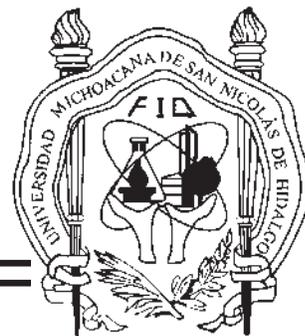




**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**OBTENCIÓN DE MEZCAL EN CULTIVO
SUMERGIDO CON *Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

RENÉ LEOBARDO MARTÍNEZ CORONA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

CO-DIRECTOR DE TESIS

M.C. EDGAR LEÓN ESPARZA IBARRA

MORELIA MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2010

RESUMEN

OBTENCIÓN DE MEZCAL EN CULTIVO SUMERGIDO CON *Saccharomyces cerevisiae*

Presenta: René Leobardo Martínez Corona

Se estudió el efecto de las variables pH, concentración de azúcares iniciales y el porcentaje de inóculo en la producción de mezcal, mediante el uso de levaduras nativas del género *Saccharomyces cerevisiae* de la región de Pinos y Villa Hidalgo, Zacatecas. La metodología experimental consistió en aislar y cultivar estas cepas nativas de los mostos fermentados en un medio sólido enriquecido de PDA, realizando fermentaciones durante 72 horas. Para el análisis de la influencia de las variables pH, concentración de azúcares iniciales (jugo de agave *Tequilana Weber var. Azul*) y porcentaje de inóculo, se realizó un diseño experimental Box-Behnken a diferentes niveles con su respectiva réplica, que permitió analizar estas variables de manera estadística mediante el software STATGRAPHICS Plus para el diseño en conjunto. Mediante el análisis del diseño experimental se obtuvo que la cantidad de azúcares iniciales es la variable más significativa sobre la producción de etanol, y que el crecimiento de las levaduras depende de igual manera de la cantidad de sustrato inicial. En base al análisis estadístico del diseño experimental planteado, se encontró que las condiciones que mejoran la producción de etanol, son pH de 4.4, concentración de azúcar de 11.5 °Brix y la cantidad de inóculo de 9 %V, obtenidas al resolver la ecuación que relaciona estas variables con la producción de etanol.

Se realizaron también los ajustes de los datos experimentales obtenidos mediante el modelo de Gompertz de dos parámetros, Logístico y Gompertz de tres parámetros para la biomasa, y el modelo de Monod para el consumo de sustrato, dando como resultado que el modelo de Gompertz de tres parámetros es el modelo que mejor ajusta por que toma en cuenta la inhibición del crecimiento por formación de producto y el modelo de Monod debido a que la biomasa depende de la disponibilidad del sustrato presente en el medio.

De igual manera se encontró que el tiempo de fermentación se ve favorecido por que a partir de las 40 horas se alcanza el máximo crecimiento de las levaduras y la máxima conversión de alcohol, con una velocidad específica de crecimiento de 0.46 h^{-1} y rendimiento de 0.5 g de biomasa/g de azúcares. A partir de este tiempo, la actividad celular se ve mermada por el agotamiento de la fuente de sustrato, la acumulación de desechos propios del metabolismo celular y la inhibición misma que representa la concentración de alcohol. Con las pruebas confirmatorias, se determinó que la cantidad máxima de etanol fue de 12.5 %V a diferencia del predicho por el modelo estadístico con el valor teórico más alto posible de 12.25 %V.

Dirigida por: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga

ABSTRACT

Mezcal obtainment in submerged culture using *Saccharomyces Cervisiae*

Presenting: René Leobardo Martínez Corona

The effect variables such as pH, initial sugar concentration and inoculum percentage have on mezcal production was studied, using native *Saccharomyces Cervisiae* yeasts, from the region of Pinos and Villa Hidalgo, Zacatecas. Experimental methodology involved isolating and cultivating these native strains from fermented agave juices, in a solid enriched PDA medium, carrying out fermentations during 72 hours. To analyze the influence variables like pH, initial sugar concentration (from blue agave juice, *Tequilana Weber* variety) and inoculum percentage, an experimental Box-Behnken design was performed using different levels and its corresponding replica that allowed to analyze these variables statistically as a whole, using Statgraphics Plus software. Through experimental analysis design it was determined that the initial amount of sugar added is the most significant variable over ethanol production and that yeast growth depends on initial substrate amount as well. Based on the experimental design statistic analysis, it was found that the conditions that improve ethanol production are pH equal to 4.4, sugar concentration of 11.5 °brix and inoculum quantity of 9% in volume, obtained by solving the equation that involves these variables and ethanol production.

The experimental data obtained was adjusted through Logistic and Gompertz (two and three parameters) mathematical models for biomass production and Monod for sugar consumption, resulting that two parameters Gompertz is the model that best fits the data since it considers growth inhibition due product formation and Monod model for biomass since it depends on substrate availability existing in the media.

It was also found that fermentation time was promoted and after 40 hours of fermentation the maximum yeast growth was reached and the maximum alcohol conversion as well, with a specific growth rate of 0.46h^{-1} and producing 0.5 g of biomass per g of sugar. Cellular activity was ceased by substrate source depletion and inhibition represented by alcohol concentration itself. After confirming experiments it was determined that maximum alcohol quantity was 12.5% in volume, unlike the maximum statistic model predicted value which is 12.25% in volume.

Adviser: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga

INDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIA	7
GLOSARIO	8
RELACIÓN DE FIGURAS	9
RELACION DE TABLAS	10
NOMENCLATURA	11
AGRADECIMIENTOS	12
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	13
1.1 Planteamiento del problema	14
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis de la investigación	14
1.4 Objetivo general	15
1.5 Objetivos particulares	15
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO	16
2.1 El agave	16
2.1.2 Norma oficial mexicana 070-SCFI-1994	17
2.1.3 El mezcal	17
2.1.4 Denominación de origen en México	18
2.2 Levaduras	19
2.2.1 Taxonomía	20
2.2.2 Metabolismo y funciones básicas de las levaduras	20
2.2.3 Crecimiento y división celular	21
2.3 La fermentación alcohólica	23
2.3.1 Transporte de los azúcares	24
2.3.2 Transformación de azúcares en piruvato	24
2.3.3 Conversión de piruvato a etanol	25
2.4 Compuestos volátiles generados durante la fermentación	25
2.5 Inóculo	25
2.6 Tipos de cultivos utilizados en la industria	26
2.7 Producción de etanol	27
2.8 Proceso de elaboración	27
2.8.1 La cocción	27

2.8.2	La molienda	28
2.8.3	La fermentación	29
2.8.4	Destilación	29
2.9	Matraz agitado	31
2.9.1	Volumen del matraz agitado	32
2.10	Diseño experimental de modelos de superficie de respuesta	32
2.11	Diseño Box-Behnken	33
2.12	Ajuste de datos	35
2.12.1	Modelos no estructurados para la descripción del comportamiento del crecimiento y consumo de sustrato	35
2.12.2	Modelo de Gompertz de dos parámetros	36
2.12.3	Modelos Logístico de dos parámetros	36
2.12.4	Modelos de Gompertz de tres parámetros	36
2.12.5	Modelo de Monod	37
2.12.6	Consumo de sustrato asociado al crecimiento	37
2.12.7	Discriminación de modelos	37
CAPÍTULO 3	DESARROLLO DEL TRABAJO	39
3.1	Sitio de origen de la muestra del mosto fermentado y muestreo	39
3.2	Aislamiento	39
3.3	Identificación morfológica	40
3.4	Preparación del inóculo	41
3.5	Medios de cultivo	41
3.6	Inicio de la fermentación	41
3.7	Esterilización	41
3.8	Diseño experimental	42
3.9	Variables que intervienen en el proceso	43
3.9.1	Pruebas de hipótesis para la media	43
3.10	Determinaciones analíticas	44
3.10.1	Biomasa	44
3.10.2	Azúcares reductores	44
3.10.3	Cuantificación de alcohol	44
3.11	Programas utilizados para la interpretación de resultados y ajuste de datos	45

CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSION	46
4.1	Análisis ANOVA	46
4.2	Interpretación de hipótesis para la media	46
4.3	Comportamiento de la producción de biomasa	47
4.4	Comportamiento del consumo de azúcares totales y reductores	48
4.5	Comportamiento del pH	50
4.6	Comportamiento de la obtención de etanol a las 72 horas de fermentación	50
4.7	Ecuación que describe la producción de etanol	51
4.8	Pruebas confirmatorias	54
4.9	Ajuste de los datos experimentales	55
4.9.1	Curvas de crecimiento, consumo de sustrato, y ajuste de los datos experimentales durante la fermentación en el experimento 6	56
4.10	Discusión general de resultados	57
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
5.1	Conclusiones	59
5.2	Recomendaciones	60
REFERENCIAS		61
APENDICE		65
A-1	Medio de cultivo PDA para el crecimiento de las levaduras	65
A-2	Método del peso seco para calcular la cantidad de Biomasa	65
A-3	Azúcares reductores	66
A-3.1	Reactivo DNS	66
A-3.2	Técnica del DNS	66
A-3.3	Obtención de la curva de calibración para azúcares reductores	67
A-4	Resultados obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño	67
A-5	Datos obtenidos de alcohol al finalizar la fermentación (72 h)	75
A-6	Curva de calibración DNS	75
A-7	Espectros obtenidos de la cuantificación de alcohol para la curva de Calibración (rango 0-20 %V) a longitud de onda de 850 nm	76
A-8	Espectros obtenidos de la cuantificación de alcohol durante la prueba confirmatoria mediante el método de infrarrojo cercano	76
A-9	Ajustes de los datos experimentales (Biomasa y Sustrato)	77

DEDICATORIA

A mis Padres:

Gaspar Martínez Macías, por tu fortaleza, esfuerzo, dedicación y entrega para que culmine con mi formación profesional a pesar de la distancia.

Guadalupe Corona García, por haberme dado la vida, por enseñarme el verdadero valor de las cosas, así como a luchar por mis objetivos, por darme el ejemplo de humildad, sencillez, por tu confianza incondicional para concluir esta etapa tan importante de mi vida.

A mi Abuela:

Dolores García Pantoja, por tener la fortaleza en cada momento en cual te necesité y estuviste presente, por quererme así como solo tú sabes, porque a pesar de la enfermedad siempre estabas allí presente.

A mi Tía:

Alma Rosa Corona García, por el tiempo tan preciado de tu vida que me diste para mi educación, por darme el ejemplo para seguir adelante sin importar los obstáculos de la vida, por ser como una hermana, amiga y confidente en quien confiar ciegamente.

A mis Hermanos:

Juan Carlos y Luis Enrique, porque siempre tuvieron confianza en mí, por tener la fortaleza y dedicación para salir adelante, por ser los mejores hermanos y los mejores amigos en quienes confiar.

A mi Amigo:

Jorge Tovar Rodríguez, por ser mi amigo, compañero y familia, por compartir cada uno de mis logros a lo largo de mi formación profesional.

GLOSARIO

Abocado: susceptibilidad de una bebida alcohólica a ser suavizada adquiriendo un sabor que no es ni dulce ni seco.

Azúcares Reductores: monosacáridos que se obtienen de la hidrólisis de polisacáridos complejos, los cuales son transformados en alcoholes por una levadura durante la fermentación alcohólica del agave para la producción de mezcal.

Biomasa: cantidad de materia viva. Es la cantidad de materia en los organismos por unidad de superficie o volumen expresado en unidad de peso. Masa de material viviente.

Fase lag: periodo después de la inoculación, antes de que empiece a crecer un cultivo.

Fermentación: es el proceso químico en el cual los azúcares contenidos en el mosto se convierten en alcohol.

Gemación: es el proceso de división asimétrica y asexual mediante el cual se multiplican las levaduras.

Inocular: Verter bacterias u hongos directamente en un medio con nutrientes para ser cultivados y estudiados.

Levadura: microorganismo unicelular importante por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono y producir distintas sustancias, entre ellas el alcohol.

Mezcal: nombre genérico que se le da en México a una bebida alcohólica obtenida mediante la fermentación de jugo de agave.

Modelo: es una formulación que imita un fenómeno del mundo real y por medio del cual podemos efectuar predicciones. Estos pueden ser verbales, gráficos y numéricos.

Mosto: jugo (zumo) obtenido del agave antes de su fermentación.

Variable: representa un elemento no especificado o a especificar, el cual influye directamente al proceso o es objeto de estudio.

Nutriente: aquello que es causa del aumento, actividad o vigor de algún organismo o grupo de ellos. Incluye generalmente fosfatos, nitratos, silicatos, cobre, manganeso, cobalto, hierro.

Sustrato: en bioquímica, un sustrato es una molécula sobre la cual actúa una levadura para producir un producto.

Sui generis: es la denominación que se aplica a un género o especie muy singular y excepcional.

RELACIÓN DE FIGURAS

	Página	
1	<i>Agave tequilana weber var. Azul</i> . Fuente: Unidad experimental de biología molecular. Guadalupe Zacatecas	16
2	Denominaciones de origen. Fuente: Sistema productivo maguey – mezcal, 2004.	18
3	Estructura básica de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1: Pared Celular; 2: Membrana Citoplásmica; 3: Vacuolas; 4: Tilacoide (sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación); 5: Gránulos de Almacenamiento; 6: Núcleo (Walker, 1998)	19
4	Principales características del metabolismo celular	21
5	Cinética típica del crecimiento de una levadura	23
6	Mecanismo de reacción del piruvato para la conversión a etanol	26
7	Cocción de las piñas en autoclaves	28
8	Desgarradora para piñas de agave	28
9	Tanques de fermentación para el jugo obtenido	29
10	Destrozador y rectificador utilizado en la destilación	31
11	Representación del diseño Box-Behnken para tres factores	34
12	Resiembra de levadura y obtención de colonias puras	39
13	Cepas de levadura en medio sólido PDA	40
14	Micrografía (40x) de células de la levadura de la región de Pinos y Villa Hidalgo. Zacatecas (Damián y Pérez, 2010)	40
15	Variables que intervienen en el proceso	43
16	Experimentos durante (A) y al finalizar la fermentación (B)	46
17	Comportamiento del crecimiento de biomasa	48
18	Comportamiento del consumo de azúcares totales	49
19	Comportamiento del consumo de azúcares reductores	49
20	Comportamiento del pH	50
21	Cantidad máxima de etanol en cada experimento	51
22	Superficie de respuesta y contorno para la producción de etanol en función del valor de pH y de la concentración de azúcar	52
23	Superficie de respuesta y contorno para la producción de etanol en función de la concentración de azúcar y del valor del porcentaje de inóculo	53
24	Superficie de respuesta y contorno para la producción de etanol en función del valor del pH y el porcentaje de inóculo	53
25	Cantidad de etanol obtenido en la prueba confirmatoria	54
26	Ajuste de datos experimentales para el experimento 6, mediante el modelo de Gompertz 3 para la biomasa	56

27	Ajuste de datos experimentales para el experimento 6, mediante el modelo de Monod para el sustrato	57
28	Curva de calibración (DNS)	75
A-7	Espectros obtenidos de la cuantificación de alcohol para la curva de calibración (rango 0-20 %V) a longitud de onda de 850 nm	76
A-8	Espectros obtenidos de la cuantificación de alcohol durante la prueba confirmatoria mediante el método de infrarrojo cercano	76
A-9	Ajustes de los datos experimentales (Biomasa y Sustrato)	77

RELACIÓN DE TABLAS

1	Principales elementos que requieren las levaduras para llevar a cabo su metabolismo	21
2	Matriz de diseño de Box-Behnken para tres factores	34
3	Morfología de las colonias de levadura crecidas	40
4	Diseño experimental Box Behnken	42
5	Diseño experimental codificado	42
6	Diseño experimental decodificado	42
7	Análisis de varianza para la producción de etanol	46
8	Combinación de los niveles que favorecen la producción de etanol	51
9	Resultados obtenidos de la prueba confirmatoria.	42
10	Sumatoria de residuales al cuadrado y comparación del valor de la distribución f para el ajuste de datos experimentales de la biomasa producida	55
11	Comparación de la sumatoria de residuales al cuadrado mediante el modelo de Monod para el consumo de sustrato	56
A-4	Resultados obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño	67
A-5	Datos obtenidos de alcohol al finalizar la fermentación (72 h)	75

NOMENCLATURA

SIMBOLO		UNIDADES
A	Constante empírica del modelo de crecimiento para el modelo de Gompertz de tres parámetros	h^{-1}
B	Constante de modelos de crecimiento.	h^{-1}
Dx	Variación de la concentración de biomasa	g biomasa
Dt	Variación del tiempo	h
K	Constante de modelos de crecimiento	h^{-1}
K_s	Constante de Monod	h^{-1}
T	Tiempo	h
X	Concentración de biomasa	g/L
x_0	Concentración de biomasa inicial	g/L
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimiento para carbono	g biomasa/g azúcar

SÍMBOLOS GRIEGOS

β_0	Parámetro correspondiente a un modelo lineal de la ecuación 2	-
β_1	Parámetro correspondiente asociado a una función no lineal de la ecuación 2	-
β_2	Parámetro correspondiente asociado a una función no lineal de la ecuación 3	-
β_{ij}	Parámetro correspondiente asociado a una función no lineal de la ecuación 3, representa los efectos cuadráticos o de segundo orden puros	-
μ	Constante específica de velocidad de crecimiento	h^{-1}
μ_{max}	Constante específica de velocidad de crecimiento máxima	h^{-1}

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Gaspar Martínez Macías

Guadalupe Corona García

Juan Carlos Martínez Corona

Luis Enrique Martínez Corona

Por su esfuerzo y apoyo incondicional para concluir esta etapa de mi vida

De manera muy especial le agradezco infinitamente a la Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, por el apoyo, disposición y entrega para concluir este trabajo de tesis.

Al M.C. Edgar León Esparza Ibarra por su disposición, conocimiento y apoyo brindado.

Al Dr. Manuel Arroyo Albiter por el conocimiento adquirido y su disposición para completar este escrito.

Al comité de revisión de tesis por sus acertadas observaciones y por contribuir en este escrito: Dr. Horacio González Rodríguez, Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, Dr. Jaime Espino Valencia, Ing. Leonardo Tenorio Cancino.

A mis maestros y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en la cual recibí esta excelente formación académica, además de facilitar sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo de tesis.

A la división de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química (UMSNH), por facilitar sus instalaciones y equipos necesarios en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

A la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas por facilitar sus instalaciones y por el apoyo brindado.

Al PROMEP 2007 Nuevo PTC 140 y a la Coordinación de la Investigación Científico 2008 y 2009, por el financiamiento y beca otorgada para el desarrollo del presente proyecto.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, que se elabora de manera similar al tequila. El proceso comienza con la cosecha del agave después de 6-8 años de cultivo, obteniéndose las piñas de agave, las cuales son cocidas en hornos o autoclaves. En esta etapa, los polisacáridos son hidrolizados térmicamente para obtener un jarabe rico en glucosa o fructosa que, posteriormente se somete a fermentación alcohólica con levaduras nativas o cepas seleccionadas, finalmente el mosto con un contenido entre 4 y 6.5 % de etanol aproximadamente se destila para obtener el mezcal (Cedeño, 1995). El mezcal se produce a partir de una amplia variedad de agaves (NOM-070-SCFI-1994), incluyendo el agave tequilana, que por su sobreproducción e inclusión entre estados se utiliza ampliamente. En décadas pasadas el proceso de obtención del mezcal era de manera artesanal, en cambio en la actualidad, ya tiene un proceso tecnificado, también es importante aclarar que las zonas geográficas que cuentan con Denominación de Origen para el mezcal están dispersas en el territorio mexicano por lo que agrega un factor de variabilidad en la elaboración del mezcal en cada región.

La obtención del mezcal depende de los efectos de las variables que influyen en la producción de etanol en la fermentación alcohólica: acides del sustrato, concentración de azúcares, contacto con el aire, la temperatura y ritmo de crecimiento de las levaduras, por lo que se han realizado investigaciones de cómo influyen algunos de ellos (Arrizon, 2001; CIATEJ, 2004; Ortega, 2008; Pérez y Damián, 2010). En los primeros tres trabajos se planteó el estudio del efecto de la cantidad de azúcar inicial con diferentes cepas de levaduras y adición de nitrógeno en la fase exponencial, mientras que en el último se evaluó la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de levaduras en la producción de alcohol. Por lo anterior discutido, se considera que la utilización de un método experimental, en conjunto con una serie de pruebas analíticas puede ayudar a encontrar cuáles son las variables más significativas y la mejor combinación de estas para obtener una cantidad máxima de alcohol y mejorar los tiempos de fermentación.

