carbono.

**Tabla 4. 3 Porcentaje de etanol obtenido a diferentes condiciones de fermentación.**

Experimento	Etanol (%v/v)	Azúcar residual (g/l)
25°C   NTC 10 mg	4.96	10.79
25°C   NTC 18 mg	5.46	10.36

30°C	Testigo	9.58	7.54
	NTC 14 mg*	6.63	15.34
35°C	Testigo	6.05	8.62
	NTC 10 mg	2.27	14.69
	NTC 18 mg	2.98	24.02
	Testigo	2.40	27.05

### NTC 14 mg\*. Porcentaje de etanol promedio.

Los datos se compararon los resultados obtenidos de Tirivaviri Augustine Mamvura (2010) (tabla 4.4), para el proceso a 30°C obtuvo 0.52% de etanol para las células inmovilizadas en nanotubos de carbono que fue mayor en comparación con el testigo que utilizo, al comparar con los resultados obtenidos en esta investigación, el porcentaje de alcohol es de 6.63%, indica que la producción de etanol no es afectada por la utilización de nanotubos de carbono funcionalizados en el medio y por la inducción de la floculación.

**Tabla 4. 4 Comparación del porcentaje de etanol obtenido en esta investigación con otras similares y con el proceso a nivel industrial.**

<i>Experimento</i>		<i>Etanol (%v/v)</i>	<i>Azúcar residual (g/l)</i>
30°C	NTC	0.52	38.28
<i>Tirivaviri Augustine Mamvura (2010).</i>	Testigo	0.39	42.79

<i>30°C Esta investigación (2015).</i>			
	NTC 14 mg*	6.63	15.34
	Testigo	6.05	8.62

La cepa utilizada para esta investigación es una cepa tipo ale, por lo que los porcentajes de etanol obtenidos se comparan en la tabla 4.5 con los porcentajes reportados por la empresa grupo modelo para diferentes tipos de cerveza ale. Al analizar los datos, bajo las condiciones de 25 °C y 30°C, se aprecia que están dentro de porcentaje de alcohol que tienen las cervezas a nivel industrial, indicando que efectivamente la inducción de la floculación de la levadura no afecta la producción de etanol.

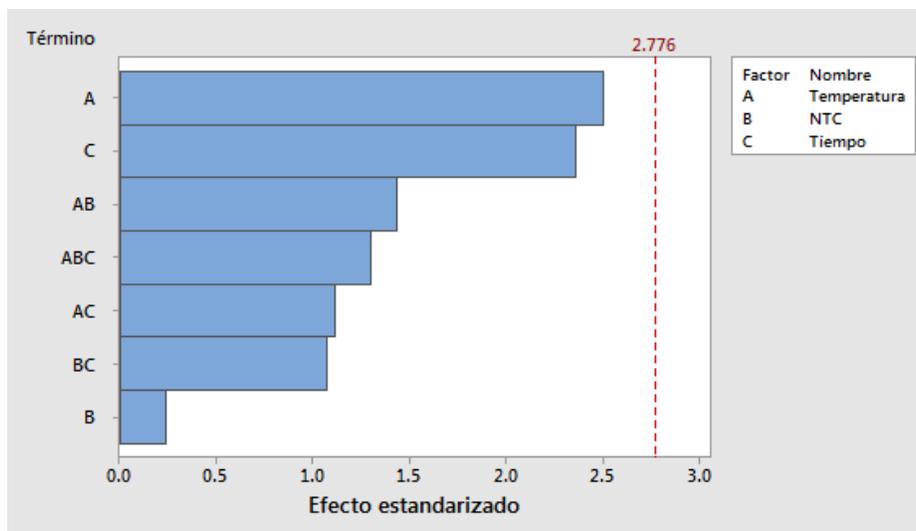
**Tabla 4. 5 Comparación del porcentaje de etanol obtenido en esta investigación con otras similares y con el proceso a nivel industrial.**

<i>Experimento</i>	<i>Etanol (%v/v)</i>	<i>Azúcar residual (g/l)</i>
<i>Fermentaciones a nivel industrial cerveza tipo ale (Grupo modelo México, 2015).</i>	Tipos de cerveza ale:	
	Porter	4.0-6.0
	Kolsh	4.6-5.1

<i>Esta investigación:</i>		Bitter	4.0-5.5	
	25°C	NTC 10 mg	4.96	10.79
		NTC 18 mg	5.46	10.36
		Testigo	9.58	7.54
		NTC 14 mg*	6.63	15.34
	30°C	Testigo	6.05	8.62
		NTC 10 mg	2.27	14.69
	35°C	NTC 18 mg	2.98	24.02
		Testigo	2.40	27.05

#### 4.6 Solución estadística del diseño de experimentos.

Se realizó un análisis de los efectos que influyeron en el experimento, en la figura 4.19 se pueden ver que para la respuesta de etanol con un nivel de confianza del 95%, los efectos más importantes son los efectos simples de temperatura y tiempo, también es importante la interacción de temperatura y nanotubos de carbono.



**Figura 4. 20 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados,  $\alpha=0.05$ . Respuesta etanol.**

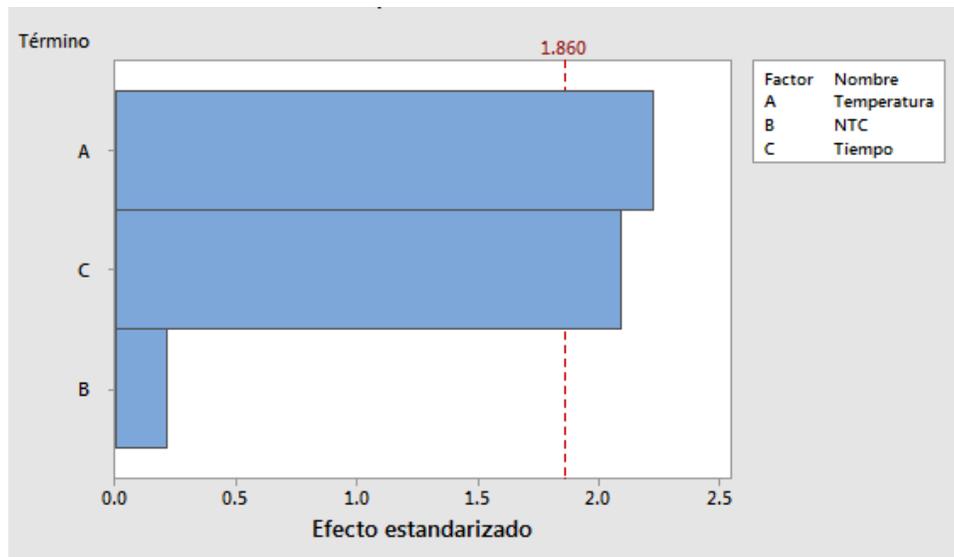
En la tabla 4.6 se muestra el análisis de varianza del diagrama de Pareto, si el valor p es inferior al nivel de significación nos indica que lo más probable es que la hipótesis de partida sea falsa.

**Tabla 4. 6 Análisis de varianza.**

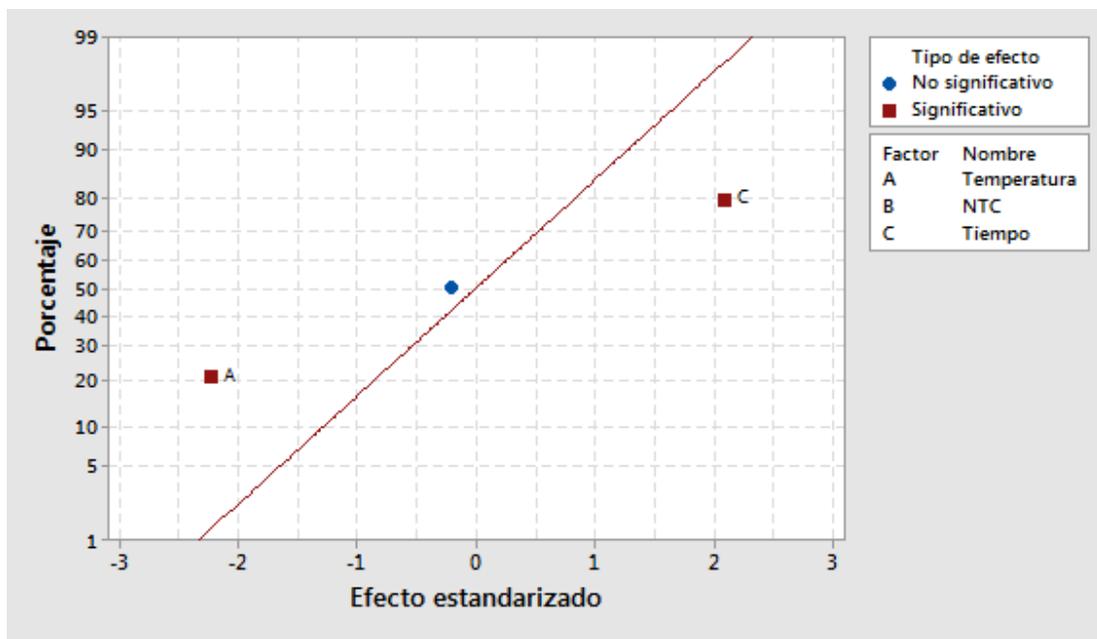
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Temperatura</i>	1	6.29	0.066
<i>NTC</i>	1	0.05	0.826
<i>Tiempo</i>	1	5.58	0.078
<i>Temperatura*NTC</i>	1	2.07	0.224
<i>Temperatura*Tiempo</i>	1	1.25	0.327
<i>NTC*Tiempo</i>	1	1.15	0.343
<i>Temperatura*NTC*Tiempo</i>	1	1.69	0.264
<i>Error</i>	4		
<i>Total</i>	12		

$R^2 = 90.77\%$

Se analizaron cada uno de los efectos individuales sobre la respuesta, dando como resultado que los efectos individuales significativos son temperatura y tiempo figura 4.20 y 4.21.