1.1 Planteamiento del problema

Las zonas geográficas con Denominación de Origen mezcal, se encuentran dispersas en el territorio mexicano, por lo que esta dispersión agrega un factor de variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región. Las industrias mezcateras, por lo general no fermentan por arriba de los 15° Brix, ya que tiene un efecto negativo en la producción de alcohol y alargamiento de los tiempos de fermentación, debido a que este exceso de azúcares frena la actividad metabólica de las levaduras. Por tal razón esta investigación pretende dar a conocer el efecto que tiene el pH, la concentración de azúcares iniciales y la cantidad de inóculo en la producción de etanol, así como la mejor combinación de dichas variables para mejorar los tiempos de fermentación y obtener la mayor cantidad de mezcal posible a estas condiciones de operación.

1.2 Justificación

En la actualidad se ha estado investigando la producción de mezcal en México, especialmente en las zonas geográficas que cuentan con denominación de origen proporcionándonos algunas referencias limitadas sobre el efecto de las variables pH, concentración azúcares iniciales y cantidad de inóculo, empleando levadura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes niveles (bajo, medio y alto) en la producción de mezcal. Por lo que se plantea utilizar un diseño experimental con el fin de conocer cuál es el efecto de estas variables sobre el producto final y encontrar la mejor combinación de ellas.

1.3 Hipótesis de la investigación

En la producción de mezcal (etanol) empleando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo sumergido con jugo de *Agave Tequilana weber var. Azul*, utilizar un diseño experimental permitirá conocer el efecto de las variables como son: pH, concentración de azúcares iniciales y la cantidad de inóculo, poder determinar cuáles son las variables más significativas durante el proceso de fermentación, obtener la mejor combinación de éstas y disminuir los tiempos de fermentación.

1.4 Objetivo general

Conocer cuáles de las variables: pH, concentración de azúcares iniciales y cantidad de inóculo, tiene el efecto más significativo en la obtención de etanol, determinar la mejor combinación de estos factores para mejorar la producción de mezcal y disminuir los tiempos de fermentación.

1.5 Objetivos particulares

- Aislar y conservar en un medio PDA (agar, papa, dextrosa), las levaduras nativas obtenidas de los mostos fermentados de la región de Pinos y Villa Hidalgo, Zacatecas, para posteriormente obtener colonias puras y utilizarlas para llevar a cabo las fermentaciones.
- Interpretar estadísticamente mediante pruebas de hipótesis para la media y el análisis ANOVA el diseño experimental Box-Behnken y determinar cuáles son los factores más significativos en la producción de etanol.
- Cuantificar la cantidad de biomasa (crecimiento microbiano), sustrato (azúcares reductores) y formación de producto (etanol), para obtener los comportamientos correspondientes.
- Obtener el comportamiento del crecimiento de las levaduras, del consumo de sustrato y del pH para cada uno de los experimentos del diseño Box-Behnken.
- Determinar la ecuación que describe la producción de etanol en función del pH, la cantidad de azúcares iniciales y cantidad de inóculo, así como su solución para conocer los niveles de cada variable y cantidad de etanol predicho por el diseño experimental.
- Ajustar los datos obtenidos de biomasa producida y cantidad de sustrato consumido mediante el modelo de Gompertz de tres parámetros y el modelo de Monod (modelos no estructurados) para conocer las constante de velocidad específica de crecimiento de levaduras y el rendimiento de azúcares consumidos.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. El agave

El maguey, como se conoce en México a las plantas del género *Agave*, ha tenido gran importancia histórica en el desarrollo y evolución de la cultura Mexicana ancestral y de la sociedad actual. Sus usos han tenido variaciones a través del tiempo, sin embargo sus propiedades y atributos han sido mitificados, ha trascendido de tal modo que en la actualidad, los agaves constituyen el primer eslabón de la cadena productiva Agave-Tequila y Agave-Mezcal, consideradas como dos de las actividades económicas generadoras de empleo y de las más rentables por los ingresos que genera al país, dentro del rubro de las agroindustrias (Gallardo y col, 2008).

El agave es un planta de la familia de las Amarilidaceas, de hojas largas y fibrosas de forma lanceolada, de color verde azulada cuya parte aprovechable para la elaboración de mezcal es la piña o cabeza (tallo y base de sus hojas), existen varios tipos de los cuales se obtiene esta bebida, uno de los más importantes es el *Agave Tequilana Weber var. Azul*, figura 1, por su alta concentración de azúcares contenido en las piñas, por localizarse en 181 municipios de los cinco estados que conforman la denominación de origen y por su fácil cultivo (Valenzuela, 2007; Durán y Pulido, 2007).



Figura 1. *Agave Tequilana weber var. Azul*. Fuente. Unidad experimental de biología molecular. Guadalupe Zacatecas.

2.1.2 Norma Oficial Mexicana 070-SCFI-1994 para el Mezcal

Esta Norma Oficial Mexicana (NOM) se refiere a la denominación de origen “mezcal”, cuya titularidad corresponde al Estado Mexicano bajo los términos contenidos en la Ley de la propiedad industrial. Esta norma define al mezcal de la siguiente manera:

2.1.3 El mezcal

Es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras (cultivadas o no), siendo además susceptible de ser enriquecido con hasta un 20% de otros carbohidratos en la preparación de dichos mostos. El mezcal es un líquido de olor y sabor *sui generis* de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo (NOM-070-SCFI-1994). Esta misma norma reconoce dos tipos de mezcal de acuerdo al porcentaje de los carbohidratos provenientes del agave que se utilicen en su elaboración:

Tipo I. Mezcal 100% agave

Es aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de los mostos preparados con los azúcares de las cabezas maduras de agaves, previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.

Tipo II. Mezcal

Es aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes de la NOM-070-SCFI-1994. Este tipo de mezcal es joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado (sistema producto maguey-mezcal, 2004).

2.1.4 Denominación de Origen en México

En 1997 se firmó el acuerdo de reconocimiento mutuo para la protección de las denominaciones de origen en el sector de bebidas espirituosas entre México y la Unión Europea, a través del cual, México reconoció 193 distintas denominaciones de origen de bebidas destiladas; le otorgaron las denominaciones relativas a tequila y mezcal. Respecto a Estados Unidos y Canadá, mediante el tratado de libre comercio, se encuentran protegidas las denominaciones "tequila" y "mezcal", como productos únicos y distintivos de México. En nuestro país, el instituto mexicano de la propiedad industrial (IMPI) es el organismo que, entre sus facultades, puede emitir declaratorias de protección a denominaciones de origen y autorizar el uso de las mismas, haciendo notar que el estado mexicano es el titular de dichas denominaciones.

Dada la diversidad de orígenes en el mezcal, la iniciativa de gobiernos estatales y productores llevó a que en 1994 la SECOFI emitiera la resolución mediante la cual se da la denominación de origen del mezcal a los estados: Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Durango, Zacatecas, once municipios de Tamaulipas y un municipio de Guanajuato (Valenzuela-Zapata, 2007), figura 2.



Figura 2. Denominación de origen. Fuente. Sistema productivo maguey–mezcal, 2004.

2.2. Levaduras

El grupo de microorganismos conocidos como levaduras se clasifican dentro del reino *Fungi* (hongos), en el cual predomina la forma unicelular. Este grupo no constituye una entidad taxonómica, aunque comprende subdivisiones de especies ampliamente relacionadas. Más de 700 especies de levaduras clasificadas en 100 géneros se describen en la última edición de *The Yeasts: a taxonomic study* (Kurtzman y Fell, 1998).

De manera muy general, los dos principales tipos de levadura de interés comercial son *Candida* y *Saccharomyces* (especialmente *Saccharomyces cerevisiae* y especies cercanas relacionadas con la panadería y la producción de etanol), y tienen la especial virtud de que poseen una eficiente capacidad catabólica, aeróbica y anaeróbica.

En el caso específico del tequila y mezcal sobre una caracterización exhaustiva de las levaduras presentes en el proceso de elaboración de estas bebidas, se identificaron 10 géneros responsables de la fermentación dejando entrever la complejidad del proceso, ya que cada levadura tiene necesidades diferentes y sobretodo es susceptible de producir compuestos diferentes e importantes en el aroma final de la bebida, en la figura 3 se muestra la estructura básica de una levadura.

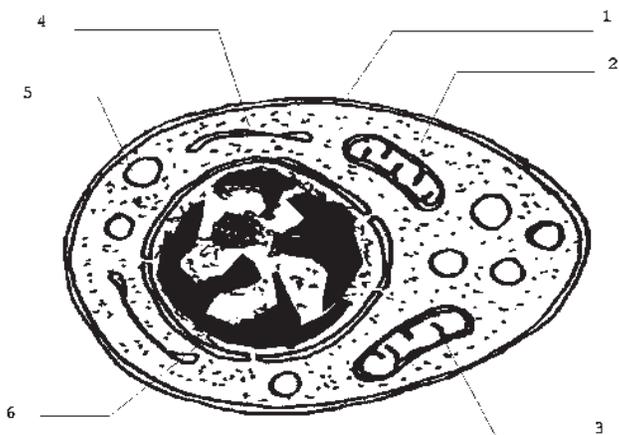


Figura 3. Estructura básica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 1: Pared Celular; 2: Membrana Citoplásmica; 3: Vacuolas; 4: Tilacoide (sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación); 5: Gránulos de Almacenamiento; 6: Núcleo (Walker, 1998).

2.2.1 Taxonomía

La clasificación clásica es la taxonómica, la cual toma en cuenta los siguientes criterios:

- a) **Morfológicos:** reproducción vegetativa (gemación o bipartición), reproducción sexual (zigoto, esporas), morfología celular en medios sólido y líquido, aspecto de la colonia, la formación de velo, etcétera.
- b) **Fisiológicos:** fermentación y asimilación de azúcares, desarrollo en presencia de etanol, poder fermentativo, asimilación de ácidos orgánicos, asimilación de nitratos, crecimiento a diferentes temperaturas, etcétera.

Las levaduras dependen de la presencia de una forma orgánica de fuente de carbono, por ejemplo: azúcares simples, ácidos orgánicos y grasos, alcoholes alifáticos etcétera. En la elaboración de bebidas alcohólicas las levaduras provienen de dos hábitats diferentes: las materias primas (principalmente vegetales) y las fabricadas donde éstas se procesan.

2.2.2. Metabolismo y funciones básicas de las levaduras

Las levaduras están rodeadas por una membrana plasmática y una pared celular particularmente resistente, estas estructuras permiten que las levaduras organicen las moléculas y reacciones químicas en estructuras específicas y secuencias sistemáticas. El término metabolismo se utiliza para aludir a todos los procesos químicos que tienen lugar en una célula los cuales se esquematizan en la figura 4.

Para el funcionamiento del metabolismo celular las levaduras tienen una serie de necesidades nutricionales que se enlistan en la tabla 1. El poder entender estas necesidades, así como los fenómenos de transporte y asimilación de estos elementos no es únicamente para cultivar las levaduras a nivel laboratorio, sino también, para optimizar los procesos fermentativos a nivel industrial.

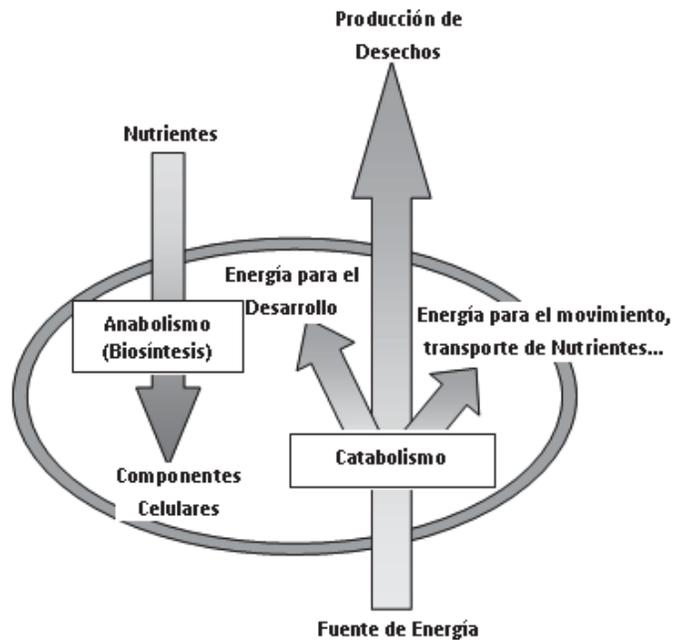


Figura 4. Principales características del metabolismo celular.

Tabla 1. Principales elementos que requieren las levaduras para llevar a cabo su metabolismo.

Elemento	Fuente común	Función celular
Carbono	Azúcares	Elemento principal de la estructura celular en combinación con H, O y N. Fuente de Energía
Hidrógeno	Protones de medios ácidos	Mantiene el pH interno de la célula (entre 3 y 5). Intervención en los fenómenos de transporte a través de la membrana.
Nitrógeno	Urea, amonio, ácidos, NH_4^+	Funciones estructurales y funcionales como grupo amino en las proteínas y las enzimas

2.2.3. Crecimiento y división celular

La forma más común de reproducción de las levaduras es la asexual o por gemación; sin embargo, también se puede observar fisión, seguida de formación de pared celular y crecimiento del micelio por elongación de la cadena, cuando las condiciones son favorables, en el caso de las fermentaciones para la obtención de bebidas alcohólicas las levaduras se reproducen asexualmente y con facilidad se puede observar al microscopio la formación de gemas.

Cuando se trabaja con levaduras es muy importante conocer las fases del crecimiento, figura 5. Si se inocula un número determinado de células vivas en un cultivo en lote con un medio de cultivo apropiado, su crecimiento puede dividirse en cuatro partes muy bien definidas.

1. **Fase lag o de retraso:** es la primera etapa del cultivo, hay poco o ningún cambio de número de células debido a que no se reproducen inmediatamente en un medio nuevo y puede durar desde una hora hasta varios días. Este tipo de retraso también ocurre cuando el inóculo lo forman células viejas o dañadas (pero no muertas) por tratamientos con calor, radiación o sustancias químicas.
2. **Fase exponencial o logarítmica de crecimiento:** en esta etapa comienzan a dividirse y entran en un periodo de incremento logarítmico, la producción celular alcanza una actividad máxima durante este periodo. Durante la fase logarítmica las células comienzan a mostrar sus características visibles: morfología, color, densidad y color de sus colonias. Esta fase también es el momento en que las células son metabólicamente más activas.
3. **Fase estacionaria:** ocurre cuando la velocidad de crecimiento disminuye y el número de células muertas compensa el de las nuevas y la población se estabiliza. Las actividades metabólicas de las células supervivientes también se hacen más lentas en esta fase. Las razones para el cese del crecimiento exponencial no siempre son claras. Se acumulan productos de degradación tóxicos para las células y/o se agotan ciertos nutrientes esenciales. También ocurren cambios en el pH y la temperatura.
4. **Fase de muerte:** en general, el número de muertes supera pronto al de nuevas células formadas y la población entra en fase de muerte o fase de declive logarítmico. Esto continúa hasta que la población ha disminuido a una pequeña fracción de células más resistentes, o hasta que la población muere por completo.

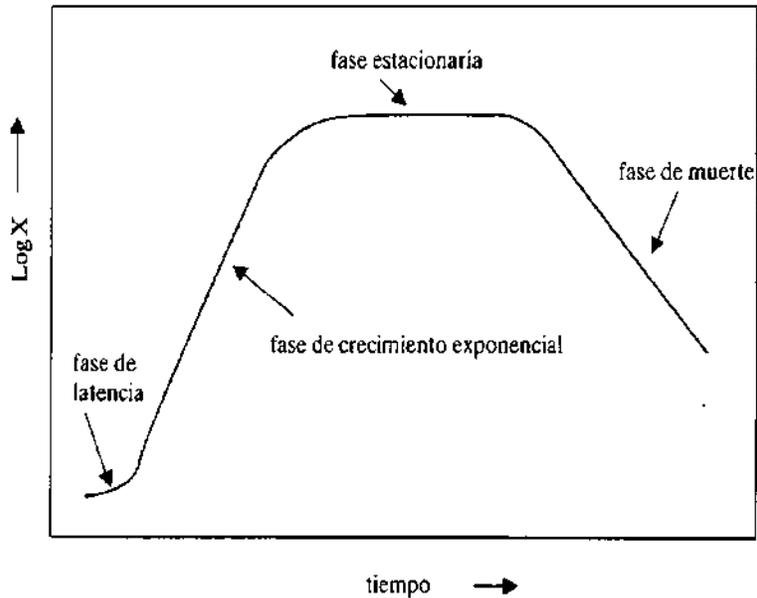


Figura 5. Cinética típica del crecimiento de una levadura.

Cuando las levaduras crecen en un cultivo en lote que tiene altos niveles de azúcar lo convierten en etanol. Los altos niveles de azúcar rápidamente metabolizables reprimen la habilidad de la célula para realizar la respiración, aunque no haya deficiencia de oxígeno. Este fenómeno se conoce como represión catabólica o efecto Crabtree y es muy importante para comprender el metabolismo celular (Barnett, 1981; Lee, 2001).

2.3. La fermentación alcohólica

La fermentación consiste en la transformación de los azúcares en alcohol etílico (etanol), y también en otros compuestos en cantidades menores pero que pueden jugar un papel importante en las características del producto final.

La fermentación consta de tres etapas principales:

- a) El transporte de los azúcares al interior de la célula
- b) La transformación de los azúcares en piruvato por medio de la glucólisis
- c) Conversión de piruvato a etanol

2.3.1 Transporte de los azúcares

El transporte de los azúcares es una etapa clave en la fermentación alcohólica. Como la concentración interna de los azúcares siempre se mantiene baja comparándola con la concentración externa, se concluye que el transporte es el elemento limitante del metabolismo de los azúcares (Salmon y col., 1993). Esta limitación del metabolismo fermentativo en el proceso industrial puede desembocar en una interrupción espontánea de la fermentación, incluso con azúcares fermentables todavía presentes en el mosto.

2.3.2 Transformación de azúcares en piruvato

La glucosa cataliza la acción consecutiva de diez enzimas que permiten obtener piruvato a partir de glucosa o fructuosa. Todos los intermediarios del proceso son compuestos fosforilados que desempeñan tres funciones fundamentales:

1. Proveen a la molécula un grupo polar cargado negativamente que le impide pasar a través de la membrana celular, la cual está capacitada para impedir el paso de moléculas muy polares, por lo tanto no pueden difundirse a través de la membrana.
2. Los enlaces fosfato actúan como grupos enlazantes o de reconocimiento en los compuestos enzima-sustrato.
3. La función más importante es la conservación de la energía, ya que al final se transforman en grupos fosfato terminal de ATP en el transcurso de la glucólisis.

A lo largo de la glucólisis se requieren diversos compuestos para que ocurran las reacciones: compuestos fosforilados (ATP principalmente), cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}), iones metálicos divalentes (Zn^{2+} , Ca^{2+} o Fe^{2+}), nucleótidos en forma oxidada y reducida (NAD^+ Y $NADH$) y cationes de metal alcalinos (K^+ , Rb^+ o Cs^+) (Lehninger, 1990).

Ecuación de la glucólisis:



2.3.3 Conversión de piruvato a etanol

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a las levaduras en ausencia de oxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa o fructosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO_2 como desechos consecuencia de la fermentación. En sí la fermentación alcohólica consiste en la transformación del piruvato a etanol, figura 6, reacción que tiene un solo intermediario: el acetaldehído. Estas reacciones necesitan NADH y Mg^{2+} y generan CO_2 .

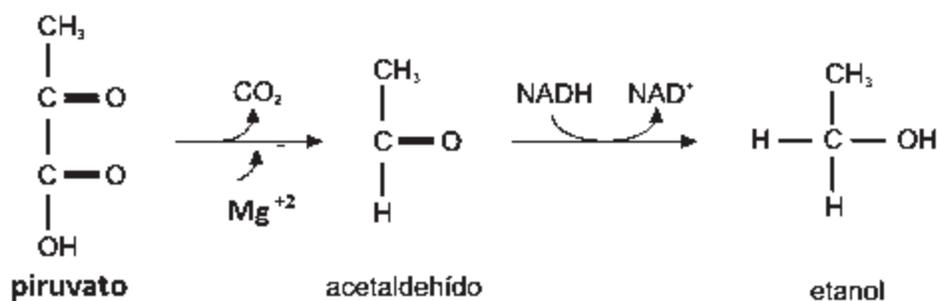


Figura 6. Mecanismo de reacción del piruvato para la conversión a etanol.

2.4 Compuestos volátiles generados durante la fermentación

En las bebidas alcohólicas la mayoría de los compuestos responsables del olor y sabor son volátiles, y las principales etapas responsables de su producción son las siguientes: procesamiento de la materia prima (cocimiento y molienda en el caso del mezcal), fermentación, destilación y maduración. Sin embargo algunos aromas pueden provenir directamente de la materia prima. Las grandes familias de compuestos presentes en las bebidas alcohólicas son los alcoholes superiores, carbonilos (aldehídos y ésteres), ácidos orgánicos y grasos y compuestos con azufre.

2.5 Inóculo

El adecuado crecimiento de la levadura previo a la etapa de fermentación es un paso crítico en el proceso de la elaboración del mezcal. El desarrollo de un inóculo mejora significativamente los rendimientos, la productividad y el tiempo de fermentación. Esta etapa se lleva a cabo, cultivando la levadura de interés en jugo de agave suplementado con nutrientes adicionales y condiciones aerobias para favorecer el crecimiento.

Una vez que el cultivo logra alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, este se adiciona al mosto a fermentar, por lo general en un porcentaje del 10% v/v.

2.6. Tipos de cultivos utilizados en la industria

La fermentación es un paso muy importante, ya que la producción de etanol se detecta desde el inicio de esta y el contenido final de alcohol depende de la concentración de azúcares iniciales, por lo que en la industria del tequila y mezcal se emplean diferentes tipos de cultivos.

Cultivo por lote: en este cultivo se prepara un medio con al menos una fuente de carbono y de nitrógeno más el microorganismo que se piensa manipular y no se adiciona ningún nutriente posteriormente, el volumen permanece constante. Durante el cultivo se consumen los azúcares y producen los metabolitos esperados. Cuando los azúcares han sido consumidos el cultivo finaliza.

La duración de este proceso es corto comparado con los otros cultivos. Un ejemplo muy claro lo ofrece cualquier tina de fermentación que se prepara actualmente en la industria mezcalera.

Cultivo continuo: se caracteriza por que busca producir un metabolito de forma constante por un periodo largo. Esto se logra adicionando un volumen constante de sustrato al medio de cultivo y retirando el mismo volumen del fermentador, así se logra tener la producción de metabolitos en estado estacionario o constante. La ventaja de este cultivo consiste en la posibilidad de realizar fermentaciones largas y obtener los metabolitos de interés de forma continua para ser procesados.

Cultivo por lote alimentado: este tipo de cultivo consiste en agregar sustrato a la fermentación para alargar la fase exponencial y así obtener una mayor cantidad de metabolitos. La alimentación generalmente se realiza con el objetivo de mantener una velocidad específica de crecimiento lineal o exponencial.

Las variables principales que afectan la actividad del microorganismo en cada uno de estos cultivos son principalmente: la temperatura, pH, concentración de sustrato, concentración de producto, oxígeno, micro nutrientes y macro nutrientes y la presencia de sustancias tóxicas entre otras, por tal motivo debe de seleccionarse el tipo de cultivo en base al microorganismo a estudiar (López, 1992).

2.7 Producción de etanol

Algunos géneros de levaduras tienen la capacidad de transformar el azúcar del agave en etanol, bióxido de carbono y en toda una gama de subproductos con características organolépticas muy importantes. El objetivo primario de la mayoría de los procesos fermentativos es lograr una alta conversión de azúcares en etanol y bióxido de carbono sin el desarrollo de sustancias indeseables.

En teoría las fermentaciones se inician con una concentración de azúcares que varía de 10 a 18 °Brix, pero sin embargo, en lo general pocas empresas fermentan por encima de los 15 °Brix. Sin duda las limitantes para la industria es la dificultad de las levaduras de fermentar a altas concentraciones de azúcar; un incremento excesivo de los grados Brix tiene un efecto negativo en la producción de alcohol, ya que provoca una represión catabólica en las levaduras, alargamiento en los tiempos de fermentación y una disminución de los rendimientos.

2.8. Proceso de elaboración

2.8.1. La cocción

El cocimiento es una etapa particularmente importante, ya que además de la generación de azúcares fermentables por la hidrólisis de la inulina presente en el agave, se llevan a cabo unas reacciones químicas como las de Maillard que generan muchos de los compuestos responsables de las características organolépticas del mezcal. Adicionalmente el cocimiento suaviza la consistencia del agave, lo cual facilita su molienda (Pinal, 2001), figura 7.



Figura 7. Cocción de las piñas en autoclaves.

La tendencia actual de las empresas con grandes volúmenes de producción de mezcal es realizar el cocimiento con vapor de agua en autoclaves verticales u horizontales de una a dos puertas debido a las ventajas que estas ofrecen:

- Reducción del tiempo de cocimiento y del consumo de vapor;
- Control de la temperatura y la presión que permite un cocimiento más homogéneo y estandarizado;
- Mayor facilidad de carga y descarga.

2.8.2 La molienda

En la molienda se extrae el jugo de los agaves cocidos conteniendo los azúcares que serán transformados a etanol durante la fermentación, por lo que esta etapa es fundamental en el rendimiento del proceso. La extracción del jugo contenido en las piñas del agave se realiza exprimiéndolas. La molienda se realiza con diferentes grados de tecnificación, desde el molino de piedra hasta equipos automatizados, sistemas que repercuten en el rendimiento de extracción del jugo y sus propiedades organolépticas, figura 8.



Figura 8. Desgarradora para piñas de agave.

La molienda del agave cocido se lleva a cabo con molinos mecanizados adaptados de la industria de la caña de azúcar. La desintegración del agave en fibras expuestas se realiza en una “desgarradora”, que es un molino de martillos o cuchillas de acero que giran y proyectan las fibras a un transportador de banda que alimenta los molinos que realizan la extracción de jugo (Castro, 2003).

2.8.3. La fermentación

La fermentación es sin duda una etapa clave en el complejo proceso de elaboración de bebidas alcohólicas. Su característica principal y común a todas las bebidas es la intervención de seres vivos, principalmente levaduras (también bacterias), que transforman los azúcares del mosto en una serie de compuestos, dentro de los cuales está presente el etanol.



Figura 9. Tanques de fermentación para el jugo obtenido.

2.8.4. Destilación

Infinidad de procesos industriales implican la necesidad de realizar la separación de los componentes de una mezcla líquida. La separación de una mezcla líquida homogénea en sus componentes individuales es un paso importante en muchos procesos de elaboración de bebidas alcohólicas. Uno de los métodos posibles para separar los componentes de una mezcla es la destilación, y es de los utilizados comercialmente el más importante (Felder, 2003). La destilación utiliza un principio sencillo: se crea un íntimo contacto entre la mezcla inicial (líquida) y una segunda fase (vapor) para realizar una efectiva transferencia de masa entre ambas. Las dos fases se separan después durante el proceso, por lo que se logra una composición diferente en cada una. Este principio ha permanecido invariable de durante el paso del tiempo.

Al realizar la destilación siempre se involucran los siguientes principios:

- a) Creación de un sistema de dos fases
- b) Transferencia de masa entre fases
- c) Separación de las fases

La realización de estos pasos requiere una energía que usualmente se suministra en forma de calor y después se remueve en el condensador. Cuando el objetivo es separar los componentes menos volátiles de la mezcla líquida se utiliza una destilación denominada *destrozamiento* o *agotamiento*, y cuando el objetivo es separar y obtener los compuestos más volátiles de la mezcla líquida, se emplea el proceso de *rectificación* o *enriquecimiento*.

La separación de una mezcla compleja empleando la destilación puede llevarse a cabo por medio de dos métodos (Geankoplis, 1995).

El primero consiste en vaporizar por ebullición la mezcla que se va a separar en una sola etapa y después recuperar y condensar los vapores. En este método no se permite que el líquido o destilado regrese al destilador de una sola etapa ni que se ponga en contacto con los vapores que se están generando (ejemplo: Tipo flash, con arrastre de vapor, y la denominada diferencial).

El segundo método implica el retorno de una porción del condensado al destilador. Los vapores se desprenden del fondo de éste y recorren una serie de etapas o platos y parte del condensado fluye hacia abajo a través de la misma serie de etapas o platos, a contracorriente con respecto de los vapores.

2.8.1 Técnicas de destilación en la fabricación del tequila y mezcal

En cerca del 90% de las empresas mezcaleras se emplea la destilación denominada *diferencial* y se realiza en dos etapas como ya se ha señalado. El objetivo de la primera etapa, también llamada *destrozamiento*, es obtener un destilado denominado *ordinario*, con un grado alcohólico que oscila del 20 al 30% de etanol en volumen, lo que depende de la empresa. En algunas empresas, durante esta etapa la primera fracción destilada, llamada *cabezas*, se separa y recicla hacia el mosto fermentado.

La fracción de cabezas usualmente es de 13-16 litros en un alambique destrozador de 3000 litros de capacidad. Algunas empresas acostumbran a destilar en esta etapa hasta el punto en el cual el mosto fermentado se agota en etanol, es decir, prácticamente hasta que el destilado presenta alrededor de 2-4% de etanol en volumen, figura 10.



Figura 10. Destrozador y rectificador utilizado en la destilación.

La finalidad de la segunda etapa o rectificación es aumentar la concentración alcohólica del ordinario y obtener un destilado (corazón) con un grado alcohólico que oscila del 38 hasta el 65% de etanol en volumen, y con la mayor parte de compuestos de interés. En esta etapa se separa una fracción inicial del destilado o *cabezas*. Esta fracción posee un alto grado alcohólico, del orden del 70% de etanol en volumen. La corriente que continúa destilando corresponde a la fracción de corazón o producto y se considera que es la parte más rica de interés. El corte de esta fracción se realiza cuando el destilado acumulado posee el grado alcohólico predeterminado, según el producto que la empresa desee obtener (Prado, 2002).

2.9. Matraz agitado

Históricamente la principal herramienta para la fermentación en el laboratorio fue el matraz agitado, la ciencia ha hecho grandes avances desde entonces, pero el matraz agitado todavía juega un papel importante en modernas fermentaciones en laboratorios.

Existe gran variedad de usos para los matraces agitados en las fermentaciones en laboratorio, incluyendo pruebas multivariadas y de crecimiento del inóculo. Normalmente, en la preparación del inóculo para un fermentador implica por lo menos una etapa en la cultivación del organismo en matraz agitado.

El matraz agitado tiene un número de desventajas significativas relativas a la cultivación en un fermentador, incluyendo bajas velocidades de transferencia de oxígeno, menos condiciones ambientales controladas y la dificultad de retirar muestras asepticamente.

2.9.1. Volumen del matraz agitado

El volumen depende del medio y del tipo de cultivo, ya que al utilizar volúmenes bajos en el matraz agitado, será mejor la velocidad de transferencia del oxígeno. Los volúmenes muy bajos pueden utilizarse solamente para las fermentaciones a corto plazo, si no el medio se evaporará y los nutrientes también serán concentrados en el cultivo. Cuanto más pequeño es el volumen, la película será más fina en el frasco y mayor el área en el k_{La} (coeficiente volumétrico de transferencia de masa); McNeil y Harvey, (1990).

Para la producción de etanol a partir de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en matraz agitado se consideran factores importantes como son: temperatura, tiempo de agitación y velocidad de agitación del medio, teniendo dichos factores gran influencia sobre las cinéticas de crecimiento y obtención de alcohol.

2.10 Diseño experimental de modelos de superficie de respuesta

La metodología de superficies de respuesta, o MSR, es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta.

En la mayoría de los problemas MSR, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso de la MSR es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre y y el conjunto de variables independientes.

Por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden (ecuación 2).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2)$$

Donde: y es la respuesta, las β 's son parámetros cuyos valores deben determinarse, x_1 es una variable que representa el factor A, x_2 es una variable que representa el factor B y ε es un término del error aleatorio. Las variables x_1 y x_2 se definen en una escala codificada de -1 a +1 (los niveles bajo y alto de A y B).

Si hay curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, tal como el modelo de segundo orden (ecuación 2.10.2).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Donde: y es la respuesta, las β 's son parámetros cuyos valores deben determinarse, x_1 es una variable que representa el factor A, x_2 es una variable que representa el factor B y ε es un término del error aleatorio. Las variables x_1 y x_2 se definen en una escala codificada de -1 a +1 (los niveles bajo y alto de A y B) y β_{ij} representan los efectos cuadráticos o de segundo orden puros.

En casi todos los problemas MSR se usa uno de estos modelos, o ambos. Desde luego, es probable que un modelo polinomial sea una aproximación razonable de la verdadera relación funcional en el espacio completo de las variables independientes, pero para una región relativamente pequeña suelen funcionar bastante bien (Montgomery, 2004).

2.11 Diseño Box Behnken.

Este diseño se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto a número de corridas. Es un diseño rotatable o casi rotatable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental. Su representación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Matriz de diseño de Box-Behnken para tres factores.

Tratamiento	x_1	x_2	x_3	Tratamiento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0	9	-1	0	-1
2	1	-1	0	10	1	0	-1
3	-1	1	0	11	-1	0	1
4	1	1	0	12	1	0	1
5	0	-1	-1	13	0	0	0
6	0	1	-1	14	0	0	0
7	0	-1	1	15	0	0	0
8	0	1	1				

Su representación geométrica se representa en la figura 11.

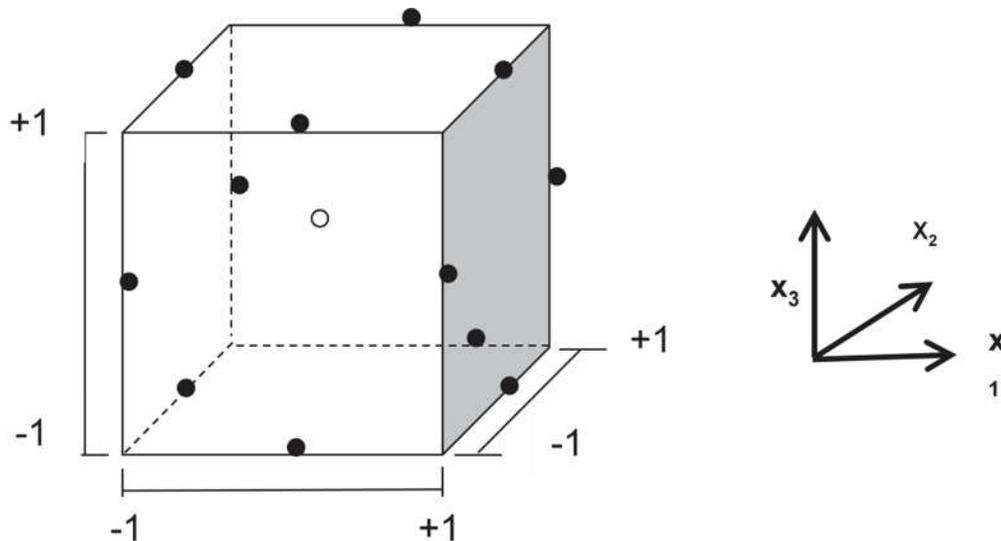


Figura 11. Representación del diseño de Box-Behnken para tres factores.

Nótese que los puntos de este diseño se ubican en medio de las aristas del cubo centrado en el origen y, como se había señalado, no incluye los tratamientos de los vértices, como el (1,1,1) y el (-1,-1,-1) que en algunas situaciones experimentales resultan extremos y no se pueden correr.

2.12. Ajuste de Datos

2.12.1. Modelos no estructurados para la descripción del comportamiento del crecimiento y consumo de sustrato

Debido a la complejidad metabólica, todos los modelos deben ser una burda simplificación de la realidad. La dificultad principal para el modelado es la identificación de los factores más importantes que influyen en el proceso de crecimiento y encontrar una estructura del modelo apropiado para los procesos intracelulares. De acuerdo a esto, los modelos biológicos o modelos de crecimiento se dividen en estructurados y no estructurados.

Los modelos estructurados consideran los componentes de la biomasa tales como la concentración de metabolitos, enzimas, DNA, RNA o variables relacionadas a la población que describen diferentes morfologías de la célula, su envejecimiento, ambiente exterior entre otros factores, mientras que los modelos no estructurados son los más simples. Los modelos no estructurados toman la biomasa como una cantidad uniforme sin dinámica interna cuya velocidad de reacción depende de las condiciones en la fase líquida del biorreactor o del matraz agitado. Por lo tanto, los modelos solamente contienen cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y formación de productos.

Esto es una buena aproximación si el tiempo de respuesta de la levadura a cambios ambientales es muy pequeño o muy grande comparado con la duración del proceso fermentativo. Es de esperarse que el potencial descriptivo de los modelos biológicos no estructurados sea limitado.

Los modelos no estructurados más empleados para describir las cinéticas de crecimiento de las levaduras son el modelo de Gompertz de dos parámetros (ecuación 4), modelo logístico de dos parámetros (ecuación 5), y el modelo de Gompertz de tres parámetros (ecuación 6) (Gelmi y Col, 2002; Shukla y Col, 2005; Tavares y Col, 2005), mientras que para el consumo de sustrato, el modelo más utilizado por su forma simple es el modelo de Monod (ecuación 7), Bailey y Ollis, (1986).

2.12.2. Modelo de Gompertz de dos parámetros

Este modelo considera un crecimiento autolimitado donde la velocidad decrece exponencialmente con el tiempo.

$$\frac{dx}{dt} = kx \exp^{-\mu t} \quad (4)$$

Donde: x es la concentración de biomasa (g/L), k es un parámetro cinético relacionado con la velocidad de crecimiento específica inicial (h^{-1}), μ es la velocidad de crecimiento específica inicial (h^{-1}) y t es el tiempo (h).

2.12.3. Modelo Logístico de dos parámetros.

Este modelo describe el crecimiento exponencial con un factor de inhibición proporcional a la concentración de biomasa al cuadrado (x^2).

$$\frac{dx}{dt} = kx - ax^2 \quad (5)$$

Donde: x es la concentración de biomasa (g/L), k es un parámetro cinético relacionado con la biomasa (h^{-1}), a es un parámetro cinético relacionado con la inhibición de crecimiento y t es el tiempo (h).

2.12.4 Modelo de Gompertz de tres parámetros

Este modelo considera un crecimiento autolimitado donde la velocidad decrece exponencialmente con el tiempo, en este caso se cuenta con un término extra que toma en cuenta la inhibición de crecimiento proporcional a la concentración de la biomasa.

$$\frac{dx}{dt} = kx \exp^{-\mu t} - ax \quad (6)$$

Donde: x es la concentración de biomasa (g/L), k es un parámetro cinético relacionado con la velocidad de crecimiento específica inicial (h^{-1}), a es un parámetro cinético relacionado con la inhibición de crecimiento, μ es la velocidad de crecimiento específica (h^{-1}) y t es el tiempo (h).

2.12.5. Modelo de Monod

El modelo de Monod describe el efecto del nutriente limitante en la velocidad específica de crecimiento, por lo que la biomasa producida depende de la disponibilidad del nutriente presente en el medio.

En 1942, Monod propone la siguiente ecuación que describe el efecto del nutriente limitante en la velocidad específica de crecimiento.

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (7)$$

Donde: μ_{\max} es la velocidad específica de crecimiento máxima alcanzada cuando el nutriente que limita el crecimiento no está limitado, K_s es la constante de Monod (concentración del nutriente limitante en la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima velocidad que puede ser alcanzada).

2.12.6. Consumo de sustrato asociado al crecimiento

Para complementar lo que sucede en el sistema es necesario conocer la cinética de consumo de sustrato, por lo que la ecuación (8) muestra la relación del consumo de sustrato asociado al crecimiento (Bailey y Ollis, 1986).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\%}} \frac{dx}{dt} \quad (8)$$

2.12.7. Discriminación de modelos

Es importante señalar que es posible discriminar entre varios modelos estadísticamente. No es suficiente con comparar la sumatoria de residuales al cuadrado (SRC) que genera cada modelo, ya que generalmente el modelo que tenga un mayor número de parámetros propiciará una menor SRC. Bajo esta premisa, la comparación se basa en determinar si vale la pena utilizar más parámetros para disminuir la SRC. Por lo anterior, los ajustes de los datos experimentales obtenidos por los diversos modelos estudiados pueden ser comparados estadísticamente mediante una prueba de distribución F.