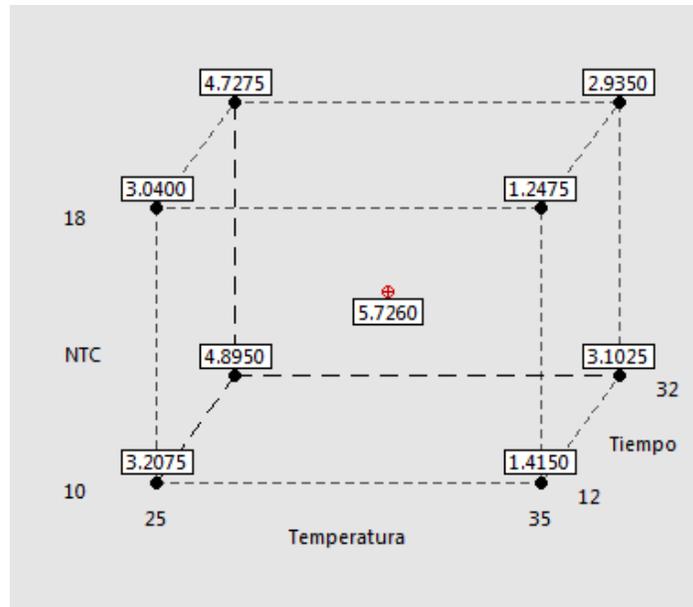


**Figura 4. 21 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados,  $\alpha=0.1$ . Respuesta etanol.**



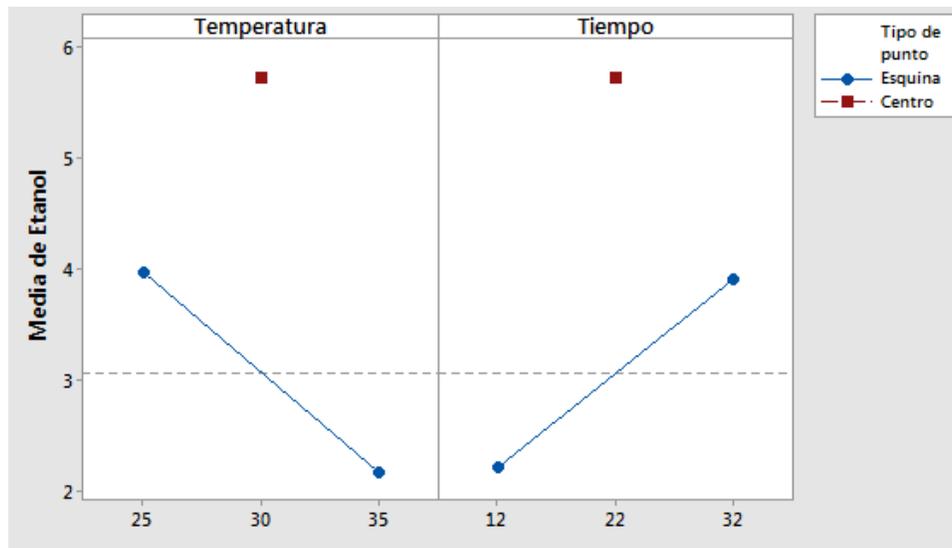
**Figura 4. 22 Gráfica normal de efectos estandarizados.  $\alpha= 0.10$ .**

De acuerdo a la gráfica de respuestas figura 4.22 se esperaría que los porcentajes de etanol fueran los que se muestran, en donde el mayor porcentaje estaría presente en el punto central, lo cual es corroborado con la gráfica de efectos principales figura 4.23.



**Figura 4. 23 Grafica de respuestas (medias ajustadas) de etanol.**

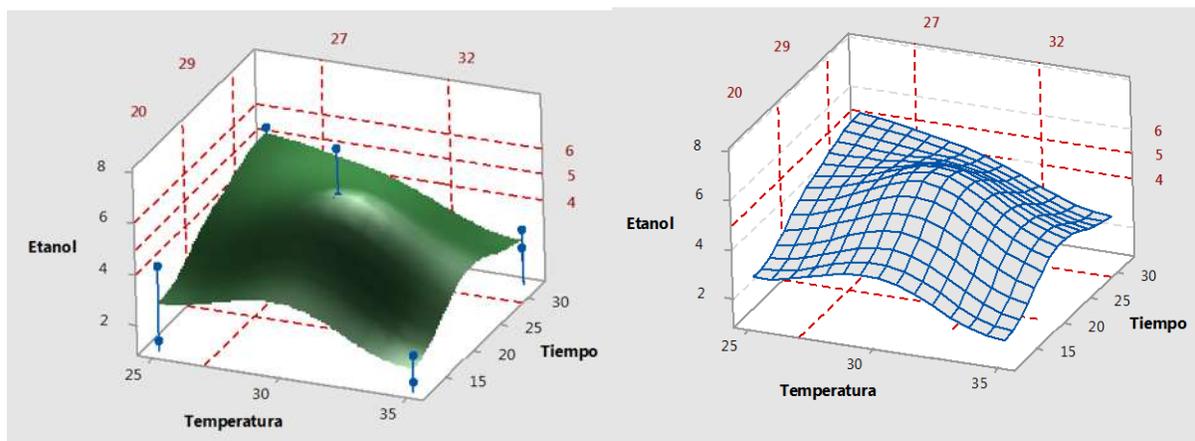
Se muestra que para temperatura (+) y tiempo (-), se obtiene un porcentaje de etanol bajo, mientras que para temperatura (-) y tiempo (+), temperatura (+) y tiempo (+) se obtienen porcentajes de etanol altos.



**Figura 4. 24 Gráfica de efectos principales para etanol.**

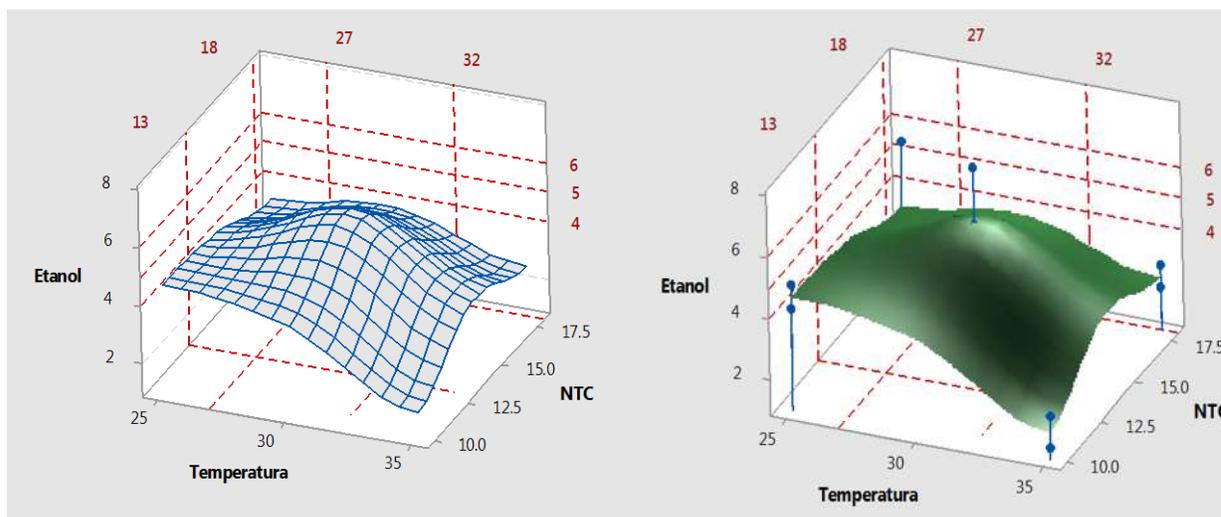
Utilizando un grafica de superficie, se determinó las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y concentración de nanotubos de carbono en la que la respuesta de etanol es mayor al 4%, teniendo una región en la cual se puede

optimizar el proceso, como se muestra en la figura 4.24. Para el caso de tiempo se recomienda que sea el proceso de 20 a 29 horas, y de 27 a 32 °C.