La comparación de modelos se desarrolla bajo la suposición de que el modelo de mayor número de parámetros predice de manera exacta la concentración de biomasa en cualquier momento, mediante la obtención de la distribución f y comparación con F , como se muestra la ecuación (9).

$$f = \frac{(SRC_2 - SRC_1) / (GL_2 - GL_1)}{SRC_1 / GL_1} \quad (9)$$

Donde: SRC_2 es el valor de la SRC para el modelo de menor número de parámetros, SRC_1 es el valor de la SRC para el modelo de mayor número de parámetros, GL_1 son los grados de libertad para el modelo de para el modelo de mayor número de parámetros y GL_2 son los grados de libertad para el modelo de menor número de parámetros.

Este valor f se compara con un valor de tablas para F . Si f es menor que F entonces no vale la pena contar con un parámetro adicional, de lo contrario el modelo de mayor número de parámetros debe ser seleccionado. Este análisis es una aproximación debido a la comparación de modelos no lineales y fue utilizado para la discriminación (Zwietering y col., 1990; Chávez-Parga y col., 2005). De acuerdo al número de experimentos que sean aceptados por la prueba F se procederá a seleccionar el modelo que describa la cinética de crecimiento.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DEL TRABAJO

3.1 Sitio de origen de la muestra del mosto fermentado y muestreo

Las muestras del mosto fermentado de agave se obtuvieron de la región de Pinos y Villa Hidalgo municipios del estado de Zacatecas. Se obtuvieron las muestras en forma de pencas ya trituradas las cuales se transportaron en contenedores de aproximadamente 20 litros, se hidrataron el material y se prensó en el laboratorio pesado de Ingeniería Química de la UMSNH, los cuales se mantuvieron aislados y fuera de contaminantes para no permitir la fermentación.

3.2 Aislamiento

A partir de la muestra obtenida se aisló una cepa de levadura *Saccharomices cerevisiae* mediante la siembra en un medio sólido de PDA.

A partir de una muestra de medio fermentado de la localidad de Pinos y Villa Hidalgo, se obtuvo por goteo y arrastre de medio fermentado una pequeña cantidad de muestra con un asa de acero inoxidable en medio PDA (agar papa dextrosa), posteriormente se incuban las cajas de petri a una temperatura entre 30°C en una incubadora (*Lab Tech LSI-3016R*) durante 48 horas. Se realizan varias resiembras para obtener levadura suficiente y un cultivo puro, figura 12.



Figura 12. Resiembra de levadura y obtención de colonias puras.

3.3 Identificación morfológica

Una vez aislada la cepa se realizó una comparación entre las colonias crecidas figura 3.3a, y se realizó una observación al microscopio, en la que se pudieron identificar estructuras ovaladas en las que algunas levaduras presentan gemación figura 13. La tabla 3 presenta algunas características morfológicas del los cultivos.



Figura 13. Cepas de levadura en medio sólido PDA.

Tabla 3. Morfología de las colonias de levadura crecidas.

Morfología de las colonias de levadura crecidas					
Tamaño de la Colonia	Forma	Color	Consistencia	Borde	Medio
Grande	Ovalada	Blanco cremoso	Cremoso	Liso	PDA

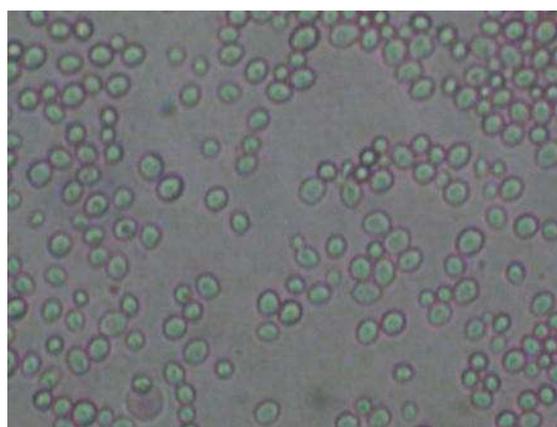


Figura 14. Micrografía (40x) de células de la levadura de la región de Pinos y Villa Hidalgo. Zacatecas (Damián y Pérez, 2010).

3.4 Preparación del inóculo

La cepa de levadura se desarrolló en PDA (agar papa dextrosa) se suspenden con 10 ml de solución isotónica de NaCl al 0.9% en peso. Se realiza un ligero raspado con la finalidad de desprender las colonias de levaduras homogenizando la mezcla obtenida. Las condiciones para el desarrollo del inóculo son las siguientes: pH 4.5, concentración de azúcares 9 °Brix y 1.33 g(NH₄)₂SO₄/L para obtener una cantidad máxima de biomasa de 9.8 g/L, siendo esta información las condiciones del cultivo iniciador de la fermentación (Tovar, 2010).

3.5 Medios de cultivo

Se inoculan 15 matraces con un volumen de 250 ml de medio de cultivo, contenidos en un matraz erlenmeyer de 500 ml, con un volumen de 5%, 10% y 15%, pH de 3.5, 4 y 4.5 ajustándose éste con un potenciómetro (*Denver Instruments*) utilizando soluciones de HCl, NaOH 1N y 2N, y cantidad de azúcares inicial de 8 °Brix, 10 °Brix y 15 °Brix respectivamente y una cantidad de nitrógeno amoniacal de 1 g/L en cada uno (CIATEJ, 2004).

3.6 Inicio de la fermentación

Una vez preparados los matraces con sus respectivos niveles y cubiertos con un tapón de tela, se introducen en la incubadora-agitadora a una velocidad de agitación a 150 rpm, permitiendo mantener las levaduras en suspensión, el adecuado transporte de masa y evitando el rompimiento de la pared celular, durante un tiempo de fermentación de 72 horas a 30 °C. De los cuales se tomaron muestras cada 8 horas para las determinaciones analíticas.

3.7 Esterilización

El material requerido en la fermentación se esterilizó en una autoclave automática (*Felisa*) por el método de vapor húmedo a 15 psi durante 15 minutos. Para el proceso de limpieza de mesas y material al momento de realizar el ajuste de pH se empleó alcohol etílico al 70%.

3.8 Diseño experimental.

Conforme a la Tabla 4, las variables a considerar para el diseño experimental de 15 matraces y su réplica, son las concentraciones iniciales de pH, cantidad de azúcar y el porcentaje de inóculo:

Tabla 4. Diseño experimental Box Behnken.

Variable	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Factor A (pH)	3.5	4	4.5
Factor B (°Brix)	8	10	12
Factor C (% Inóculo)	5	10	15

La combinación de los experimentos de acuerdo al diseño Box-Behnken se presenta en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Diseño codificado.

Box-Behnken codificado			
Experimento	pH	°Brix	% Inóculo
1	-1	-1	0
2	-1	0	1
3	-1	1	0
4	0	-1	-1
5	0	1	1
6	1	-1	0
7	0	0	0
8	1	0	-1
9	1	1	0
10	0	0	0
11	0	1	-1
12	0	-1	1
13	0	0	0
14	-1	0	-1
15	1	0	1

Tabla 6. Diseño decodificado.

Box-Behnken decodificado			
Experimento	pH	°Brix	% Inóculo
1	3.5	8	10
2	3.5	10	15
3	3.5	12	10
4	4	8	5
5	4	12	15
6	4.5	8	10
7	4	10	10
8	4.5	10	5
9	4.5	12	10
10	4	10	10
11	4	12	5
12	4	8	15
13	4	10	10
14	3.5	10	5
15	4.5	10	15

A partir de la tabla 6, se determino el volumen de mosto tomando en cuenta el volumen del inóculo, y así tener un volumen total de 250 ml de medio de cultivo para cada matraz y con pH correspondiente.

3.9. Variables que intervienen en el proceso

En todo sistema intervienen distintos tipos de variables o factores como los que se definen en la figura 15.

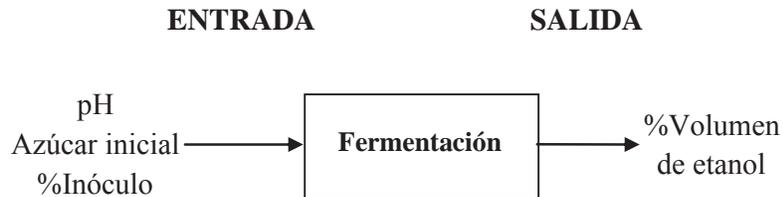


Figura 15. Variables que interviene en el proceso.

1. **Variable respuesta:** % en volumen de etanol.
2. **Factores a controlar:** pH, cantidad de azúcar inicial, % de inóculo.
3. **Factores fijos:** operador, materiales a utilizar, tiempo de fermentación, sistemas de medición.

La aleatorización evitará que los factores inducidos por el operador, materiales utilizados y tiempo de fermentación se carguen en alguno de los experimentos en forma injusta, es decir evitaremos sesgos en las observaciones.

3.9.1. Pruebas de hipótesis para la media

Factor A (pH):

$H_0: \mu_A = 0$ No hay efecto en la producción de etanol debido al pH.

$H_A: \mu_A \neq 0$ Si hay efecto en la producción de etanol debido al pH.

Factor B (°Brix):

$H_0: \mu_B = 0$ No hay efecto en la producción de etanol debido a los °Brix.

$H_A: \mu_B \neq 0$ Si hay efecto en la producción de etanol debido a los °Brix.

Variable C (% Inóculo):

$H_0: \mu_C = 0$ No hay efecto en la producción de etanol debido al %Inóculo.

$H_A: \mu_C \neq 0$ Si hay efecto en la producción de etanol debido al %Inóculo.

3.10 Determinaciones analíticas

Durante el tiempo de fermentación se realizó un muestreo cada 8 horas. El volumen de muestra en cada experimento fue de 6 ml, se tomó el pH del medio de cultivo y se hicieron las determinaciones necesarias. A la muestra obtenida se le efectuaron los siguientes análisis: concentración de biomasa, concentración de azúcares reductores, grados Brix, pH y concentración de Alcohol.

3.10.1 Biomasa

La biomasa se determinó mediante la técnica del peso seco (Apéndice A-2) que consiste principalmente en la filtración, secado y pesado de membranas especiales para cada microorganismo debido que estos presentan un diámetro diferente (Vera y Jerónimo, 2006).

3.10.2 Azúcares reductores

La prueba se realiza por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), la preparación de los reactivos se muestra en (Apéndice A-3) así como el método, Miller (1959).

3.10.3 Cuantificación de alcohol

Las muestras fermentadas se someten a destilación previa a una temperatura de ebullición de 78 °C y 30 rpm, temperatura a la cual solo se separa el etanol, con un rotavapor (*Buchi R-215 con Heating Bath B-441*), el volumen destilado obtenido de cada matraz es de 40 ml.

La cuantificación se realiza mediante espectroscopia de onda corta de infrarrojo cercano, con un equipo (*IR Spectrum 400, Perkim-Emler®*) para un análisis rápido y efectivo del contenido de alcohol (%V) en la región comprendida entre (700-1100nm) que es la región en la cual la vibración OH⁻ es característica para el etanol. Ayudado de un método de mínimos cuadrados parciales el cual interpreta los espectros de las muestras y arroja los resultados obtenidos (Barboza, Poppi, 2003; Araujo y col, 2006).

3.11 Programas utilizados para la interpretación de resultados y ajuste de datos

- Software STATGRAPHICS Plus, asistente para interpretar los resultados de cada experimento de manera estadística y obtener los valores máximos de cada variable estudiada.
- SIGMAPLOT 8.0, editor de ecuaciones, software en el cual se realizaron los gráficos de cada uno de los experimentos, así como también las curvas de calibración para las técnicas analíticas.
- STATISTICA 5.5, asistente para interpretar los resultados experimentales en conjunto, de manera estadística mediante la construcción de Gráficos de Superficie de respuesta dándonos la facilidad de combinar las variables de interés.
- El ajuste de los datos se realizó mediante el desarrollo de las ecuaciones de ajuste para los modelos de Monod y Gompertz de tres parámetros, de acuerdo a lo reportado por Castañeda y Mateo (2006), en los programas de Microsoft VISUAL BASIC y Microsoft FORTRAN Powerstation que tienen interfaces gráficas y programación de alto nivel para el cálculo científico.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis ANOVA

En la tabla 7 se muestra el análisis de varianza para la producción de etanol, en donde las variables más significativas son la concentración inicial de azúcar y el porcentaje de inóculo.

Tabla 7. Análisis de varianza para la producción de etanol

Factores	S.C.	G.L.	C.M.	F ₀	Valor p
B: Conc. Azúcar (°Brix)	56.3657	1	56.3657	43.8	0.0012
C: Inoculo (% V)	12.7386	1	12.7386	9.9	0.0255
A: pH	0.577813	1	0.577813	0.45	0.5325
AB	0.748225	1	0.748225	0.58	0.4802
AC	0.1936	1	0.1936	0.15	0.7141
BC	1.20451	1	1.20451	0.94	0.3778
ABC	1.26358	1	1.26358	0.98	0.3977
Error	1.33972	5	1.33972		
Total error	6.43517	7	1.28703		

$R^2 = 93.063\%$, Error estándar = 1.13448. S.C.: Suma de cuadrados; G.L.: Grados de libertad; M.C.: Cuadrados medios; F: Valor de distribución de probabilidad; p: Valor p.

En la figura 16 se muestran algunos de los ensayos del diseño de experimentos realizados durante y al finalizar la fermentación.

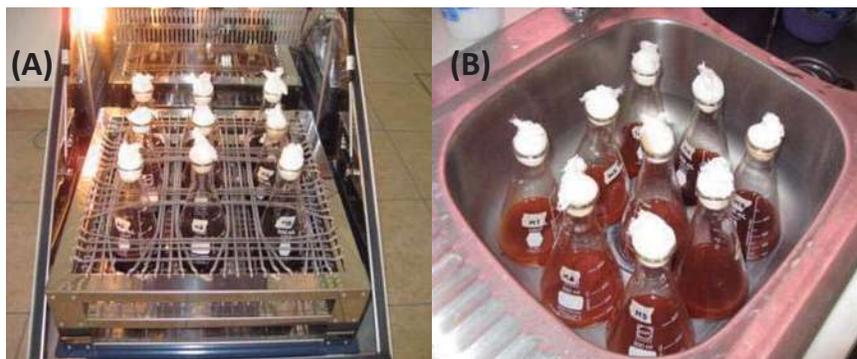


Figura 16. Experimentos durante (A) y al finalizar la fermentación (B).

4.2 Interpretación de hipótesis para la media

Se obtiene el valor F_{α} con 2 y 5 grados de libertad de las tablas de puntos críticos al 5% de la distribución F.

$$F_{0.05,2,5} = 5.79$$

Factor A (pH):

Como F_0 (pH) = 0.45 \ll $F_{0.05,2,5} = 5.79$, se acepta H_0 y se rechaza H_A .

Por lo que el pH no tiene un efecto significativo sobre la producción de etanol.

Factor B (concentración de azúcares iniciales):

Como F_0 (°Brix) = 43.8 \gg $F_{0.05,2,5} = 5.79$, se rechaza H_0 y se acepta H_A .

Por lo que la concentración de azúcares iniciales (°Brix) tiene un efecto muy significativo sobre la producción de etanol.

Factor C (% de Inóculo):

Como F_0 (%Inóculo) = 9.9 $>$ $F_{0.05,2,5} = 5.79$, se rechaza H_0 y se acepta H_A .

Por lo que el %Inóculo tiene un efecto significativo sobre la producción de etanol.

4.3 Comportamiento de la producción de Biomasa

La figura 17 presenta el comportamiento de datos de biomasa obtenidas de acuerdo al diseño Box-Behnken, confirmando que la cantidad de azúcares iniciales es un factor significativo para el crecimiento, debido a que las levaduras necesitan energía para duplicarse, dividirse, y producir los metabolitos secundarios (etanol y otros compuestos) en su crecimiento, mientras el medio no se encuentre por debajo o por arriba del rango de pH de 3.5 a 5 (Bailey y Ollis, 1986; Scragg, 2004), el metabolismo no se ve mermado. Los experimentos 3, 5, 9, 11 contienen el nivel alto (12°Brix), presentando un crecimiento promedio de 7.5 g/L.

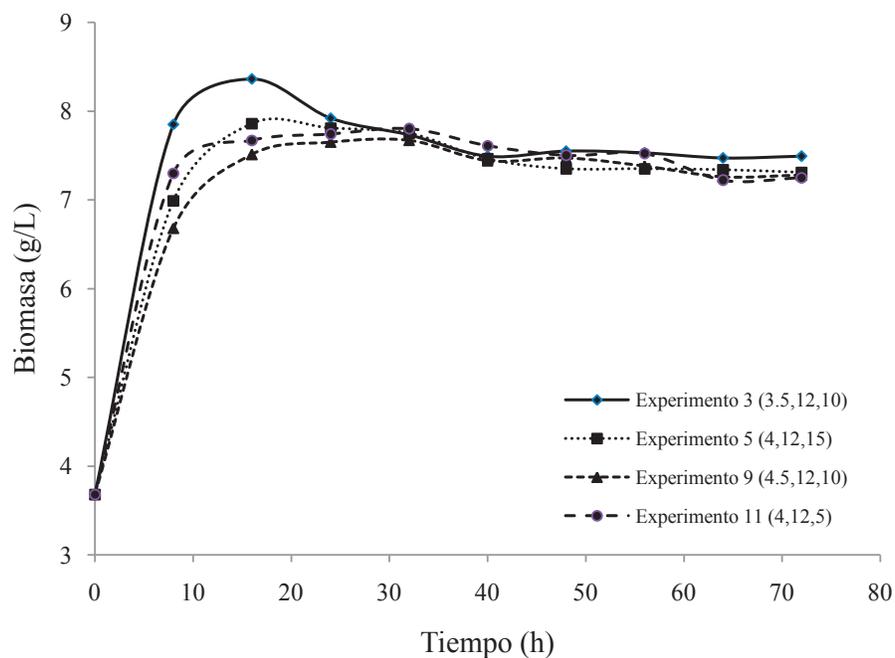


Figura 17. Comportamiento del crecimiento de biomasa.

4.4 Comportamiento del consumo azúcares Totales y Reductores

La cantidad de azúcares presentes está constituida por los azúcares totales, los cuales a su vez se dividen en azúcares reductores y no reductores, cabe señalar que los azúcares reductores (glucosa, maltosa, dextrosa) son carbohidratos que pueden ser oxidados por diferentes reactivos (Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , otros) debido a que presentan un grupo cetónico o aldehído libre, los azúcares no reductores (sacarosa, trealosa) no presentan estas características (McKee, 2003).

En la figura 18 se puede observar que conforme transcurre el tiempo de fermentación va disminuyendo la cantidad de grados Brix debido a que las levaduras utilizan los azúcares presentes como suministro de energía para llevar a cabo la biosíntesis, y a partir de las 40 horas se presenta un crecimiento y consumo de azúcares que permanece constante por la inhibición causada por la formación de producto (etanol).

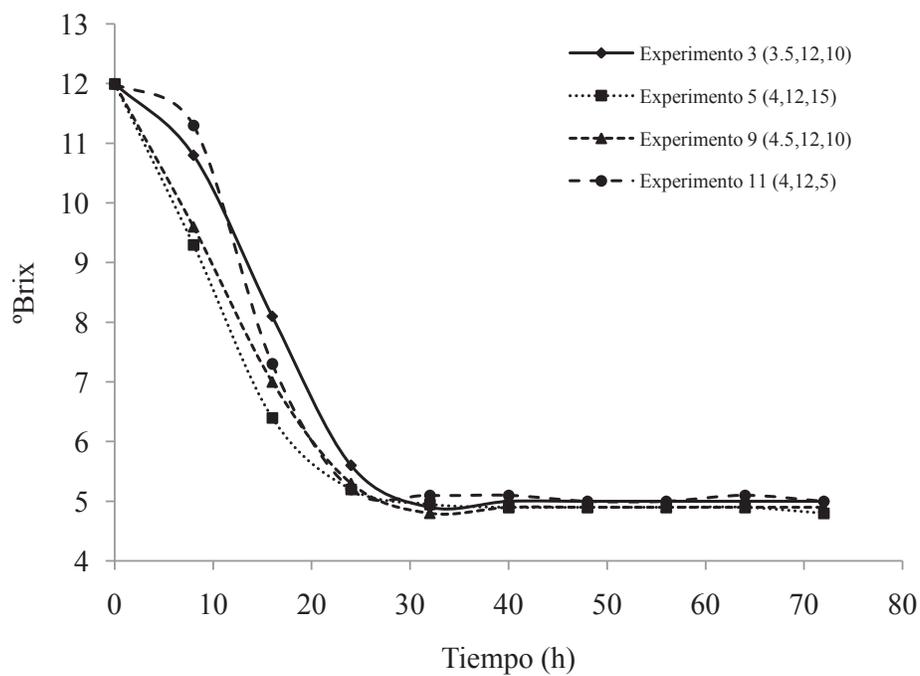


Figura 18. Comportamiento del consumo de azúcares totales

De igual manera en la figura 19 se muestra el consumo de los azúcares reductores conforme transcurre el tiempo y se presenta la inhibición por formación de producto.