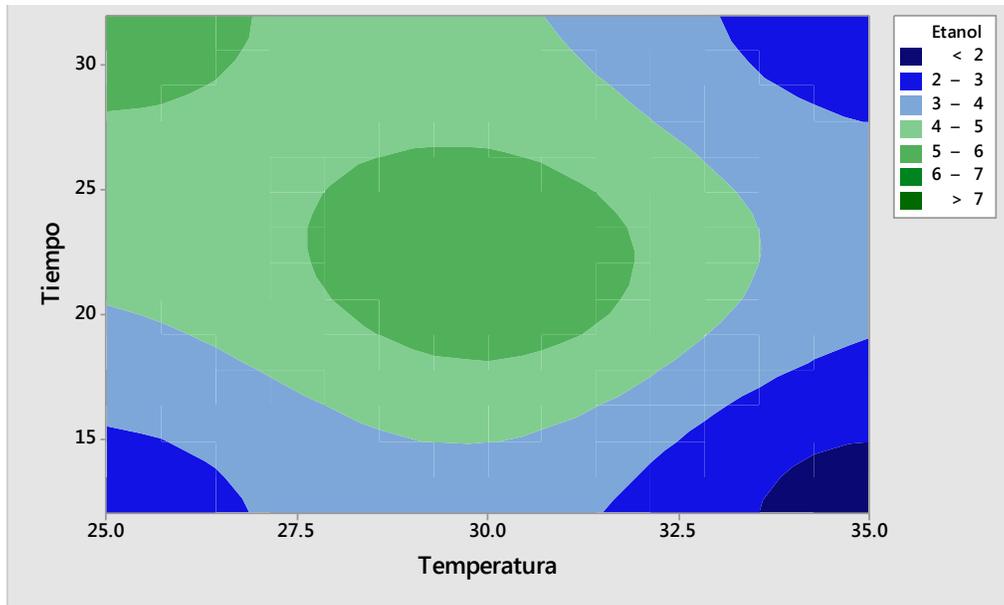
**Figura 4. 25 Gráfica de superficie de etanol vs. Tiempo, temperatura.**

Para el caso de la concentración de nanotubos de carbono, que es el efecto que menos influencia tiene respecto a la concentración de etanol, se determinó que el óptimo es de 13 a 18 mg de nanotubos de carbono.



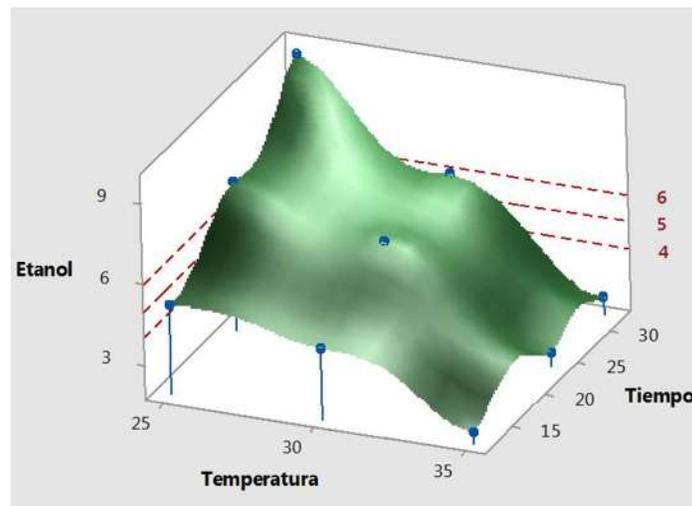
**Figura 4. 26 Gráfica de superficie de etanol vs. NTC, temperatura.**

Como se determinó que los factores de tiempo y temperatura influyen directamente en el porcentaje de etanol, se obtuvo una gráfica de contorno para delimitar y corroborar los datos propuestos en la sección anterior, como se muestra en la figura 4.26, para un porcentaje de 5-6 %.



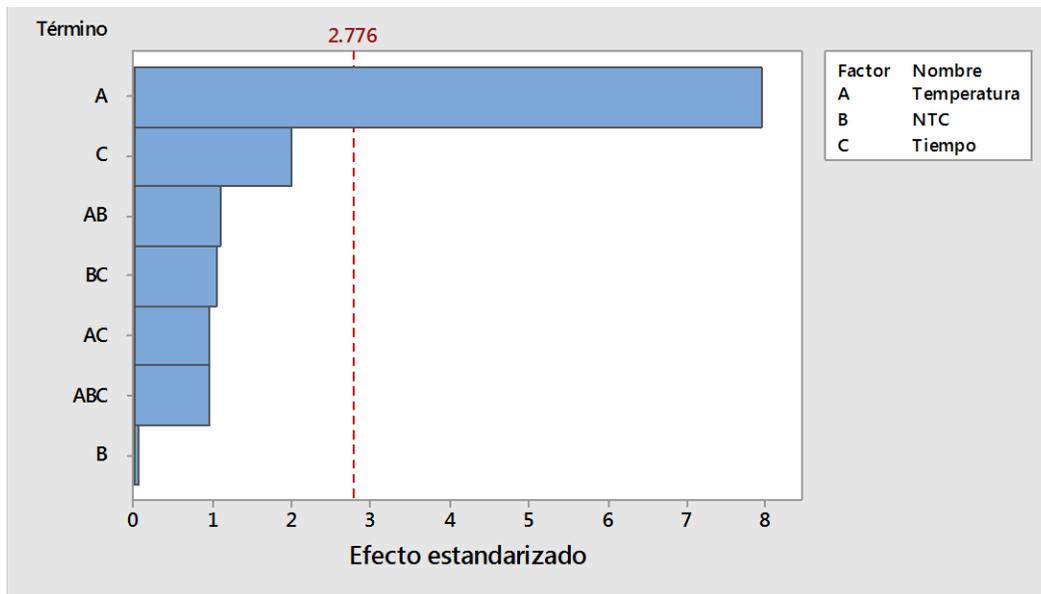
**Figura 4. 27 Gráfica de contorno de etanol vs. Tiempo, temperatura.**

Respecto a la respuesta de etanol para el testigo sin nanotubos de carbono, la superficie de respuesta que se observa figura 4.27, no tiene un intervalo definido en donde se pueda considerar que es el óptimo para la fermentación, esto nos puede indicar que los nanotubos de carbono no afectan la fermentación, al contrario, favorecen para tener un margen de producción que puede ser controlado.



**Figura 4. 28 Gráfica de superficie Etanol vs. Tiempo, temperatura, testigo sin Nanotubos de Carbono.**

Para la respuesta de número de flóculos, como se muestra en la figura 4.27, el efecto individual de la temperatura es lo que más influencia en la respuesta.



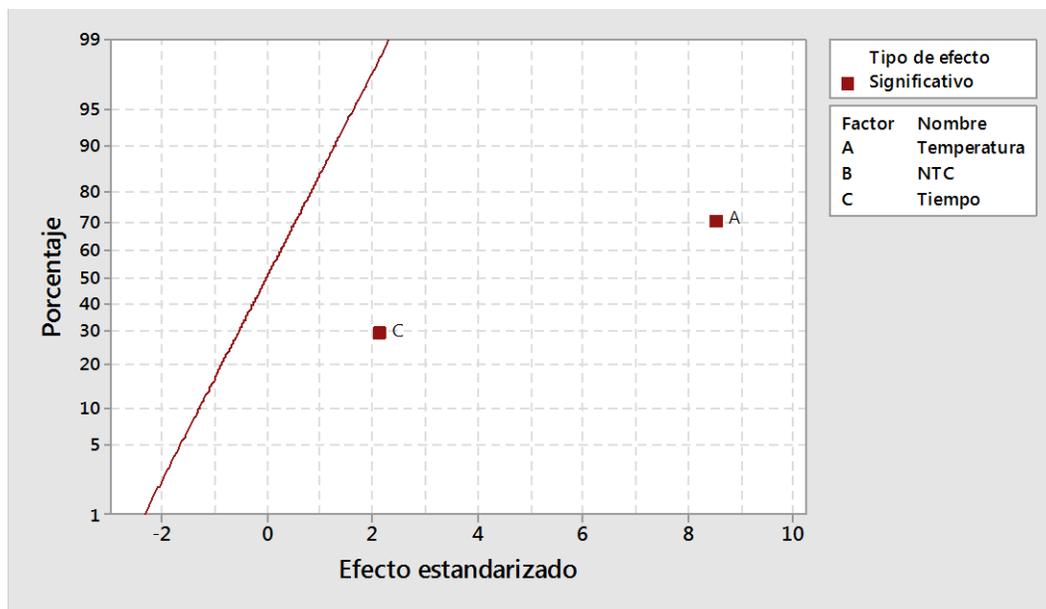
**Figura 4. 29 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.  $\alpha= 0.05$ . Respuesta No. de flóculos.**

**Tabla 4. 7 Análisis de varianza.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Temperatura</i>	1	63.51	0.001
<i>NTC</i>	1	0.00	0.962
<i>Tiempo</i>	1	4.00	0.116
<i>Temperatura*NTC</i>	1	1.19	0.336
<i>Temperatura*Tiempo</i>	1	0.92	0.392
<i>NTC*Tiempo</i>	1	1.09	0.356
<i>Temperatura*NTC*Tiempo</i>	1	0.89	0.400
<i>Error</i>	4		
<i>Total</i>	12		

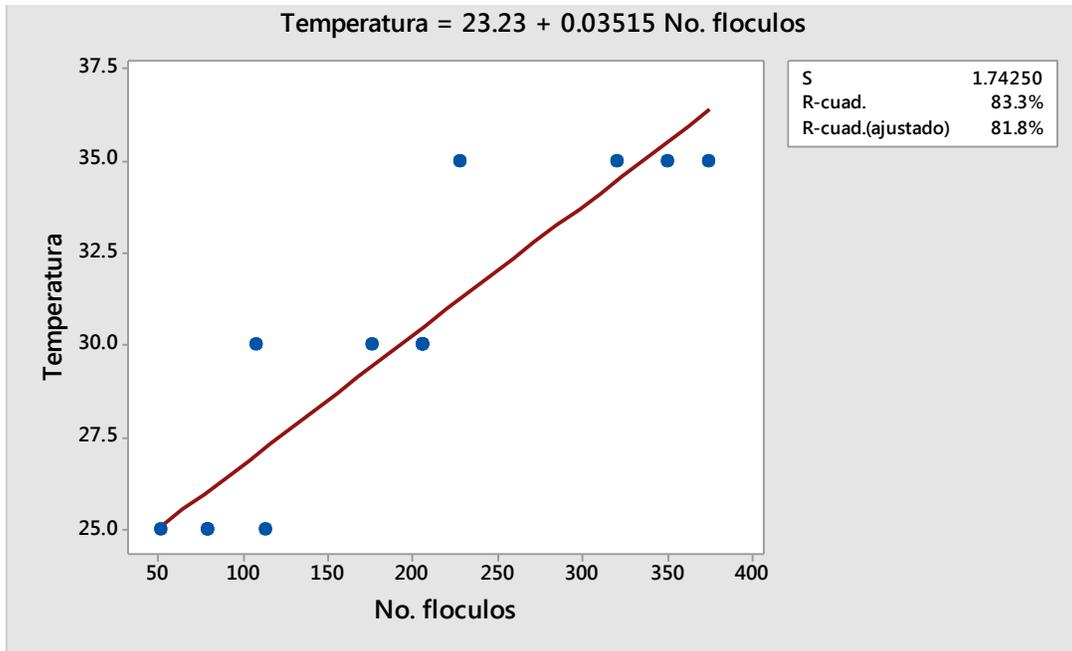
$R^2= 94.75\%$

Los efectos significativos que influyen en la respuesta se pueden observar en la gráfica 4.28.



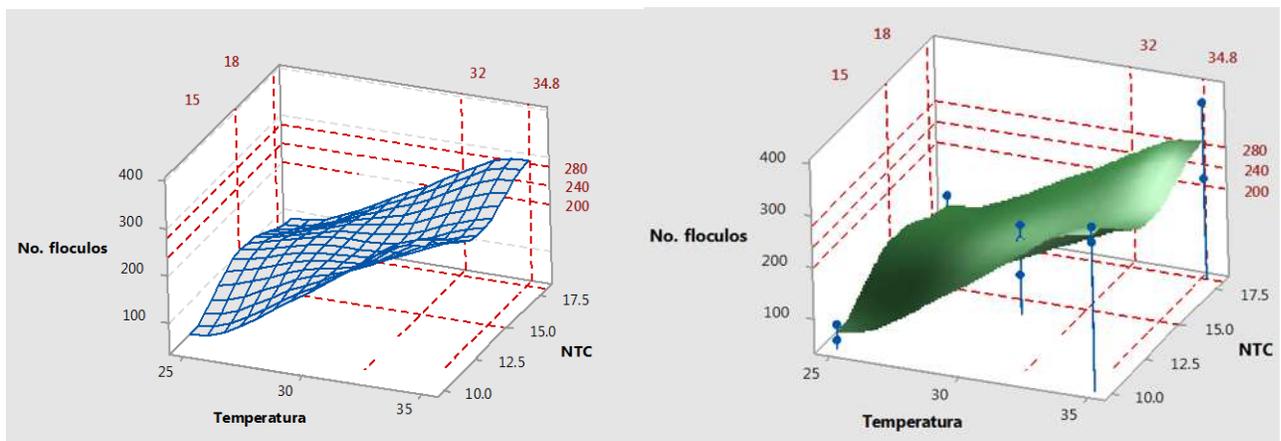
**Figura 4. 30 Gráfica normal de efectos estandarizados.  $\alpha= 0.1$ .**

Como el efecto individual de mayor influencia es la temperatura, se determina mediante una gráfica de regresión lineal, figura 4.29 que el aumento en el número de flóculos es directamente proporcional al aumento de la temperatura.

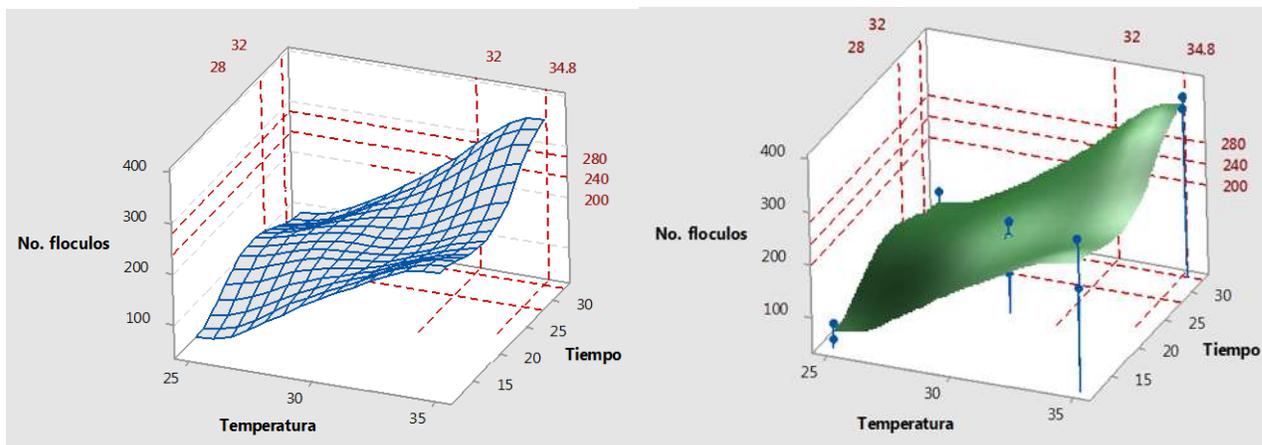


**Figura 4. 31 Gráfica de línea ajustada.**

Para una cantidad mayor de 200 flóculos se recomienda utilizar de 15 a 18 mg de NTC y un intervalo de temperatura de 32 a 34.8, como se muestra en la figura 4.30.



**Figura 4. 32 Gráfica de superficie de No. de flóculos vs. NTC, temperatura.**



**Figura 4. 33 Gráfica de superficie de No. de flóculos vs. Tiempo, temperatura.**

Como se observa, de acuerdo a los parámetros evaluados mediante Minitab, los factores que más influyen tanto en la respuesta de etanol como del número de flóculos son, temperatura, tiempo y la interacción temperatura-concentración de Nanotubos de Carbono, con diferentes intervalos como se muestra en la tabla 4.8.

**Tabla 4. 8 Resumen de los factores que más influyen en las respuestas.**

<b>Factor</b>	<b>Respuesta</b>	
	<b>Etanol</b>	<b>No. de flóculos</b>
<i>Temperatura</i>	27 a 32 °C	32 a 34.8 °C
<i>Tiempo</i>	20 a 29 horas	28 a 32 horas
<i>Temperatura-NTC</i>	13 a 18 mg	15 a 18 mg

De acuerdo a esto se puede decir que las condiciones favorables para ambas respuestas serian, 32° C, 29 horas y de 15 a 18 mg de Nanotubos de Carbono.

## Capítulo 5. Conclusiones

Se obtuvieron nanotubos de carbono de pared múltiple por medio del método de rocío pirolítico utilizando como catalizador ferroceno y como fuente de carbono  $\alpha$ -pineno.

El número de grupos carboxilo, presentes en la pared del nanotubo de carbono, aumenta utilizando para purificar solamente ácido nítrico al 65%.

De acuerdo a los valores utilizados de forma empírica para realizar el experimento se determina que la capacidad de floculación de la levadura aumenta bajo las condiciones de 35°C, 22 horas de fermentación y 18 mg de nanotubos de carbono, formando 387 flóculos en 100 ml de mosto cervecero.

Mediante el programa Minitab se evaluó la influencia de los factores utilizados en el diseño de experimentos, tanto para la respuesta número de flóculos, como para el porcentaje de etanol, estableciendo que el factor de mayor influencia es la temperatura, seguido del tiempo, y la interacción temperatura-concentración de Nanotubos de Carbono.

Se evaluó la producción de etanol con ausencia y presencia de nanotubos de carbono, obteniendo 6.63% de etanol bajo las condiciones de 30°C y 14 mg de nanotubos de carbono, como el porcentaje más alto. En estas condiciones se formaron 206 flóculos en 22 horas, lo cual indica que la presencia de nanotubos de carbono en el medio no afecta la fermentación, ya que el testigo que no tenía nanotubos de carbono tuvo 6.05% de etanol.

De cada una de las condiciones se monitoreo el perímetro de los flóculos bajo diferentes tiempos, teniendo en promedio 180 flóculos con perímetro mayor a 0.1 cm, en las condiciones de 35°C y 22 horas. Conforme pasaba el tiempo cercano hacia las 32 horas el perímetro del flóculo disminuyo hasta 0.01 cm.

Se obtuvo un biocatalizador constituido por flóculos levadura *Saccharomyces cerevisiae* inducidos por adhesión de nanotubos de carbono funcionalizados que fermenta los azúcares presentes en mosto cervecero manteniendo la producción de etanol y permite la separación de biomasa del medio.