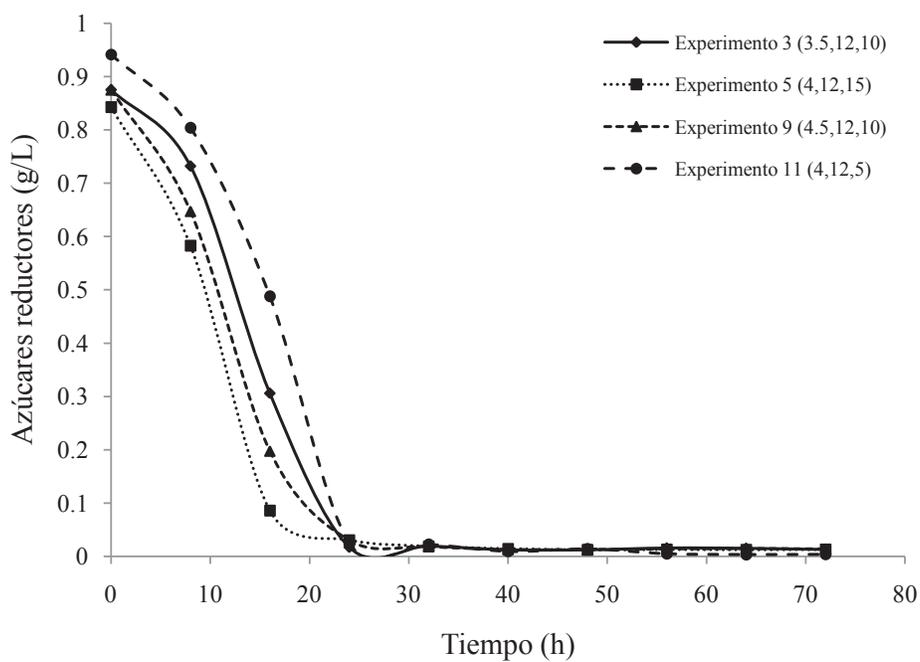


Figura 19. Comportamiento del consumo de azúcares reductores.

4.5 Comportamiento del pH

Al determinar que el pH no tiene gran significancia en la producción de etanol, mientras se mantenga en el rango (3.5 a 5), ambiente amable para las levaduras, el comportamiento descrito mediante la figura 20, se debe a que en la degradación de la glucosa a piruvato se liberan iones H^+ que acidifica el medio, por lo tanto el pH disminuye, y conforme se produce etanol como metabolito secundario el pH aumenta hasta casi permanecer constante cuando el metabolismo celular se detiene.

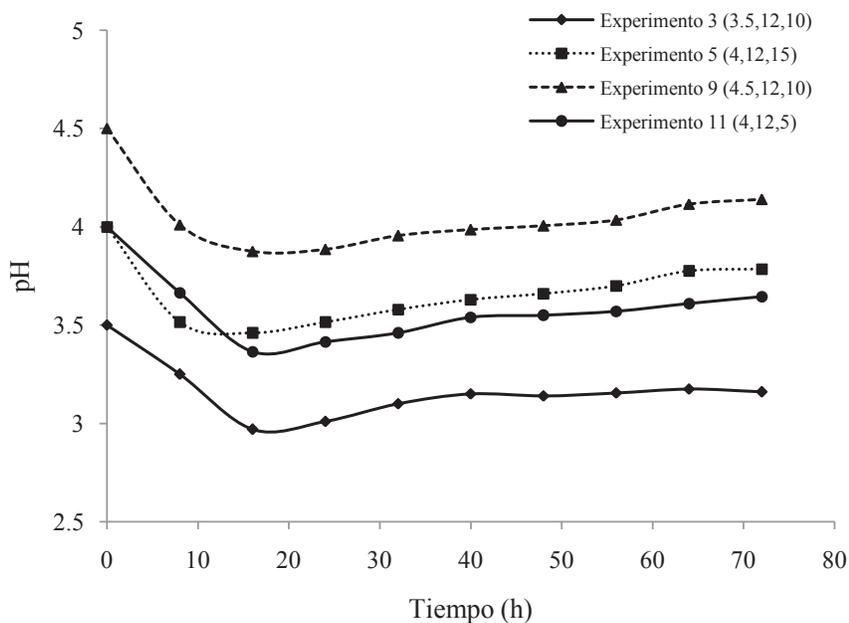


Figura 20. Comportamiento del pH.

4.6 Comportamiento de la obtención de etanol a las 72 horas de fermentación

En la figura 21 se muestra una comparación entre cada uno de los experimentos al final de la fermentación, resaltando los matraces 3, 5, 9, 11 que presentaron una mayor producción de etanol debido que contienen el nivel alto de azúcares (12 °Brix).

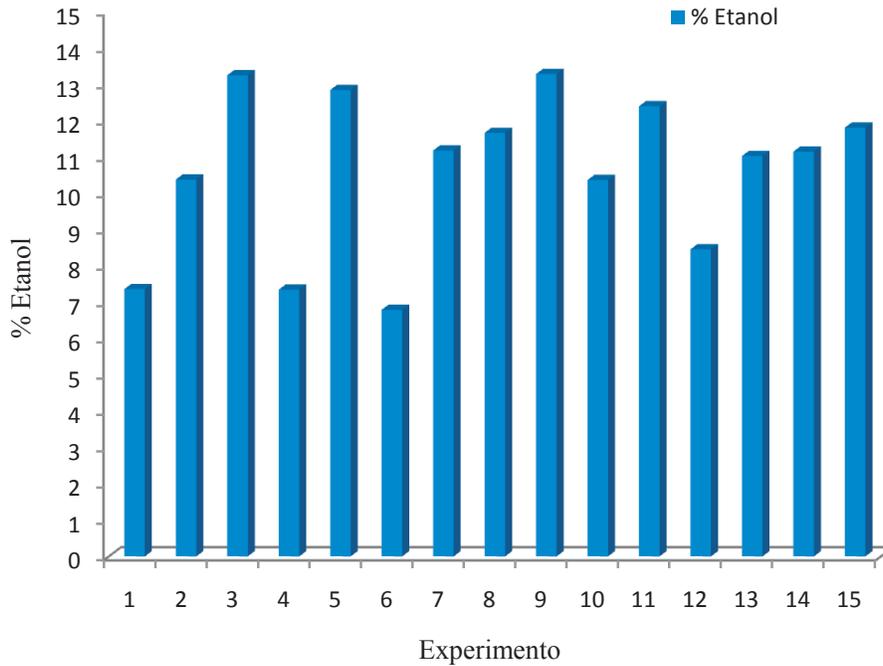


Figura 21. Cantidad máxima de etanol en cada experimento.

4.7 Ecuación que describe la producción de etanol

Los resultados del análisis experimental permiten construir un modelo de regresión de segundo orden por mínimos cuadrados para conseguir una mejor aproximación, mientras que la tabla 8 muestra los factores encontrados al solucionar la ecuación determinada. El modelo obtenido para los datos codificados es:

$$\begin{aligned} \% \text{ Etanol} = & 11.4333 + 0.6675 \cdot \text{pH} + 3.02562 \cdot \text{Brix} + 0.654375 \cdot \% \text{Inóculo} - 0.0866667 \cdot \\ & \text{pH}^2 - 1.06375 \cdot \text{pH} \cdot \text{Brix} + 0.96875 \cdot \text{pH} \cdot \% \text{Inóculo} - 2.00542 \cdot \text{Brix} - 0.275 \cdot \text{Brix} \\ & \cdot \% \text{Inóculo} + 0.634583 \cdot \text{Inóculo}^2 \end{aligned}$$

(10)

Tabla 8. Combinación de los niveles que favorecen la producción de etanol.

Factores	Nivel	Descripción	Valor
(A) pH	0.8	pH	4.4
(B) Concentración de azúcar (°Brix)	0.55	Jugo Agave	11.5
(C) Inoculo (%V)	-0.22	% en volumen inoculo	9

Al resolver la ecuación (10) que describe la producción de etanol, se obtiene la mejor combinación de las variables pH, concentración inicial de azúcares y % de inóculo, confirmando que el nivel alto de azúcares iniciales favorece el producto deseado, al igual la cantidad de levaduras crecidas depende del sustrato, y el pH mientras se mantenga en el rango ya mencionado, no inhibe el metabolismo de las mismas.

Con los valores obtenidos pH 4.4, cantidad de azúcares iniciales 11.5 °Brix y 9% de inóculo, se predice un valor de **12.5 %V** de etanol.

En las figuras 22, 23 y 24 se presentan las gráficas de superficie de respuesta para la producción de etanol en función del valor de pH y la concentración de azúcar, de la concentración inicial de azúcar y del porcentaje de inóculo, y del valor de pH y porcentaje de inóculo, respectivamente.

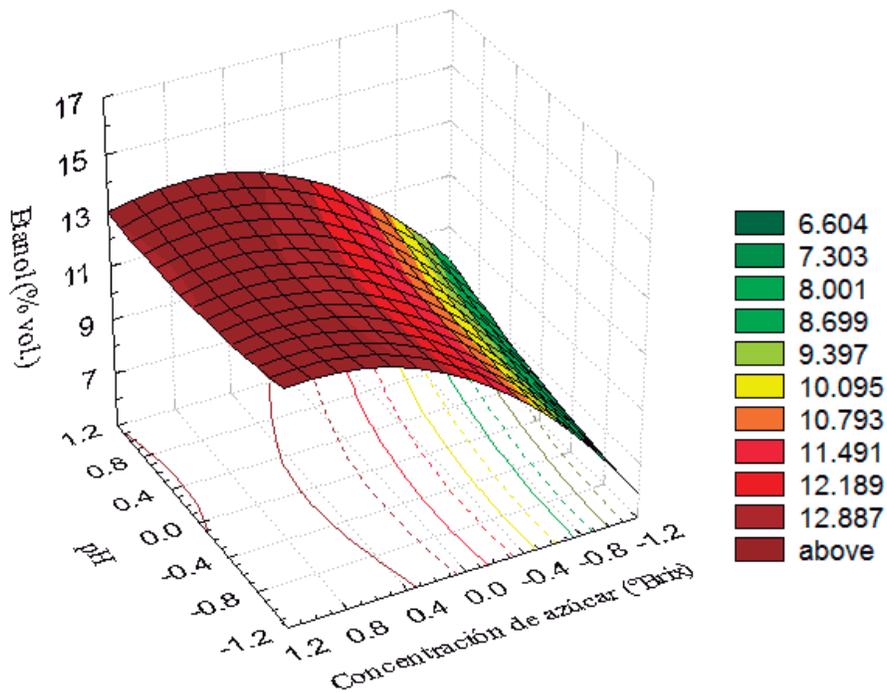


Figura 22. Superficie de respuesta y contorno para la producción de etanol en función del valor de pH y de la concentración de azúcar.

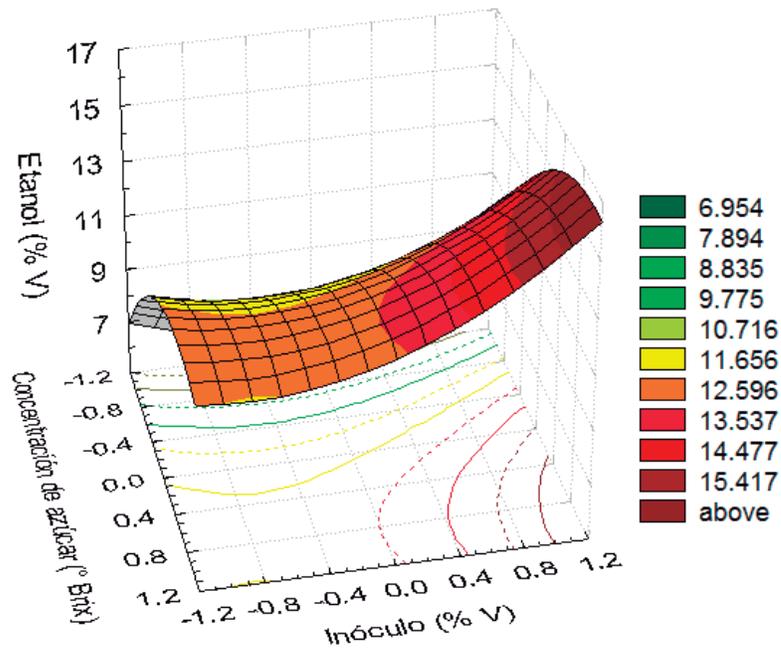


Figura 23. Superficie de respuesta y contorno para la producción de etanol en función de la concentración de azúcar y del valor del porcentaje de inóculo.

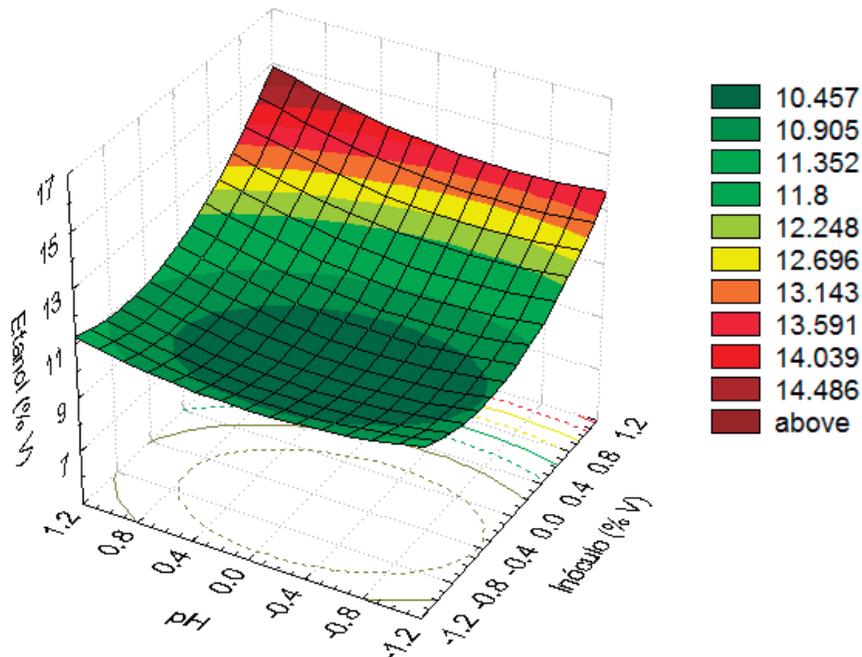


Figura 24. Superficie de respuesta y contorno para la producción de etanol en función del valor del pH y el porcentaje de inóculo.

4.8 Pruebas confirmatorias

Mediante los valores obtenidos de pH 4.4, concentración de azúcar inicial 11.5 °Brix y 9% de inóculo, se realizó una corrida experimental con su réplica para confirmar que los factores obtenidos produzcan la mayor cantidad de alcohol posible. Obteniéndose los resultados de la tabla 9 y de la figura 25.

Tabla 9. Resultados obtenidos de la prueba confirmatoria.

Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	%Etanol
0	11.7	4.5	3.6	0.819	0
8	11.2	4.21	6.25	0.743	2.92
16	6.3	3.73	7.99	0.092	6.75
24	5.2	3.77	7.76	0.037	12.16
32	5.2	3.81	8.04	0.036	12.18
40	5.2	3.88	7.29	0.001	12.83
48	5.2	3.91	7.29	0.003	13.27
56	5.2	3.96	7.27	0.002	12.30
64	5.2	4.04	7.24	0.004	12.42
72	5.2	4.06	7.3	0.002	12.36

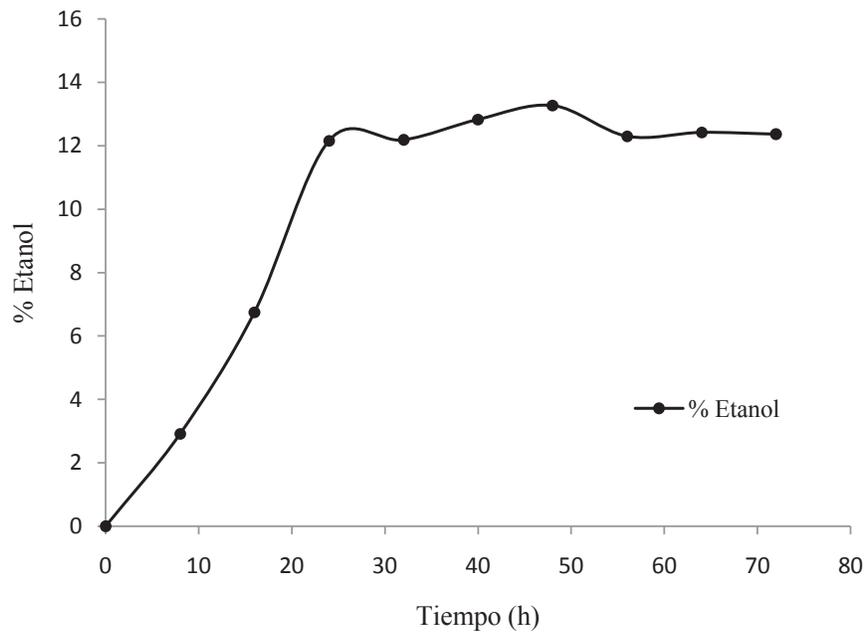


Figura 25. Cantidad de etanol obtenido en la prueba confirmatoria.

4.9. Ajustes de los datos experimentales

En la tabla 10 se muestra la comparación de las distribuciones para la discriminación de los modelos de crecimiento, de la cual el 60% de las distribuciones es mayor el valor de f que F , por lo que es necesario tener un parámetro adicional para el mejor ajuste de los datos experimentales, esto lo da el modelo de Gompertz de tres parámetros.

Tabla 10. Sumatoria de residuales al cuadrado y comparación del valor de la distribución f para el ajuste de datos experimentales de la biomasa producida.

Experimento	SRC G2	SRC G3	SRC Log	$F\alpha$	f G2	f Log
1	0.1914399	0.0865346	0.1813706	4.96	8.4860486	7.6715225
2	0.1780591	0.0950875	0.1778342	4.96	6.1080722	6.0915187
3	0.699	0.2089322	2.8046018	4.96	16.419085	8.6964531
4	1.9267556	0.7828262	1.9267556	4.96	10.22897	10.22897
5	0.4275833	0.0761992	0.4177133	4.96	32.279727	31.373024
6	0.0502642	0.0502642	0.0478495	4.96	-1.18E-08	-0.336291
7	0.1552837	0.4270439	0.1288985	4.96	-4.454628	-4.887127
8	0.2975517	0.1957689	0.2689816	4.96	3.6393936	2.6178276
9	0.1948271	0.0180871	0.1837544	4.96	68.401069	64.115749
10	2.1481276	0.8478575	2.1152835	4.96	10.735165	10.464001
11	0.4876988	0.4876952	0.53017	4.96	34.948715	34.830299
12	0.3209811	0.0535623	0.320075	4.96	5.10E-05	0.6096499
13	0.2077368	0.1786686	0.1798513	4.96	1.1388544	0.0463372
14	0.2880582	0.214051	0.2872832	4.96	24.202194	23.948737
15	0.2405116	0.239079	0.2286696	4.96	0.0419441	-0.304777

De la tabla 10 se puede observar que los experimentos 6, 9 y 12 tienen el menor valor para la sumatoria de los residuales al cuadrado utilizando el modelo de Gompertz 3, por lo que entre menor sea la SRC mejor ajustan los datos experimentales. Dando como resultado que el experimento 6 es el mejor ajuste para la biomasa.

En la tabla 11 se muestra la comparación de la sumatoria de residuales al cuadrado mediante el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Monod, esta comparación se debe a que solo se tiene un modelo para ajustar el consumo de sustrato.

Tabla 11. Comparación de la sumatoria de residuales al cuadrado mediante el modelo de Monod para el consumo de sustrato.