## Referencias Bibliográficas

- (RAE) (Real Academia Española), 2013. Diccionario de la lengua española (en línea). Consultado 15 Nov. 2013 Disponible en: <http://lema.rae.es/drae/?val=cerveza>.
- Aguilar Uscanga B.; Solis Pacheco J. (2005). Variation study of the composition of the polysaccharides contained in the cellular Wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal.
- Andrade Guel, L.M; Lopez L.I. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.
- Badosz, T.J., Jagiello J. y Schwarz J., (1992), Comparison of methods to assess surface acidic groups on activated carbon carbons. Anal. Chem. 64, 891-895
- Bardi, E. P. et al., (1996). Room temperature and low temperature wine making using yeasts immobilized on glutem pellets. *Process Biochemistry*. 31: 425-430.
- Baron G. et al., (2004). Cell immobilization in preformed porous matrices. In: Nedovic V, Willaert R (eds) Fundamentals of cell immobilisation biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 229–244.
- Boehm, H.P., (1970), Chemical identification of surface groups. Heildeberg, Germany
- Boehm, H.P., (1994), Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. Carbon 32 (5), 759-769.
- Boulton, Chris; Quain, David (2001). Brewing yeast and fermentation. Ed. Blackwall Science. p.p. 19-60. USA.
- Brányik, et al., (2004). Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor. *Biotechnol Bioeng* 88:84–93.
- Chu, F. W.; Rahmel, A. (1981). Conversion of Chromium Oxide to Chromium Carbide. *Oxidation of Metals*. 15: 331-337.
- Díaz, López G.M. (2008). Síntesis de nanotubos de carbón por pirólisis de hidrocarburos botánicos. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Ingeniería Química.
- Folch-Mallol, Jorge, et al., (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista latinoamericana de Microbiología. Vol. 46. pp.24-46.
- García Garibay et. al. (2004), Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa. p.p. 313-341. México D.F.
- Gou, T., et al., (1995). Self-Assembly of Tubular Fullerenes. Department of Physics and Astronomy and Center for Fundamental Materials Research, Michigan State University.
- Hardwick, (1995). Hand book of brewing. Ed. Marcel Dekker, inc. p.p 714. New York, USA.

- Hernández Santana, Fremio (2009). Efecto de la temperatura y el tiempo de maceración en la elaboración de un prototipo de cerveza Bock. Honduras.
- Higginson James Antony. (2010). Feasibility of beer brewing using nano-biocatalyst synthesis from yeast cells and carbon nanotubes. Faculty of Engineering and the Built Environment, University of the Witwatersrand.
- Iijima, S.; others. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991, 354 (6348), 56-58.
- Ivanova Viara, et al., (2011). Application in the ethanol fermentation of immobilized cells in matrix of alginate/magnetic nanoparticules on chitosan-magnetite. *International Review of Chemical Engineering*, Vol.3.
- Klis M. Fran, et al., (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Reviews* 26: 239-256.
- Kourkoutas, Y., et al., (2004). Immobilisation technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, *Food Microbiology*, vol.21,pp.377-397.
- Kumar, M., et al., (2003). Field emission from camphor-pyrolyzed carbon nanotubes. *Chemical Physics* 385:161-165.
- Kunze, W., Wainwright, T. and Mieth, H O. (1999) *Technology brewing and malting*, Berlin: VLB, vol. 2
- Lebeau, T. et al., (1998). Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. *Enzyme Microb Technol* 22:434-438.
- Mamvura, A.Tirivaviri. (2010).Yeast cell immobilisation on carbon nanotubes for fermentation processes. Faculty of Engineering and the Built Environment, University of the Witwatersrand.
- Ochoa Fajardo, Raúl et. al.,(2011) *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* Volumen 3,
- Plessas, S., et al., (2007). Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation.
- Sampermans, S. et al., (2005). Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J Appl Microbiol* 98:525-531.
- Shen H-Y. et al., (2003). Impact of attachment immobilization on yeast physiology and fermentation performance. *J Am Soc Brew Chem* 61:79-87.
- Strehaiano, P. et al., (2006). Yeasts as biocatalysts. In: Querol, A., Fleet, G. (Eds) *Yeasts in food and beverages*. Springer-Verlag: 243-284.
- Suárez Lepe, et al., (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. (ISBN. 84-8476-184-3), Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp: 668-672.
- Tang, P.D.P. (2013). Fermentation performance of free and immobilized yeast on cork (*Sonneratia caseolaris*) root – application of immobilized yeast to repeated batch ethanol fermentation. *International Food Research Journal* 20: 1813-1817.

- Verbelen, P. J. et al., (2006). Immobilized yeast cell Systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*. 28: 1515-1525.
- Verstrepen, K. J. et al., (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 197-205 200.
- Virkajärvi, I. (2001). Feasibility of continues main fermentation of beer using immobilized yeast. Technical research Centre of Finland, ESPOO.
- Ward L. Ian (2007). Agentes clarificantes en marmita para cerveza. 26-31.
- Yang, Wenrong; Thordarson, Pall. (2007). Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*. 18: 412001.
- Yu, J., et al., (2007). A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology* 129: 415-420.

## Apéndice A. La cerveza como bebida

La cerveza es elaborada a partir de un cereal fermentado, el cual puede ser cebada, trigo, centeno o arroz, se le agregan sabores como lúpulo, hierbas, frutas, o incluso chocolate, obteniéndose diversos tipos de cerveza. Indistintamente del tipo de cerveza los cuatro ingredientes básicos para su elaboración.

### 1. Ingredientes de la cerveza

#### 1.1 Agua

La composición iónica del agua para la preparación del mosto ejerce influencia crucial en el éxito o resultado del proceso de elaboración de la cerveza, ya que alrededor del 90% de la cerveza es agua. Para observar rendimiento óptimo del proceso y con el fin de obtener alta calidad del producto, el agua requiere tener ciertas características iónicas. Con el fin de tener agua que pudiera ser utilizada para todo tipo de cervezas, se comenzó a eliminar los minerales presentes en ella y agregar las sales necesarias. Su importancia radica en que contribuyen a la nutrición de la levadura, y al sabor de la cerveza. Parte de estos iones permiten obtener pH bajo para que sea posible llevar a cabo la fermentación, por ejemplo, las interacciones entre iones de calcio y fosfatos con proteínas y polipéptidos, los cuales contienen glutamato y aspartato, al reaccionar liberan protones, o los iones de calcio pueden interaccionar con grupos amino para reducir el pH (Boulton, 2001). Los efectos de los iones en el agua se resumen en la Tabla 1:

**Tabla AP 1. Efectos de los iones en el agua.**

<b>Ion</b>	<b>Efecto</b>
<b>Amonio</b>	Indica contaminación con descomposición de materia orgánica.
<b>Calcio</b>	Interacciones de fosfatos y proteínas para reducir el pH, precipita el oxalato del mosto el cual es el que le da la turbidez, activa la $\alpha$ -amilasa y las proteasas, promueve la floculación de la levadura al final de la fermentación.
<b>Cobre</b>	Tóxico para la levadura.
<b>Hierro</b>	Tóxico para la levadura, produce cambio de color en la cerveza.
<b>Magnesio</b>	Reduce el pH del mosto por interacciones con fosfatos. Co-factor de varias enzimas que intervienen en la fermentación.

---

<b>Manganeso</b>	Co-factor de las enzimas presentes en la malta.
<b>Potasio</b>	Confiere sabor salado a la cerveza.
<b>Sodio</b>	Confiere sabor dulce a la cerveza.
<b>Zinc</b>	Inhibidor del crecimiento de la levadura a concentraciones mayores de 1 ppm.
<b>Bicarbonato</b>	Incrementa el pH a concentraciones mayores a 100 ppm.
<b>Cloruro</b>	Confiere sabor salado a concentraciones de 400 ppm e inhibe la fermentación a 600 ppm.
<b>Fosfatos</b>	Interactúa con calcio y magnesio para reducir el pH, nutriente esencial de la levadura.

---

### 1.2 Malta

La malta es el grano de cebada germinado y posteriormente secado. Este cereal contiene alta cantidad de almidón, y de enzimas que lo transforman en azúcares fermentables. Toda la cebada pertenece a la especie *Hordeum spontaneum*; las dos subespecies utilizadas para la elaboración de la malta son *Hordeum distichum* o *Hordeum deficiens* (García et al., 2004).

### 1.3 Lúpulo

El sabor amargo y la aroma de la cerveza se deben al lúpulo, siendo su principal función. Otra aportación es como conservador, inhibiendo microorganismos patógenos indeseables. El lúpulo es una planta dioica, es decir, que existe lúpulo femenino y lúpulo masculino; para la elaboración de la cerveza se utilizan las flores femeninas antes de ser fecundadas (Hernández, 2009). Estas flores tienen forma de conos y en su interior tienen unas glándulas llenas de resina de color amarillo, denominada lupulina, las cuales contienen los ácidos alfa que le dan el sabor amargo, contribuyen a la formación de espuma y ayudan a su conservación. Existen distintas variedades de lúpulo, que proporcionan distintos grados de aroma y amargor. Cada productor utilizara una u otra variedad, o varias especies en distintos momentos del proceso de elaboración, dependiendo del carácter que se le quiera dar a la cerveza. Además del lúpulo se le pueden añadir otro tipo de hierbas, especias, o frutas.

### 1.4 Levadura

Las levaduras son microorganismos que se le añaden al mosto en el proceso de fermentación y transforman los azúcares en alcohol y dióxido de carbono.

Cada tipo de levadura originará un proceso de fermentación diferente, dando como resultado diferentes tipos de cerveza. De acuerdo al tipo de fermentación, las cervezas se pueden clasificar en:

- Ale.- De fermentación alta, en las que las levaduras actúan a temperaturas altas y se acumulan en la superficie del mosto.
- Lager.- De fermentación baja, en donde las levaduras actúan a temperaturas bajas y se depositan en el fondo del tanque de fermentación.

## 2. Proceso de elaboración

El proceso de elaboración de cerveza se puede describir en las siguientes etapas.

### 2.1 Malteado

De acuerdo con Hardwick (1995) el proceso de malteado existen 3 fases (Figura 1):

- a) Remojo:** El grano se limpia y se selecciona, posteriormente en tanques de fondo cónico son sumergidos en agua durante un periodo de 40 a 48 horas hasta que la humedad se incremente de 10 hasta 41-45%. Este remojo se realiza en cajas de 60 cm de altura con cambios de 6 u 8 horas y temperatura de 10-15°C. Para lograr una germinación más rápida y uniforme se airea la cama durante el remojo (Hernández, 2009). La aireación es muy importante en el proceso de germinación debido a que es un proceso fisiológico que requiere de oxígeno, además también se elimina el dióxido de carbono producido (García et al.,2004).
- b) Germinación:** Del tanque de remojo la cebada es transferida a cajas de germinación, donde permanece por aproximadamente 4 días a 13-16° C. El grano mojado se extiende sobre grandes superficies (suelo o charola) y se mueve de forma manual o mecánica, el movimiento es muy importante ya que permite la respiración adecuada del grano; además ayuda a mantener temperatura homogénea. Al final del proceso la temperatura puede incrementar y alcanzar los 21° C por efecto de la actividad metabólica. La germinación continúa hasta que el acróspiro (plúmula) de la mayoría de los granos alcanza una longitud aproximada de  $\frac{3}{4}$  del tamaño del grano, lo cual ocurre entre los seis y siete días. En este momento se obtiene lo que se conoce como malta

joven o verde; este fenómeno natural, indica que el almidón de la cebada se hace soluble, preparándose para su conversión en azúcar (Hardwick, 1995).

- c) Secado:** Para detener la germinación la malta verde previniendo la desnaturalización de las enzimas requeridas para el proceso, se lleva a unos tostadores en los que se hará pasar aire seco y caliente a 80° C, disminuyendo el contenido de humedad de la malta hasta un 4%; dependiendo de la temperatura a la que se seque se obtendrán distintos tipos de malta, entre 55 y 70° C para maltas lager y entre 60 y 95° C para maltas ale; aunque algunas maltas oscuras se hornean a temperaturas entre 105 y 177° C. Mientras mayor sea la temperatura de horneado se obtendrán maltas más oscuras pero con menor actividad enzimática. Posteriormente la malta pasa por unos rodillos cilíndricos, provocando su fragmentación, obteniéndose partes del grano que contienen almidón y amilasas, y por otra parte la cascarilla.

## 2.2 Macerado

El macerado se realiza mezclando la malta molida con agua caliente. Primero se realiza una mezcla llamada masa de crudos, en donde se adiciona en una olla aproximadamente el 15% de la malta molida total que se utilizará en el proceso, y agua hasta conseguir una masa uniforme. Esta masa se hace hervir por unos minutos con el fin de encrudecer el almidón para facilitar el ataque de las enzimas. Al mismo tiempo, el resto de la malta molida, se coloca en una olla llamada de mezclas a temperaturas entre 45 y 60° C, con la finalidad de solubilizar sus componentes, a esto se le conoce como maceración. En este proceso las enzimas presentes, como las  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas, estarán listas para actuar sobre la masa cruda. La masa cruda es bombeada a la olla de mezclas a aproximadamente 98° C, con agitación constante, llevándose hasta 70 a 72° C. Luego la solución completa se somete a unos 76° C y pH 7, parámetros a los cuales, la acción enzimática es sumamente rápida. Esta acción realizada por las  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas presentes en la olla de mezclas, se le denomina sacarificación. Estas enzimas cortan las cadenas de almidón de dos en dos glucosas, cada pareja se combina con agua formando una molécula de maltosa, se detienen en el momento en que la cadena de almidón tiene un número de moléculas de glucosa impar (Hardwick, 1995). Este proceso debe de realizarse bajo condiciones controladas de pH y temperatura, ya que las enzimas se pueden desnaturalizar provocando un proceso ineficiente en la

conversión de azúcares, dando como resultado problemas durante la fermentación. Se obtiene una solución con muchas partículas sólidas, para retirarlas la solución pasa a la olla de filtración, obteniéndose una solución rica en azúcares fermentables de sabor dulce y consistencia pegajosa llamada mosto, a la parte sólida se le denomina bagazo

### **2.3 Adición del Lúpulo**

Una vez que se obtiene el mosto, pasa al tanque u olla de cobre o acero inoxidable calentándolo donde se le adiciona el lúpulo se somete a ebullición durante 30-90 min a presión atmosférica, la cantidad de lúpulo adicionada varía dependiendo del tipo de cerveza, entre 0.14 y 0.42 kg por hectolitro (García et al., 2004). De acuerdo con García et al. (2004), los objetivos de esta operación son:

- a)** Coagular proteínas y favorecer las reacciones entre taninos y proteínas para la formación de compuestos insolubles que precipitan clarificando así el producto.
- b)** Esterilizar el mosto para evitar la presencia de microorganismos indeseables que compitan con la levadura durante la fermentación.
- c)** Promover reacciones de Maillard y de oxidación de compuestos fenólicos para la formación de melanoidinas que contribuyen al color y sabor de la cerveza.
- d)** Volatilizar y remover compuestos que confieren aromas indeseables.
- e)** Disminuir el pH por precipitación de fosfato de calcio y otros iones. Eliminar agua (10 % del volumen aproximadamente) para concentrar el mosto.

El mosto es enfriado hasta temperaturas entre 20 y 25° C; debido a que el mosto es un caldo de cultivo óptimo para el crecimiento de otros microorganismos se requiere de condiciones extremas de asepsia en los materiales utilizados.

### **2.4 Fermentación**

La fermentación se divide en dos fases, una denominada fermentación principal y otra llamada fermentación secundaria. La fermentación principal lleva de 6 a 10 días a temperaturas que oscilan entre 20 y 25° C. Durante esta etapa, se adicionan las levaduras responsables de la fermentación al mosto

contenido en el tanque. La levadura es un hongo capaz de transformar el azúcar maltosa en alcohol y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno, sin embargo, en la etapa inicial se requiere un crecimiento rápido de la levadura, para lo cual se requiere la presencia de oxígeno. Una vez que la levadura consumió todo el oxígeno presente en el mosto, comienza a producir alcohol mediante el proceso llamado fermentación alcohólica, a pH 4.5-5.5 (Ward, 2007). El objetivo de la fermentación principal es el crecimiento de la levadura, el cual se hace notar por la aparición de una capa de espuma blanca en la superficie del fermentador. Conforme el sustrato es consumido (azúcares), la levadura tiende a depositarse en el fondo del fermentador, a este fenómeno se le denomina floculación, y la capa de espuma tiende a desaparecer. Cuando esto ocurre la cerveza se trasvasa a otro tanque, con la finalidad de que la levadura que ha floculado no transfiera sabores desagradables a la cerveza. Para cervezas tipo lager la fermentación secundaria se realiza alrededor de 10 y 15° C, y de 15 a 20° C para las cervezas ale en un tiempo de 8 a 14; y de 5 a 7 días respectivamente; el objetivo de esta segunda etapa es clarificar y madurar la cerveza. Luego la cerveza se filtra para eliminar las proteínas, levadura y otras sustancias que hayan coagulado. La relación de conversión de carbohidratos a alcohol se maneja en cervecería como atenuación; valores típicos de atenuación son de 70-80% (García et al., 2004).

### **2.3 Envasado**

Después de la fermentación secundaria la cerveza queda con poco gas, por lo que al momento de envasarla se le adicionan pequeñas cantidades de azúcar o mosto, para que las levaduras que aún no han precipitado, consuman el azúcar o los azúcares presentes y generen dióxido de carbono. A nivel industrial este paso se realiza mediante la adición directa de dióxido de carbono.

### **3. Norma Oficial Mexicana para bebidas alcohólicas**

La Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995 determina las especificaciones para la elaboración de bebidas alcohólicas, que se definen como aquellas bebidas obtenidas por fermentación, principalmente alcohólica de la materia prima vegetal que sirve como base utilizando levaduras del género *Saccharomyces*, sometida o no a destilación, infusión, maceración o cocción en presencia de productos naturales susceptibles de ser añejadas, y pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos, con graduación alcohólica de 2% a 55% en volumen a 20° C (Diario Oficial de la Federación).

Como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas, únicamente se permite el uso de alcohol etílico cuyo contenido de productos secundarios no exceda las siguientes especificaciones (Tabla 2).