Experimento	SRC	Experimento	SRC
1	0,0323002	9	0,1341029
2	0,0109805	10	0,0037256
3	0,2669832	11	0,0204611
4	0,1117487	12	0,0009196
5	0,1269493	13	0,0025869
6	0,0003284	14	0,0286418
7	0,0683923	15	0,0005749
8	0,0767631		

De la tabla 11 se puede observar que los experimentos 6, 12, y 15 tienen el menor valor para la sumatoria de los residuales al cuadrado utilizando el modelo de Monod, por lo que el mejor ajuste es el experimento 6.

4.9.1 Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y ajustes de los datos experimentales durante la fermentación en el experimento 6, figura 26 y 27.

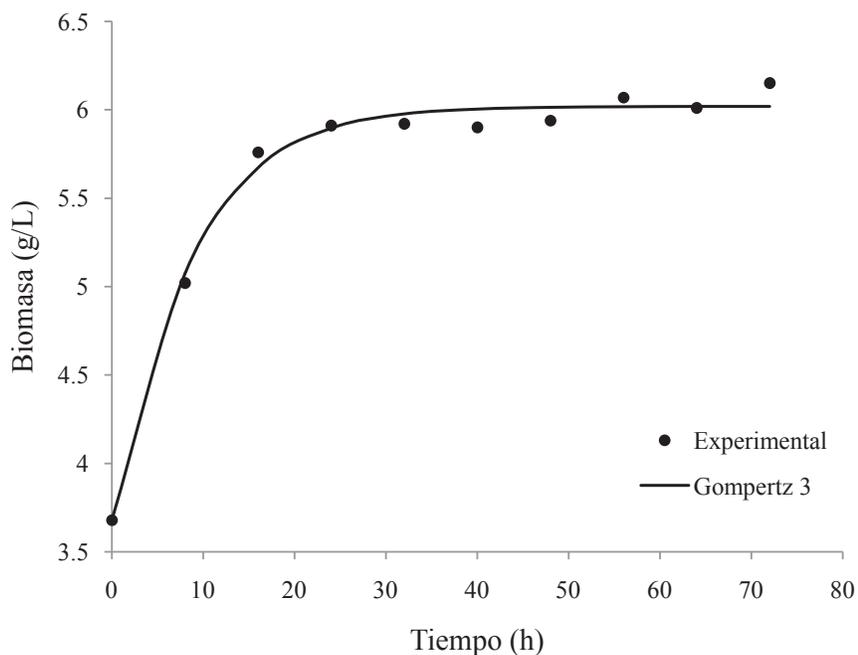


Figura 26. Ajuste de datos experimentales para el experimento 6, mediante el modelo Gompertz 3 para la biomasa.

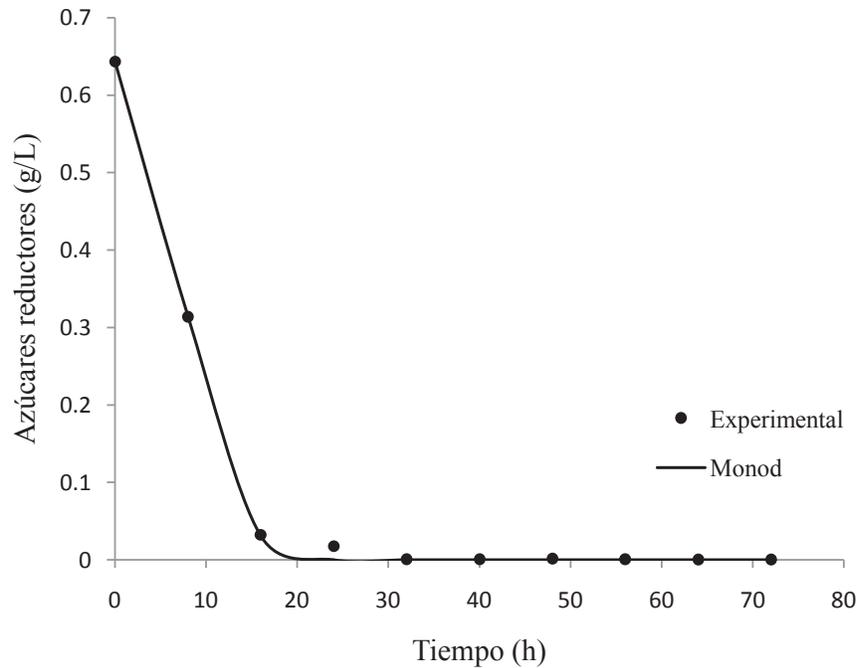


Figura 27. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato.

4.10 Discusión general de resultados

La cantidad de azúcares iniciales es un factor determinante en la producción de etanol y el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose un crecimiento promedio 7.5 g/L de biomasa en los experimentos con el nivel alto (12 °Brix), favoreciendo la producción de alcohol (12.5 %V), a partir de las 40 horas, a diferencia del proceso semi-industrial en donde la fermentación finaliza a las 72 horas.

Para el ajuste de los datos de crecimiento es necesario contar con un modelo que contenga una mayor cantidad de parámetros para el mejor ajuste, por lo que el modelo de Gompertz de tres parámetros que cuenta con un parámetro cinético adicional (inhibición de crecimiento por formación de producto), a diferencia de Gompertz de dos parámetros y el Logístico que no lo consideran, proporciona el mejor ajuste de los datos obtenidos.

La velocidad específica de crecimiento μ osciló entre 0.04 a 0.5 h⁻¹ y se obtuvo un coeficiente de rendimiento para el consumo de azúcares $Y_{x/s}$ de 0.5 g de biomasa/g de azúcares, valor adecuado ya que un valor alto indica un crecimiento elevado y un bajo consumo de azúcares, estos datos obtenidos son similares a los obtenidos para un rango de 8 a 20 °Brix, respectivamente, empleando la MG, TE2, TE4 y TE7 del género *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas por Arrizon, 2001 y CIATEJ, 2004.

De acuerdo a la ecuación obtenida para la producción de etanol se encontraron las siguientes condiciones: pH de 4.4, concentración de azúcares 11.5 °Brix, 9 % de Inóculo, con las cuales se obtuvo una cantidad de 12.25 %V, en los experimentos se logró en promedio un 13.02 %V y en la prueba confirmatoria fue de 12.5 %V de alcohol, respectivamente. Ya que el rango estimado para una *Saccharomyces cerevisiae* varía de un 10 a un 18 %V dependiendo si la levadura es vinícola o utilizada en la producción de tequila o mezcal (Arrizon, 2001).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El desarrollo del presente trabajo permitió establecer las siguientes conclusiones:

1. Las condiciones encontradas fueron pH 4.4, concentración de azúcares iniciales 11.5 °Brix y 9 %V de inóculo, con estas condiciones reproducidas en la prueba confirmatoria se obtuvo una cantidad máxima de alcohol de 12.5 %V, valor que se encuentra dentro del rango (10-18 %V) en el que las levaduras soportan la presencia de etanol y no ocurre lisis.
2. Se efectuó de manera satisfactoria el ajuste de los datos experimentales mediante los modelos de Gompertz 3 y Monod, para la producción de biomasa la μ oscilo entre 0.04 a 0.5 h^{-1} y el coeficiente de rendimiento de consumo de azúcares $Y_{x/s}$ fue de 0.5 g de biomasa/g de azúcares que representa un buen consumo de azúcar.
3. El tiempo de fermentación disminuyó a 40 horas, en comparación con las 72 horas que duran las fermentaciones semi-industriales.

5.2 Recomendaciones

Para trabajos futuros se recomienda lo siguiente:

1. Debido a que Michoacán es un estado con gran potencial para explotar el Mezcal como bebida tradicional, al contar con acervos históricos y municipios que lo producen artesanalmente esto sin formar parte de la Denominación de origen se recomienda seguir investigando a cerca de la cadena de producción agave-mezcal en el estado, para que en el momento en que Michoacán forme parte de esta denominación se tengan todas las herramientas para la producción de esta bebida y extrapolar esta investigación para su beneficio.
2. Plantear un nuevo diseño de experimentos para lograr la cantidad máxima en la producción de alcohol aplicando la metodología de superficie de respuesta así como la utilización de métodos de ajuste y optimización simultáneos.
3. Realizar los experimentos a nivel reactor ya que se cuentan con los equipos necesarios, e involucrar algunas otras variables como la velocidad de agitación, aireación y temperatura para obtener información de cómo afectan éstas el proceso.
4. Llevar a cabo experimentos a diferentes valores de pH y temperatura, para encontrar las condiciones óptimas de crecimiento y que pueden favorecer la producción de etanol.

REFERENCIAS

Araujo, A. Ruiz, F. Suárez, P. Martínez, J.R, (2006). Modelo de Calibración para calcular la concentración de alcohol en mezclas complejas. Instituto de Química, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.

Arrizon, J. (2001). “Efecto de la concentración de azúcar y la adición de nitrógeno sobre el proceso de fermentación del tequila”. Tesis de maestría en ciencias en Procesos Biotecnológicos de la Universidad de Guadalajara.

Bailey, J. E., and Ollis D. F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2da Edition Ed. Mc-Grawhill International Editions. Chemical Engineering Series. ISBN: 0-07-0032122.

Barboza, F. Poppi, R. (2003). Determination of alcohol content in beverages using short-wave near-infrared spectroscopy and temperature correction by transfer calibration procedures. Instituto de Química, Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP). Sao Paulo, Brazil.

Barnett, J.A. (1981). “The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts”. Adv. Carbo. Chem. Biochem.

Castañeda P. A. K. y Mateo A. J. G. (2006). Ajuste de datos experimentales de procesos fermentativos empleando modelos no estructurados con interfaces en visual basic. Monografía Instituto Tecnológico de Morelia.

Castro, J. (2003). Anteproyecto de una planta de elaboración de Tequila. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Nayarit.

CIATEJ. (2004). Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y Perspectivas. Guadalajara Jalisco. México.

Durán, H. y Pulido, J. (2007). Análisis de la Molienda en el Proceso de elaboración del Mezcal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). San Luis Potosí. México.

Felder, R.M. Rousseau, R.W. (2004). “Principios Elementales de los Procesos Químicos”, pág 237-238 y 294, 3ª ed. Addison-Wesley Iberoamericana, México.

- Fortalecimiento de cadenas productivas. (2005). Diagnóstico del sistema producto Maguey-Mezcal, México.
- Galindo, E. (2005). “La ingeniería Química y la Biotecnología”. Revista del IMIQ. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Gallardo, V. J., Gschaedler, M.A.C., Cházaro, B. M., Tapia, C., Villanueva, R.S., Salado, P.J.H., Viilegas, G.E., Medina, N.R., Aguirre, O.M. & Vallejo, P.M. (2008). La Producción de Mezcal en el Estado de Michoacán.
- Geankoplis C. (1995). Procesos de Transporte y operaciones Unitarias. Ed. CECSA. México.
- Gelmi, C., Pérez.Correa R. and Agosin E. (2002). Modeling *Gibberella fujikuroi* growth and GA₃ production in solid-state fermentation. Process. Biochemistry. 37:1033-1040.
- James, M Lee. (2001). “Cell kinetics and Fermenter Design”. Pullman, WA.
- Kurstzman, C.P; Fell, J.W. (1998). The yeast, a taxonomic study. Elsevier Science, Amsterdam.
- Lemus, F. (2010). Mezcal Michoacano a la espera de la Denominación de Origen. Cambio de Michoacán, 27 de mayo de 2010. Morelia Michoacán, México.
- Lehninger, A. L. (1990). Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función de la célula. 2da edición, Omega, Barcelona.
- López, A. (1992). “A simple mathematical model for estimating the rate of heat generation during fermentation in white wine making”, Int. J. Microbiol, 15:276-280.
- McKee T, Mckee JR (2003): Hidratos de carbono. En Mckee T, McKee JR (eds): Bioquímica. La base molecular de la vida, 3ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana (Madrid, España), pp. 200 – 233.
- McNeil B. y Harvey L.M. (1990). Fermentation a practical approach. Ed. Oxford University Press. Oxford Inglaterra.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.

Montgomery D. C. (2004). Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa-Wiley ISBN: 968-18-6156-6.

Norma Oficial Mexicana Nom-070-Scfi-1994. Bebidas Alcohólicas. Mezcal. Especificaciones.

Palacios García, A., F. Raginel, and A. Ortiz-Julien. 2007. Can the selection of *Saccharomyces cerevisiae* yeast lead to variations in the final alcohol degree of wines? *Australia and New Zealand Grapegrower and Winemaker*. 527:71-75.

Prado R. (2002). Destilación del Tequila y Mezcal: Factores que Afectan la Calidad del Producto. Tesis de Doctorado. Univesidad de Guadalajara.

Pérez, E. y Damián, R. (2010). Caracterización Molecular y Fermentativa de una Levadura utilizada para la producción de mezcal en la Región de Etúcuaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Morelia. Michoacán, México.

Pinal, L.M. (2001). “Influencia del tiempo de cocimiento sobre la generación de compuestos organoléuticos en las etapas de de cocimiento y fermentación de la elaboración del tequila”. Universidad de Guadalajara.

Salmon, J. M; Vincent, O; Mauricio, J. C; Bely, M; Barre, P. (1993). “Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations”, *Am. J. Enol. Vitic.*, 44(1): 56-64.

Sistema Producto Maguey-mezcal. (2004). Fortalecimiento de cadenas productivas y Diagnóstico del sistema producto Maguey-mezcal. Guerrero, México. 100-101.

Shukla, R., Chand and Srivastara A. K. (2005). Batch Kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technol.* 36:492-497.

Tavares, A. P. M., Cohelho, M.AZ., Coutinho, J.A.P and Xavuer A.M.R.B. (2005). Lacasse improvement in submerged cultivation: induced production and Kinetic modeling. *J. of Chemical Techn. And Biotechnol.* 80:669-676.

Valenzuela-Zapata. (2007). Las de nominaciones de origen Tequila y Mezcal y la biodiversidad en el género Agave. Universidad Autónoma de Guadalajara. Departamento de Salud Pública.

Vera, G, Jerónimo. A. (2006). Producción de Bikaverina a nivel matraz agitado. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Morelia. Michoacán, México.

Walker, G.M. (1998). “Biotecnología y Fisiología de las Levaduras”, John Wiley & Sons. New York.

www.Rev.Latinoam.Microbiol. (2010). Asociación Mexicana de Microbiología Ac. “Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados (Tequila)”.

Zarzoso, B.E., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed.

Zwietering, M. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M, and Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology. 56:1875-1881.

APENDICE

A-1 Medio de cultivo PDA para el crecimiento de las Levaduras

Para la preparación del medio base, pesar 9.75 g de PDA y diluir en un volumen de 250 ml con agua destilada.

A-2 Método del peso seco para calcular la cantidad de Biomasa

1. Filtrar 6ml de la muestra a través de membranas millipore de 0.22µm y de 4.5 cm de diámetro.
2. Someter la muestra filtrada a una deshidratación en un horno a 80°C, por 1 hora.
3. Pesar la membrana con la muestra.

Las membranas usadas para la determinación de la concentración de biomasa son secadas previamente hasta peso constante y almacenadas en un desecador para facilitar su uso. Se etiquetan con un marcador distintivo para no tomar la misma muestra de un experimento ya analizado.

El filtrado del caldo se recibe en un tubo de ensaye para las determinaciones de concentración de azúcares reductores, grados Brix y pH.

Cálculo de la concentración de biomasa:

$$\text{Peso seco(g/L)} = \frac{(P1 - P2)}{\text{Volumen Filtrado (L)}}$$

Donde:

P1: Peso de la membrana con la muestra filtrada

P2: Peso de la membrana.

A-3 Azúcares reductores

A-3.1 Reactivo DNS (1 L de solución)

1. Pesar 14 g de lentejas de Hidróxido de Sodio.
2. Pesar 7.5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).
3. Pesar 100 g de Tartrato de Sodio y Potasio.
4. Pesar 5.4 g de Metabilsulfito de Sodio.
5. Pesar 5.9 g de Fenol.

Colocar cada una de las sustancias pesadas en aproximadamente 50 ml de agua destilada, (teniendo la precaución al momento de mezclar el hidróxido de sodio debido a que este genera una reacción exotérmica), una vez disueltas verter en un matraz aforado de 1 L y aforar con agua destilada. Filtrar la solución obtenida y almacenar en un frasco ámbar durante 24 horas para su posterior uso, esta solución es estable indefinidamente.

A-3.2 Técnica del DNS

La prueba se realiza de la siguiente manera (Miller, 1959).

1. Tomar con una micropipeta 100 μ l del filtrado que se obtuvo durante la cuantificación de concentración de biomasa.
2. Adicionar 10 ml de agua destilada.
3. Pasar 1 ml de esta dilución a un tubo de ensaye y agregar 3 ml de DNS.
4. Colocar en baño María llevando a ebullición por 5 minutos y dejar enfriar.
5. Completar el volumen a 10 ml con agua destilada.
6. Leer en el espectrofotómetro a 550 nm.
7. Realizar los cálculos conforme a la curva de calibración (A-2.2).

Se repite el procedimiento tomando 1 ml de agua destilada para generar un blanco.

A-3.3 Obtención de la curva de calibración para azúcares reductores

La curva de calibración tiene un rango lineal de 0 a 1 g de dextrosa por ml, se prepara disoluciones desde 0.1 g/ml hasta 1 g/ml de una solución patrón de 1 g/ml, mediante el siguiente procedimiento:

1. Tomar 1 ml de cada estándar y se coloca en un tubo de ensaye.
2. Adicionar 3 ml de reactivo DNS y agitar hasta mezclar perfectamente.
3. Poner en baño María durante 5 min.
4. Completar el volumen a 10 ml.
5. Leer en el espectrofotómetro a 550 nm, registrar cada una de las lecturas.

Una vez teniendo las lecturas y las concentraciones correspondientes se grafica la concentración contra absorbancia que debe dar por resultado una línea recta y la ecuación de línea que determina la concentración de azúcar reductor en la muestra.

A-4 Resultados obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño

Tabla A-4.1. Resultados del experimento 1.

Matraz 1				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	8	3.5	3.68	0.555
8	7.4	3.06	4.98	0.442
16	5.4	2.75	5.96	0.057
24	3.6	2.81	6.4	0.003
32	3.6	2.91	5.8	0.005
40	3.6	2.95	5.8	0.002
48	3.6	2.95	5.84	0.002
56	3.6	2.95	5.78	0.005
64	3.6	2.96	5.8	0.004
72	3.6	2.95	5.96	0.005

Tabla A-4.2. Resultados del experimento 2.

Matraz 2				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	3.51	3.68	0.678
8	9.4	3.23	7.3	0.510
16	7.4	2.93	6.92	0.082
24	5	2.97	7.4	0.010
32	4.6	3.07	7.3	0.006
40	4.6	3.12	6.86	0.007
48	4.6	3.12	7.06	0.004
56	4.6	3.12	6.84	0.013
64	4.6	3.12	6.98	0.009
72	4.4	3.12	6.98	0.012

Tabla A-4.3. Resultados del experimento 3.

Matraz 3				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	12	3.5	3.68	0.899
8	11	3.24	8.32	0.733
16	9	2.98	7.78	0.306
24	6.2	3.02	6.04	0.019
32	5	3.09	5.96	0.019
40	5	3.18	5.88	0.012
48	5	3.17	5.74	0.012
56	5	3.2	5.76	0.016
64	5	3.23	5.72	0.015
72	5	3.21	5.94	0.014

Tabla A-4.4. Resultados del experimento 4.

Matraz 4				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	8	4.01	3.68	0.594
8	7.2	3.48	8.32	0.449
16	5	3.22	7.78	0.032
24	4.8	3.3	6.04	0.006
32	3.4	3.37	5.96	0.001
40	3.4	3.42	5.88	0.007
48	3.4	3.44	5.74	0.000
56	3.4	3.46	5.76	0.004
64	3.4	3.48	5.72	0.005
72	3.4	3.47	5.94	0.004

Tabla A-4.5. Resultados del experimento 5.

Matraz 5				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	12	4.03	3.68	0.915
8	10	3.55	7.04	0.594
16	7.6	3.5	8.46	0.093
24	5.6	3.55	8.44	0.031
32	5.2	3.59	8.28	0.019
40	5	3.66	7.82	0.015
48	5	3.69	7.56	0.012
56	5	3.74	7.6	0.011
64	5	3.82	7.48	0.012
72	5	3.83	7.34	0.014

Tabla A-4.6. Resultados del experimento 6.

Matraz 6				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	8	4.5	3.68	0.655
8	6	3.69	4.74	0.312
16	4	3.63	6.12	0.032
24	3.6	3.72	6.02	0.019
32	3.6	3.75	6.06	0.000
40	3.6	3.81	5.96	0.001
48	3.6	3.84	6	0.003
56	3.6	3.9	5.98	0.000
64	3.6	4.04	6	0.000
72	3.6	4.07	6.16	0.000

Tabla A-4.7. Resultados del experimento 7.