**Tabla AP 2. Especificaciones del contenido de productos secundarios.**

<b>Especificaciones</b>	<b>Límite máximo (mg/100 ml)</b>
<b>Metanol</b>	100
<b>Aldehídos</b>	30
<b>Alcoholes superiores</b>	200

En donde alcoholes superiores significa compuestos orgánicos con más de 2 átomos de carbono y uno o más grupos hidroxilos. Los principales alcoholes superiores de las bebidas alcohólicas son: propanol, 2-butanol, feniletil alcohol, alcohol isobutílico (metil-2-propanol) y alcoholes amílicos (mezcla de metil-2-butanol-1, metil-3-butanol-1 y pentanol-1). A la mezcla de estos cuatro últimos alcoholes se le llama "aceite de fusel".

Para la regulación del pH los aditivos permitidos se describen en la Tabla 3.

**Tabla AP 3. Aditivos permitidos por la Normal Oficial Mexicana.**

<b>Regulador de pH</b>	<b>Cantidad (g/l)</b>
<b>Ácido cítrico</b>	BPF
<b>Citrato de sodio</b>	BPF
<b>Citrato de potasio</b>	BPF
<b>Ácido tartárico</b>	0.15
<b>Tartrato de sodio y potasio</b>	0.15
<b>Ácido láctico</b>	BPF
<b>Ácido fosfórico</b>	0.84
<b>Fosfato de amonio</b>	0.84
<b>Fosfato de sodio dibásico</b>	BPF
<b>Ácido málico</b>	BPF
<b>Polivinilporrolidona</b>	0.010
<b>Alginatos</b>	10
<b>Glicerina</b>	5
<b>Glicirrina</b>	1
<b>EDTA</b>	0.025

<b>Heptilparabeno</b>	0.012
<b>Dimetilpolixiloxano</b>	0.010
<b>Acido benzoico</b>	0.2
<b>Acesulfame K</b>	0.35
<b>Sacarina</b>	80

La determinación de aldehídos, esterés, metanol y alcoholes superiores se realiza por cromatografía de gases.

## Apéndice B. Formulación de medios de cultivo

Medio de cultivo YEPD

Glucosa.....2g  
Extracto de levadura.....1g  
Peptona de carne..... 1g  
Agar.....2g

Cantidad para preparar 100 ml de medio sólido, para medio líquido no agregar agar.

Ajustar el pH del medio con hidróxido de potasio o ácido clorhídrico, hasta obtener un pH de 5.

Medio de cultivo malta

Malta molida.....120g  
Agua destilada.....1000ml

## Apéndice C. Determinación de sitios activos

La concentración de los sitios activos presentes en la superficie de los nanotubos de carbono se determinó empleando el método de titulación ácido-base propuesto por Boehm (1970). El método se fundamenta en la titulación de los grupos ácidos o básicos de los nanotubos de carbono con soluciones

neutralizantes. Los sitios ácidos se neutralizaron con una solución valorada de NaOH y los sitios básicos con una solución valorada de HCl.

Los sitios ácidos neutralizados con la solución valorada de NaOH corresponden a la suma de los sitios carboxílicos, lactónicos y fenólicos. Las concentración de sitios carboxílicos se determinó empleando solución valorada de NaHCO<sub>3</sub> (Bandosz y Jagiello, 1992).

La concentración de sitios activos de los nanotubos de carbono se determinó experimentalmente adicionando 0.0007 g de nanotubos y 50 ml de una solución neutralizante a un recipiente de plástico de 75 ml, el recipiente se selló con una película Parafilm y se cerró con su tapa. Posteriormente, el recipiente se sumergió en un baño de temperatura constante a 25°C por 5 días y se colocó en el shaker a 180 rpm. Al transcurrir dicho periodo, se tomó una alícuota y se tituló con solución valorada. La concentración de los sitios activos se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$C_A = \frac{V_O(C_{IN} - C_{FN})}{m}$$

Dónde:

- C<sub>A</sub> = Concentración de los sitios activos (meq/g).
- C<sub>IN</sub> = Concentración inicial de la solución neutralizante, (meq/L).
- C<sub>FN</sub> = Concentración final de la solución neutralizante, (meq/L).
- m = Masa del adsorbente, (g).
- V<sub>O</sub> = Volumen inicial de solución neutralizante, (L).

La concentración final de la solución neutralizante se determinó por medio de la expresión siguiente:

$$C_{FN} = \frac{V_T C_T}{V_M}$$

Dónde:

- C<sub>T</sub> = Concentración de la solución titulante, (meq/L).
- V<sub>T</sub> = Volumen empleado de la solución titulante, (L).
- V<sub>M</sub> = Volumen de la muestra de la solución neutralizante, (L).

## Apéndice D. Determinación de peso seco

La determinación de peso seco se realizó en base a la metodología realizada en el laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia. Esta determinación se realiza con el medio de malta libre de sólidos, para lo cual se centrifuga y se realiza por triplicado.

### Material y Reactivos

- Micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$
- Horno
- Charolas metálicas de desecación.
- Pinzas de desecación
- Balanza
- Muestras de extracto de malta
- Puntas para micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$

### Metodología

1. Se colocan las charolas necesarias; totalmente limpias y marcadas en el horno a 55 °C por 24 horas a peso constante.
2. Después de esto las charolas se sacan del horno y se pesan, se debe de apoyar con las pinzas para tomar cada una de las charolas metálicas y no tocar directamente con las manos para no alterar el peso. Se registra los pesos de cada una de las charolas.
3. Se colocan 1000  $\mu\text{L}$  de cada muestra de extracto de malta en las charolas metálicas correspondientes.
4. Y con mucho cuidado se colocan el horno, usando las pinzas, para eliminar toda la posible humedad presente en el extracto, por 24 horas.
5. Una vez transcurrido este tiempo las charolas se vuelven a pesar. El peso de cada una se registra, las charolas se lavan y secan.

### Análisis de Resultados

Para determinar la concentración mediante el peso seco, se realiza una resta del peso obtenido con el extracto menos el peso obtenido sin él. Dado que el ensayo se realiza por triplicado, se promedian los resultados de cada ensayo y se expresa en gramos por mililitro de extracto (g/ml).

## Apéndice E. Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS

Para la cuantificación de azúcares reductores se preparó el reactivo DNS de la siguiente manera:

Agregar en el siguiente orden los reactivos:

0.8 g	Hidróxido de Sodio (NaOH)
15 g	Tartrato de Sodio y Potasio (Sal de la Rochelle)
0.5 g	Ácido Di-Nitro Salicílico (DNS)

Aforar con agua destilada hasta completar 50 ml.

Guardar en frasco ámbar y rotular con nombre de reactivo.

Una vez que el reactivo ha sido preparado, se procede a realizar la cuantificación de azúcares reductores, siguiendo la metodología como se muestra a continuación:

### Determinación de Azúcares Reductores

Tabla 1. Materiales y Reactivos

Reactivo DNS	Soporte universal, anillo y rejilla con asbesto
Muestra	Mechero Bunsen
Agua destilada	Recipiente para baño con hielo
Tubos de ensaye con tapa	Recipiente con agua para baño maría
Puntas para micropipeta	Celdas para lectura
Espectrofotómetro	Micropipetas (0.5 -10 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L y 100-1000 $\mu$ L)
Tubos Eppendorf	2 vasos de pp. para depositar puntas utilizadas

**NOTA:** Es MUY IMPORTANTE utilizar el equipo de protección adecuada, como lo son guantes de látex, cubre bocas y bata, debido a que el DNS es un reactivo cancerígeno.

### Metodología

1. Diluir correctamente la muestra. En este caso se trata de cinéticas con mosto cervecero, por lo que el contenido de azúcares es muy alto, y se debe mantener la relación 1:99, es decir, agregar 1 $\mu$ L de muestra y diluir en 99 $\mu$ L de agua destilada. Rotular el tubo correspondiente a cada periodo de tiempo.
2. Encender espectrofotómetro.

3. Tomar 100µL de cada muestra diluida en los tubos Eppendorf y llevar a tubos de ensaye cambiando cada punta utilizada en cada muestra. Rotular.
4. Agregar cuidadosamente 100µL de Reactivo DNS, procurando no tocar las paredes de los tubos de ensaye. En caso de hacerlo, retirar punta y utilizar una limpia (las puntas usadas en este paso deben desecharse). Agitar y rotular.
5. Tapar tubos de ensaye SIN apretar completamente, ya que de hacerlo se generará un vacío al calentarlo y enfriarlo se dificultará su posterior apertura.
6. Colocar los tubos de ensaye en baño maría entre 95 - 100°C por 5 minutos. Es importante utilizar el recipiente de uso exclusivo para este método (consultar con el asesor). Preparar baño de hielo.
7. Retirar cuidadosamente los tubos y poner en baño de hielo por 5 minutos o hasta lograr enfriamiento para detener la reacción.
8. Agregar a cada tubo 1.0 mL de agua destilada y vaciar en celda para su posterior lectura, cuidando no confundir las muestras.
9. Realizar lectura a una longitud de onda de 540 nm.
10. Terminada la lectura, depositar los residuos de DNS (puntas y reactivo usado) en sus recipientes correspondientes.

### Elaboración de Curva de Calibración

Se deberá elaborar una por cada Reactivo DNS que se prepare.

1. Preparar 10 mL de una solución de 10.0 g/L de azúcar (glucosa, fructosa, xilosa, etc. O su mezcla apropiada). (Stock de glucosa).
2. Por diluciones preparar una gama de concentraciones 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 y 0.32 g/L., usando la fórmula:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

Dónde:

$V_1$  = Volumen necesario para llevar a cabo la técnica.

$C_1$  = Concentración utilizada en el stock (10 g/L).

$V_2$  = 1200 microlitros (Volumen Total).

$C_2$  = Gama de concentraciones (0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 g/L).

Por lo tanto:

Concentración	Volumen de Stock glucosa	Agua destilada
0.01	1.2 µL	98.8 µL

0.02	2.4 µL	97.6 µL
0.04	4.8 µL	95.2 µL
0.08	9.6 µL	90.4 µL
0.16	19.2 µL	80.8 µL
0.32	38.4 µL	61.6 µL

3. Se lleva a cabo la metodología de la técnica de DNS a partir del punto 4.
4. Leer a 540 nm y obtener la ecuación que relaciona la concentración con absorbencia; obteniéndose la R<sup>2</sup> más cercana a 1.

### Análisis de Resultados

Se calcula la concentración total de azúcares reductores en cada muestra haciendo uso de la siguiente ecuación y empleando una hoja de cálculo como Excel.

$$x = \frac{y - b}{m} * \frac{\delta}{M.E.}$$

Donde:

x = concentración (g/L)  
y = absorbencia

δ = Vol. Final de reacción (0.0012)  
M.E. = cantidad de muestra empleada (L)

**NOTA:** Los valores **m y b** provienen de la ecuación que modela la línea de tendencia de la curva de calibración para cada Reactivo DNS ( $y = mx + b$ ). El valor de **M.E.** debe ser en base a la cantidad de muestra empleada para obtener la relación en la dilución correspondiente.

Se representan los valores mediante una gráfica "Concentración (y) vs. Tiempo (x)" para poder observar la tendencia de disminución, de no ser así, repetir nuevamente.

## Apéndice F. Conteo en cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una gruesa placa de cristal de 30 x 70 mm y 4 mm de grosor. Está dividida en 3 partes, en la parte central se encuentra una retícula cuadrangular, que es donde se realiza el conteo celular. La retícula mide 3 mm x 3 mm de lado, subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1 mm. De los cuales el cuadrado central se divide en 25 cuadrados de 0.2 mm, y cada uno de estos cuadrados se subdivide en 16 cuadrados pequeños.



- Se cuentan las células marcadas en negro, que tocan o están encima de 2 líneas en un lado.
- El recuento se empieza en el ángulo superior izquierdo en dirección de la flecha.

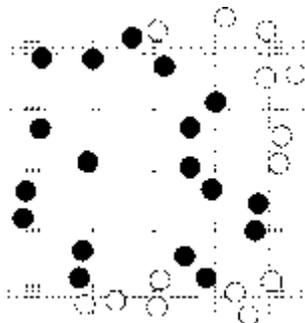


Figura. Unidades que se consideran dentro del conteo de células (puntos negros).

Para determinar la concentración se aplica la fórmula:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células} * 10000}{\text{Volumen (ml)} * \text{dilución}}$$

El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadrados.

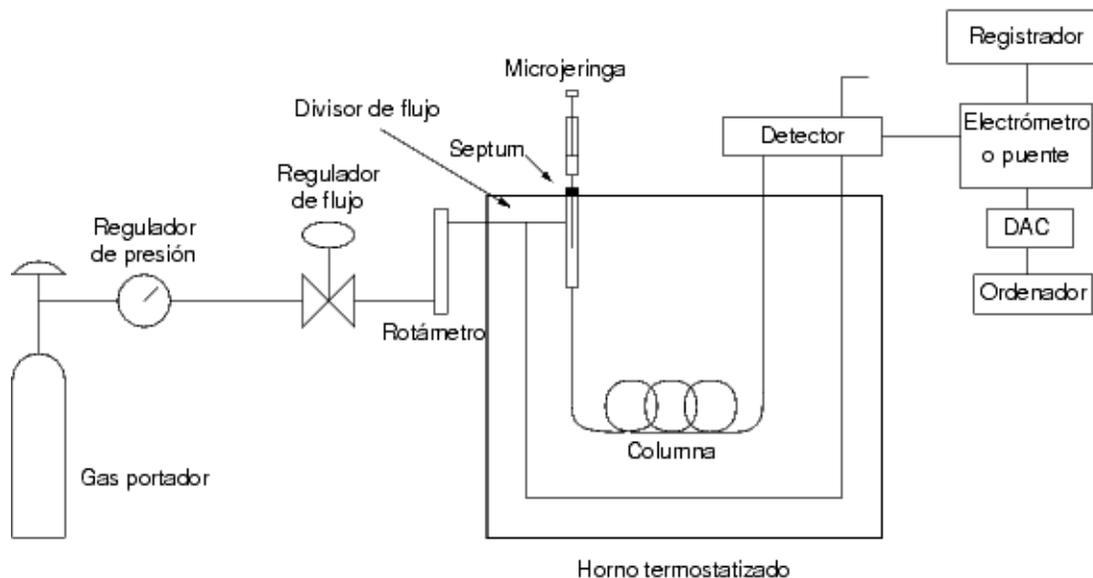
El volumen corresponde al volumen de la alícuota utilizada (1 ml).

Inmediatamente después del recuento realizado, se retira el cubre objeto y se limpia la cámara con agua destilada y se seca con un paño o se lava con acetona.

## Apéndice E. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación, para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de gas inerte a elevada temperatura; esta corriente de gas, atraviesa una columna cromatográfica que separa los

componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en muchos casos, por medio de la mezcla de ambos. Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestras.



### Preparación de curva de calibración.

1. Preparar a partir de etanol puro (99%) las diluciones necesarias para construir la curva de calibración que abarque la concentración aproximada de la muestra a analizar.

% Etanol	Vol. Etanol puro(μl)	Vol. Agua(μl)	Vol. Final(μl)
2	20.2 μl	979.8 μl	1000 μl
4	40.4 μl	959.6 μl	1000 μl
6	60.6 μl	939.4 μl	1000 μl
8	80.8 μl	919.2 μl	1000 μl
10	101.0 μl	899.0 μl	1000 μl

Se aplica la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$

Dónde:

$C_1$ = Concentración utilizada del etanol puro (99%).

$V_1$ =Volumen necesario para llevar a cabo la técnica.

$C_2$ =Gama de concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 %).

$V_2$ =1000 microlitros (Volumen total).

2.-Obtención de la ecuación de regresión lineal.

$$Y = mx + b$$

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) debe ser aproximado a 99.9% para hacer una medición confiable.

### **Inyección de la muestra.**

1. Encender el equipo de cómputo del cromatografo de gases.

2. Abrir los gases:

$N=80 \text{ lb/in}^2$

$H=40 \text{ lb/in}^2$

Aire= $60 \text{ lb/in}^2$

3. Encender el cromatografo

4. Seleccionar el método de acondicionamiento (Duración aproximada 35 minutos).

5. Seleccionar el método de inyección de muestras (método de estándares).

Inyección  $\longrightarrow$  Nombre de la muestra  $\longrightarrow$  Inyectar

6. Inyección de las diluciones de la curva de calibración (el equipo te mostrará cuando es momento de hacer la inyección "Waitting", esperar un tiempo para que ocurra la elusión del compuesto de interés, para el etanol son 4 min).

7. Tomar lectura del tiempo de retención y área de la curva.

8. Construcción del gráfico de la siguiente manera.

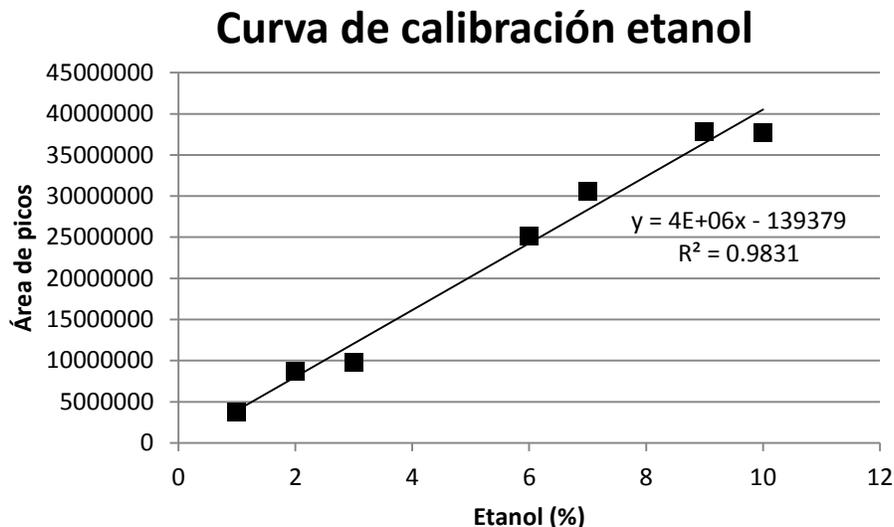


Figura 1. Ejemplo de curva de calibración de etanol.

9. Inyección de las muestras problema, seguir el mismo procedimiento del paso 5 en adelante.

## Apéndice F. Programa ImageJ

ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes digitales de dominio público. Este programa puede mostrar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes de 8, 16 y 32 bits, puede medir distancias, ángulos, calcular el área definida por el usuario, como la cantidad de flóculos que se analizaron en esta investigación.

El programa fue bajado del sitio web: <http://imagej.nih.gov/ij/>