Matraz 7				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	4	3.68	0.777
8	8.2	3.46	6.04	0.532
16	6	3.35	7.44	0.057
24	4.4	3.41	7.48	0.016
32	4.4	3.47	7.1	0.003
40	4.4	3.55	7.06	0.000
48	4.4	3.58	7.08	0.006
56	4.4	3.64	7.16	0.005
64	4.4	3.72	7.1	0.006
72	4.4	3.72	7.1	0.006

Tabla A-4.8. Resultados del experimento 8.

Matraz 8				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	4.5	3.68	0.760
8	9	4.06	5.2	0.594
16	7	3.83	6.84	0.227
24	4.8	3.82	6.64	0.016
32	4.2	3.88	6.62	0.003
40	4.2	3.94	6.48	0.003
48	4.2	3.95	6.62	0.003
56	4.2	3.97	6.38	0.006
64	4.2	4.05	6.24	0.006
72	4.2	4.07	6.2	0.006

Tabla A-4.9. Resultados del experimento 9.

Matraz 9				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	12	4.5	3.68	0.876
8	9.8	4	7.2	0.645
16	7.6	3.9	7.96	0.196
24	5,6	3.9	8	0.030
32	5	3.96	7.88	0.018
40	5	4	7.84	0.012
48	5	4.02	7.9	0.012
56	5	4.05	7.68	0.012
64	5	4.13	7.32	0.014
72	5	4.15	7.48	0.012

Tabla A-4.10. Resultados del experimento 10.

Matraz 10				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	4.01	3.84	0.770
8	8.2	3.56	6.32	0.445
16	4.6	3.28	7.16	0.019
24	4.4	3.18	6.76	0.013
32	4.4	3.3	8.54	0.012
40	4.4	3.34	8.6	0.009
48	4.4	3.38	7.32	0.006
56	4.4	3.39	6.06	0.009
64	4.4	3.4	6.16	0.006
72	4.4	3.4	6.04	0.007

Tabla A-4.11. Resultados del experimento 11.

Matraz 11				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	12	4.02	3.84	0.937
8	11.2	3.5	8.16	0.704
16	7	3.25	8.64	0.650
24	5.2	3.34	8.38	0.006
32	5.2	3.38	8.54	0.019
40	5.2	3.47	8.6	0.006
48	5.2	3.48	8.28	0.012
56	5.2	3.48	8.4	0.009
64	5.2	3.48	7.8	0.006
72	5.2	3.48	7.84	0.006

Tabla A-4.12. Resultados del experimento 12.

Matraz 12				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	8	4.01	3.84	0.577
8	5.4	3.08	5.48	0.156
16	3.8	3.17	6.32	0.093
24	3.8	3.25	5.76	0.000
32	3.6	3.28	7.84	0.019
40	3.6	3.33	7.96	0.006
48	3.6	3.33	8.16	0.012
56	3.6	3.34	8.04	0.013
64	3.6	3.34	8.2	0.004
72	3.6	3.34	8.12	0.004

Tabla A-4.13. Resultados del experimento 13.

Matraz 13				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	4	3.84	0.697
8	7.4	3.24	5.84	0.329
16	4.4	3.24	7.02	0.020
24	4.2	3.35	6.88	0.006
32	4.2	3.38	7.08	0.006
40	4.2	3.44	7.16	0.004
48	4.2	3.44	6.96	0.007
56	4.2	3.48	6.88	0.006
64	4.2	3.49	6.96	0.006
72	4.2	3.49	6.92	0.007

Tabla A-4.14 Resultados del experimento 14.

Matraz 14				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	3.52	3.84	0.789
8	9.8	3.14	6.86	0.634
16	6.6	2.64	7.02	0.279
24	4.4	2.71	6.98	0.003
32	4.2	2.78	6.6	0.004
40	4.2	2.85	6.64	0.006
48	4.2	2.85	7.08	0.003
56	4.2	2.86	6.4	0.007
64	4.2	2.86	6.98	0.006
72	4.2	2.86	6.44	0.006

Tabla A-4.15. Resultados del experimento 15.

Matraz 15				
Tiempo (h)	°Brix	pH	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)
0	10	4.5	3.84	0.719
8	6.6	3.61	7.04	0.219
16	4.4	3.64	7.24	0.016
24	4.4	3.72	6.9	0.006
32	4.2	3.86	7.72	0.006
40	4.2	3.93	7.4	0.006
48	4.2	3.96	7.52	0.006
56	4.2	4.04	7.64	0.007
64	4.2	4.04	7.6	0.004
72	4.2	4.04	7.64	0.003

A-5 Datos obtenidos de alcohol al finalizar la fermentación (72 h)

Experimento	Alcohol (%V)
1	7.355
2	10.37
3	13.24
4	7.34
5	12.835
6	6.785
7	11.17
8	11.655
9	13,275
10	10.3575
11	12.3875
12	8.45
13	11.0175
14	11.14
15	11.8

A-6 Curva de Calibración (DNS)

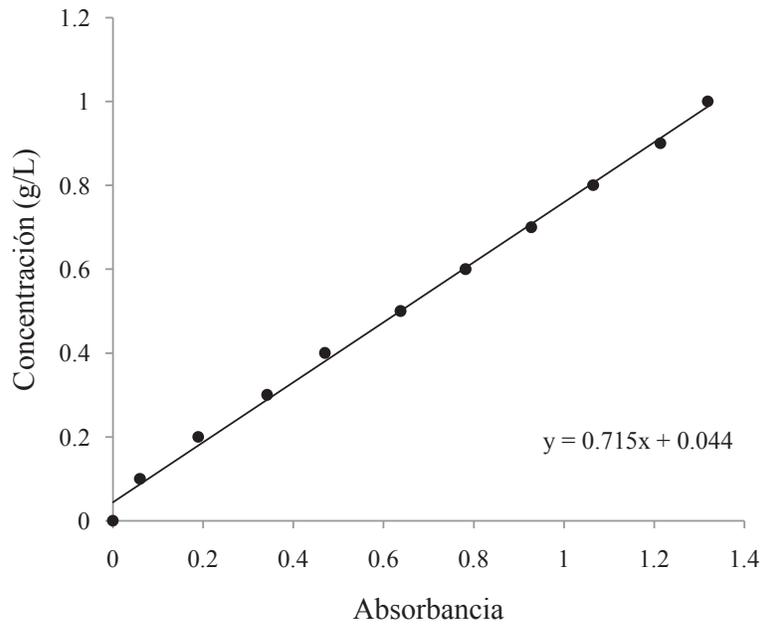
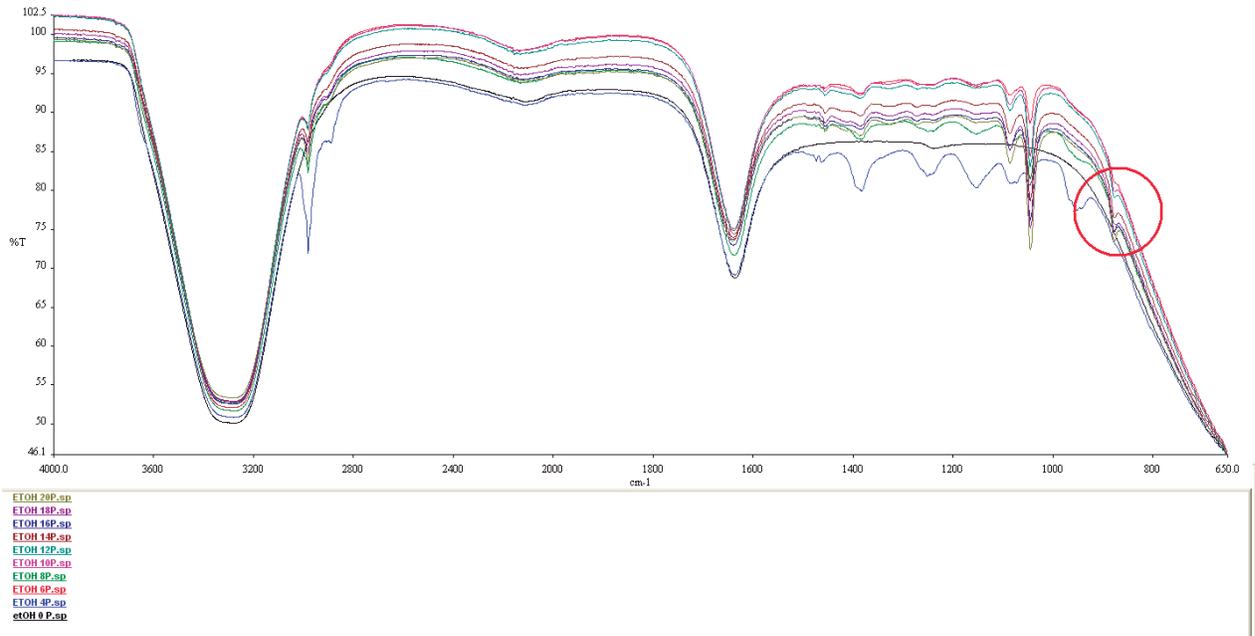
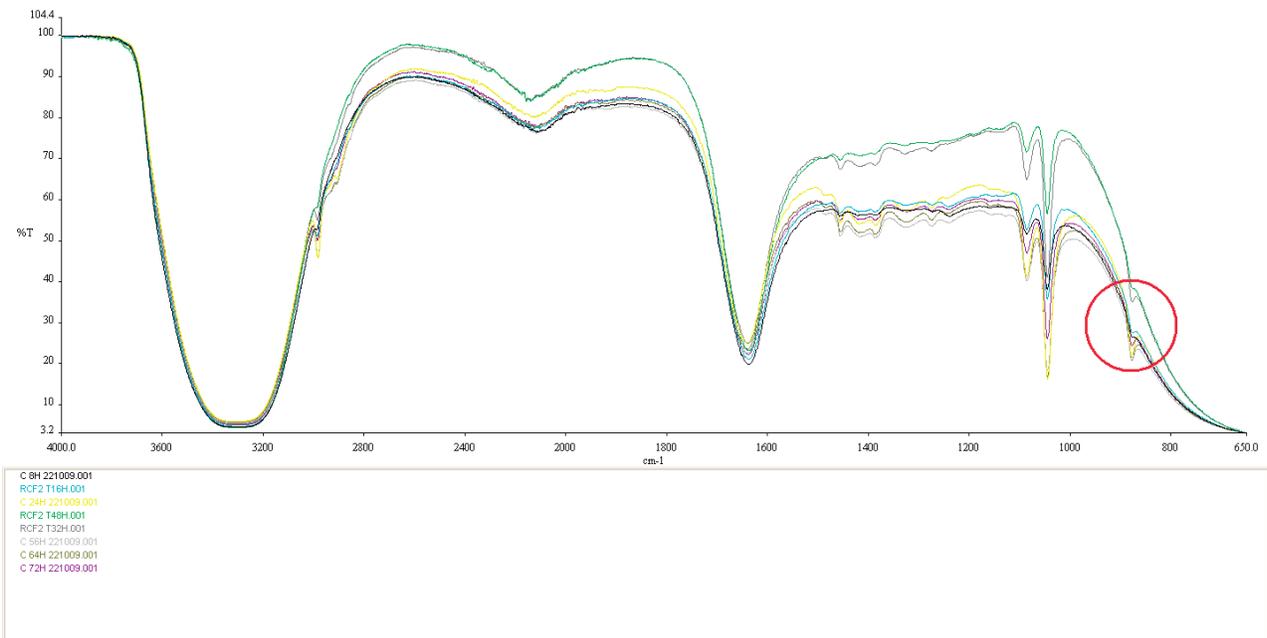


Figura 28. Curva de Calibración (DNS).

A-7 Espectros obtenidos de la cuantificación de Alcohol para la curva de calibración (rango 0-20 %V) a longitud de onda de 850 nm



A-8 Espectros obtenidos de la cuantificación de Alcohol durante la prueba confirmatoria mediante el método de Infrarrojo cercano



A-9 Ajustes de los datos experimentales (Biomasa y Sustrato)

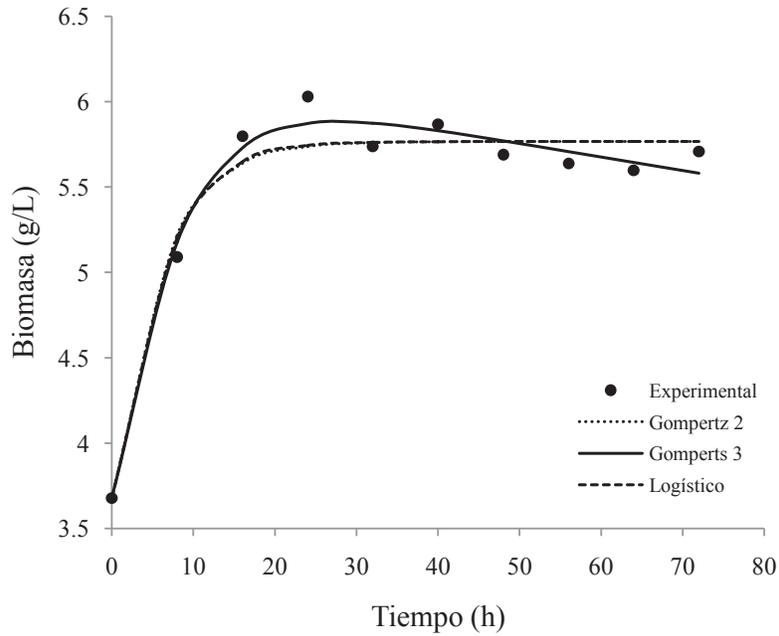


Figura A-9.1. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo Gompertz 2, Gompertz 3 y Lógico para la biomasa en el experimento 1.

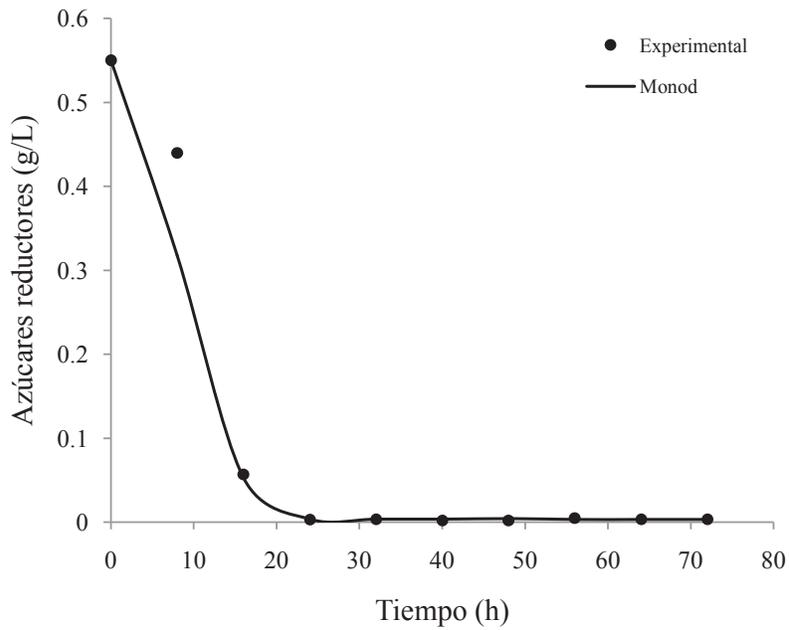


Figura A-9.2. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 1.

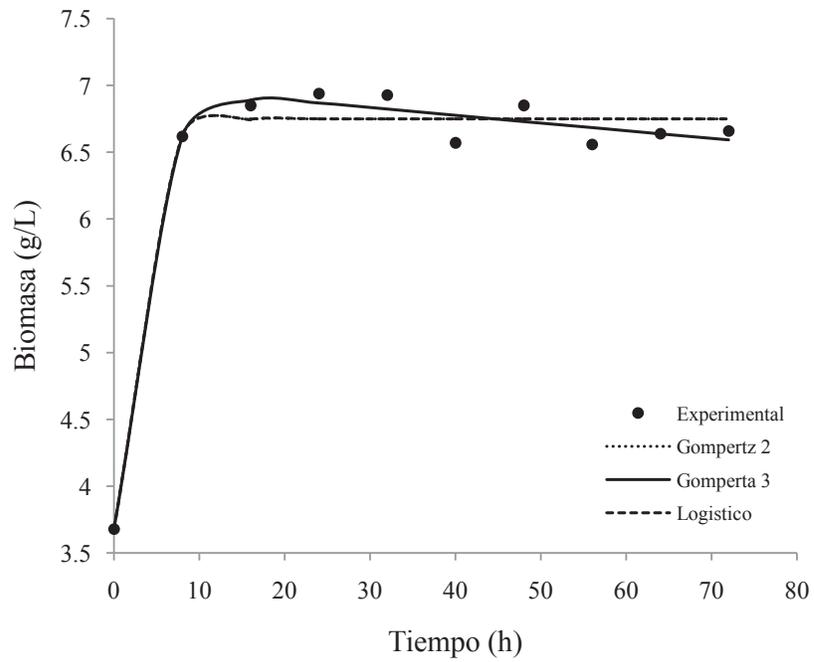


Figura A-9.3. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 2

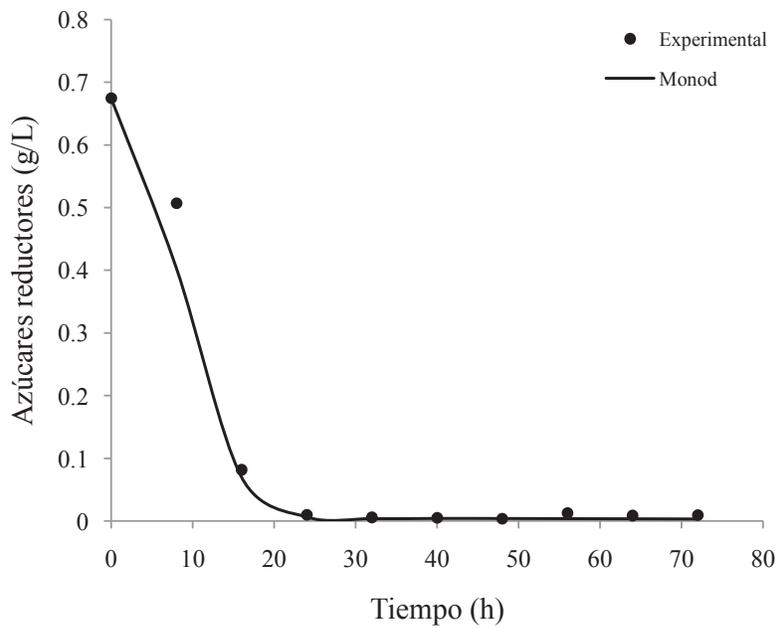


Figura A-9.4. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod para el sustrato en el experimento 2

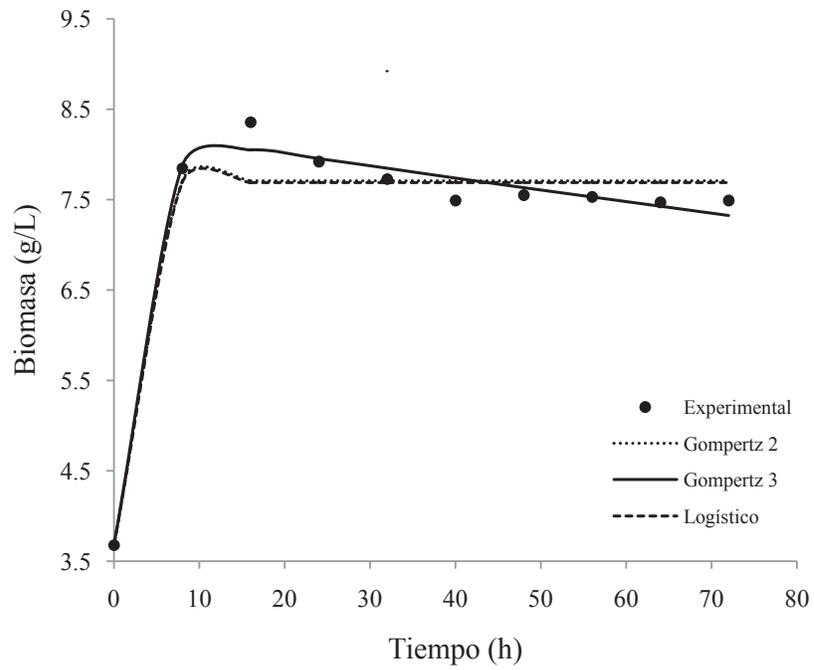


Figura A-9.5. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 3.

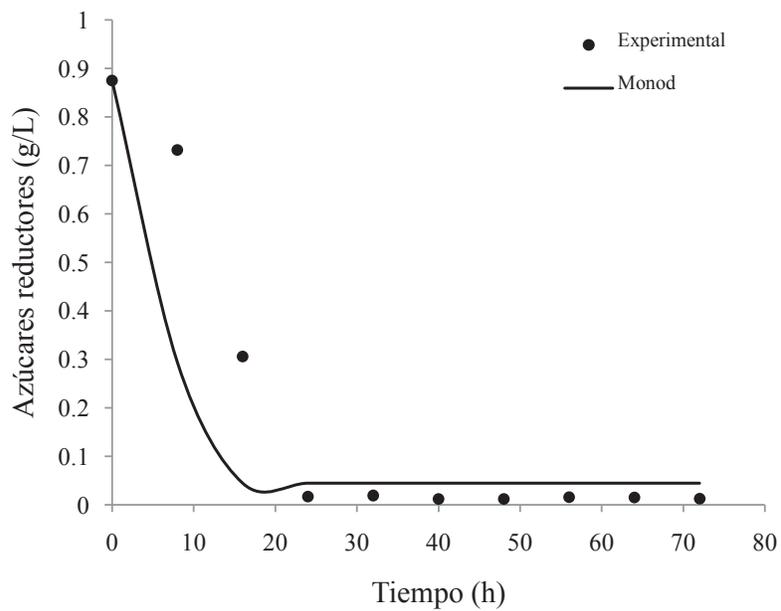


Figura A-9.6. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 3.

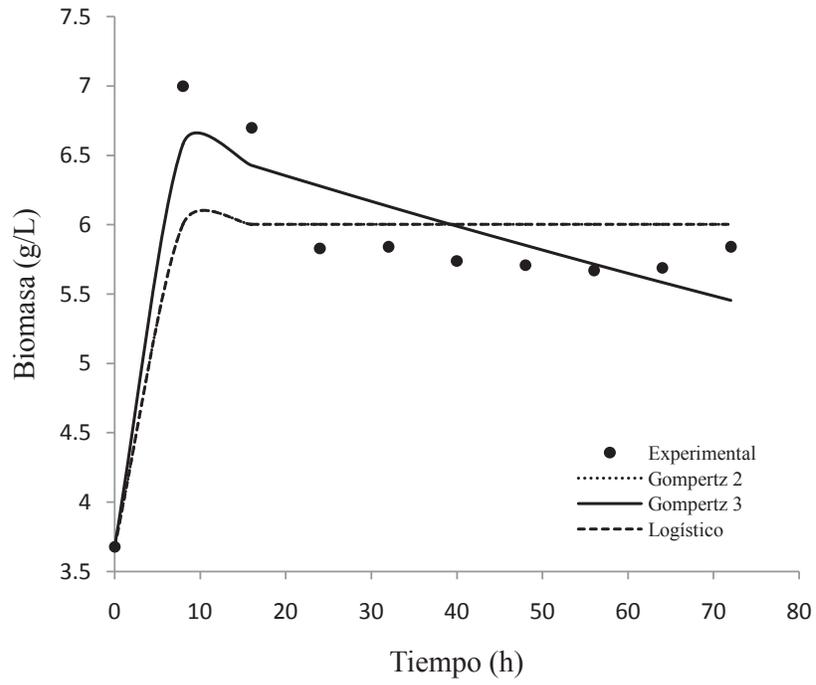


Figura A-9.7. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 2 y Logístico para la biomasa en el experimento 4.

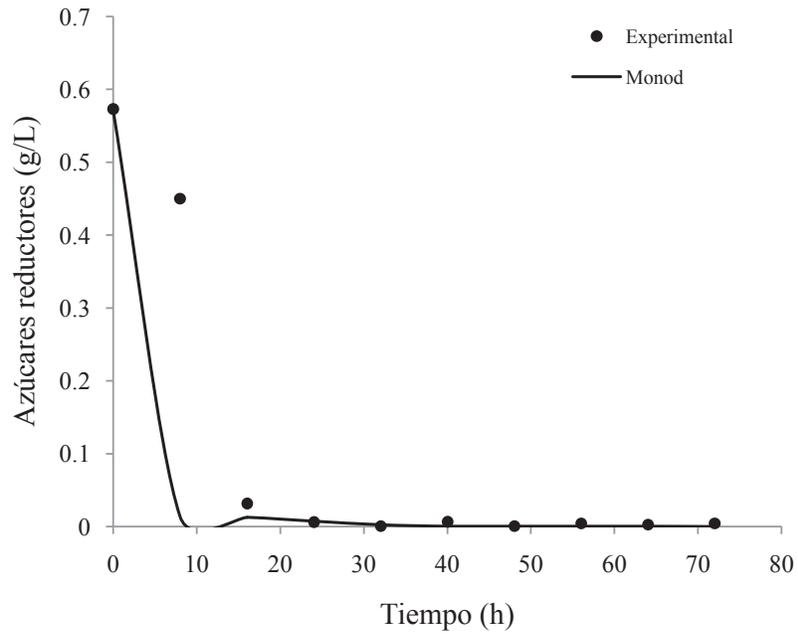


Figura A-9.8. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 4.

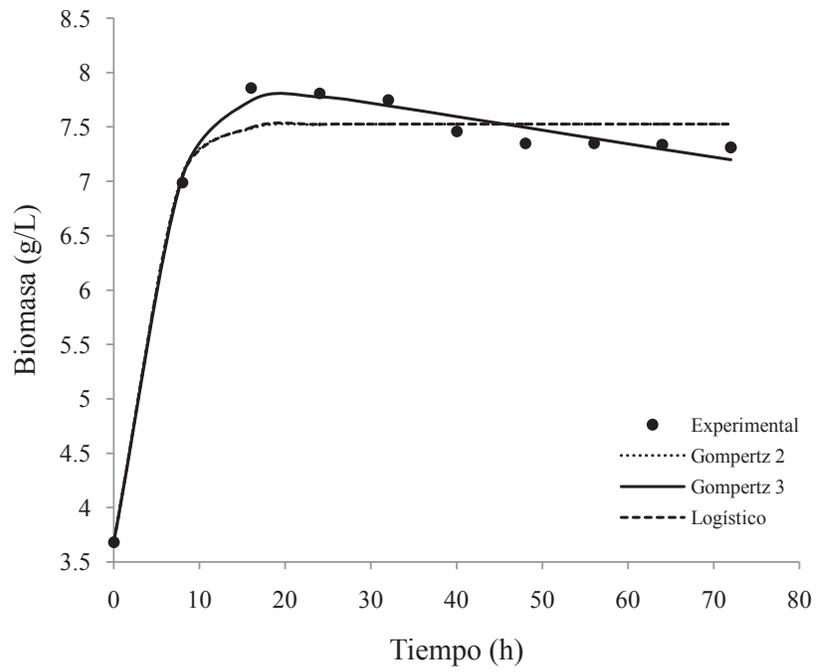


Figura A-9.9. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 5.

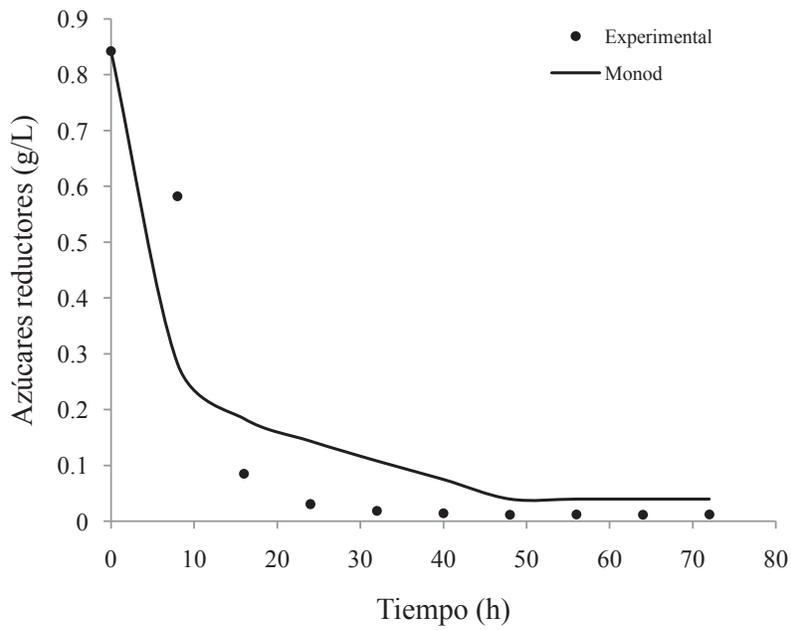


Figura A-9.10. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 5.

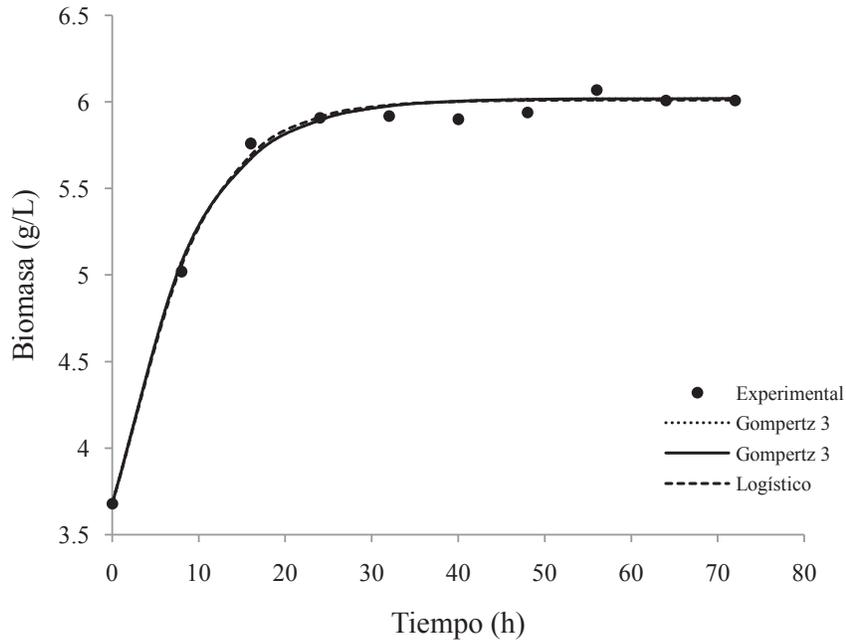


Figura A-9.11. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 6.

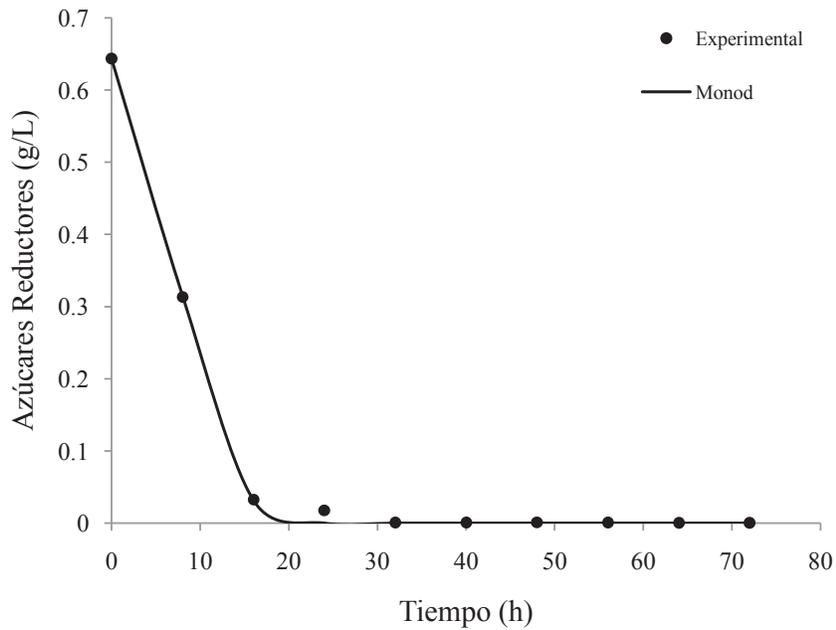


Figura A-9.12. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 6.

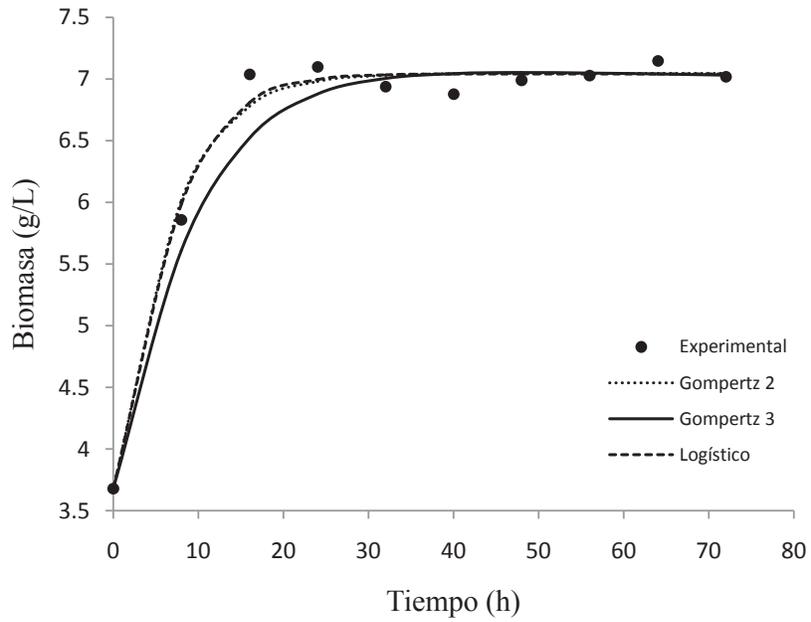


Figura A-9.13. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 7.

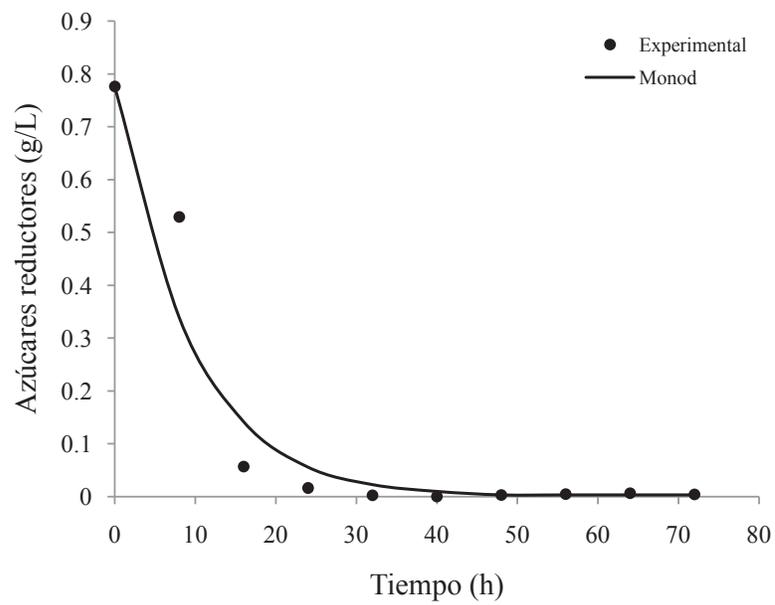


Figura A-9.14. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 7.

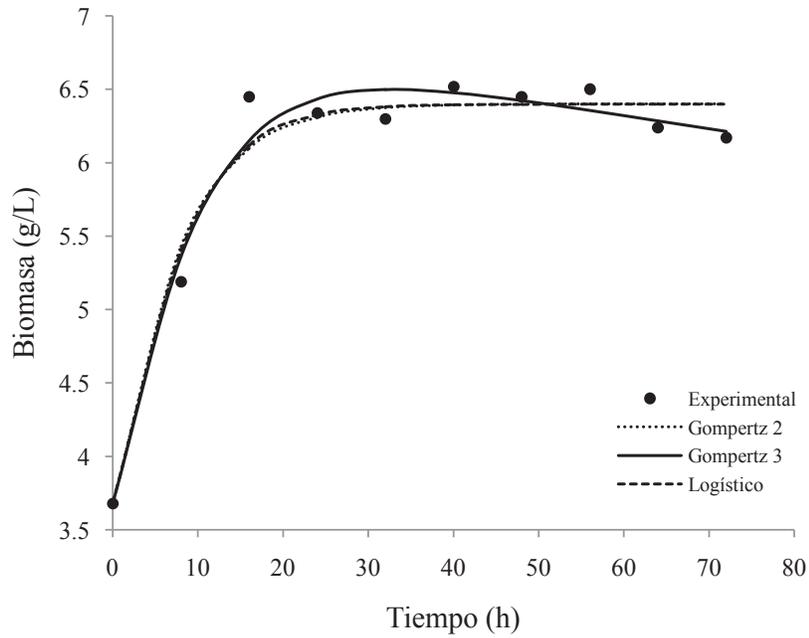


Figura A-9.15. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 2 y Logístico para la biomasa en el experimento 8.

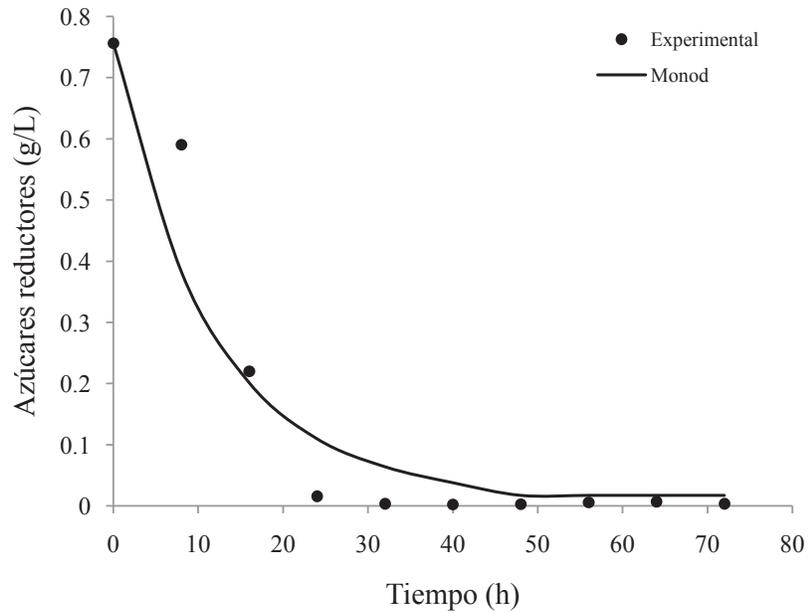


Figura A-9.16. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 8.

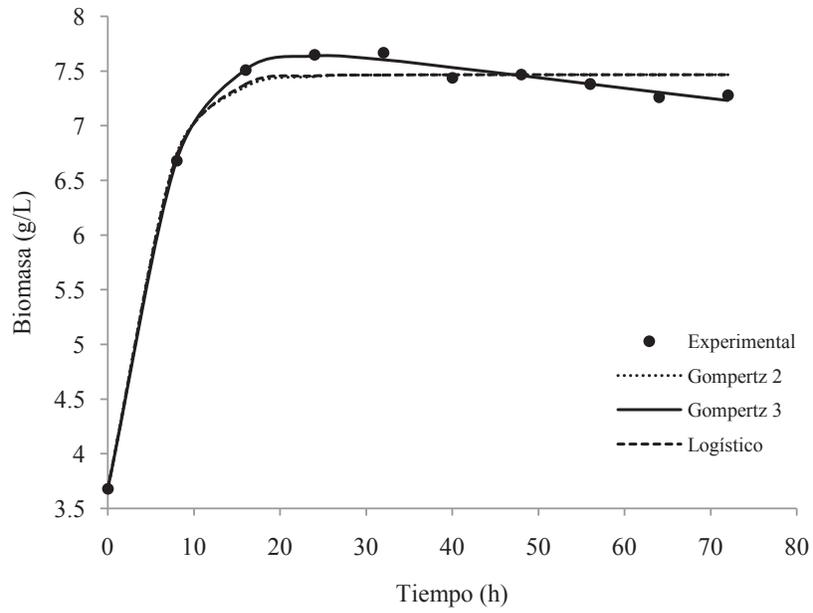


Figura A-9.17. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 9.

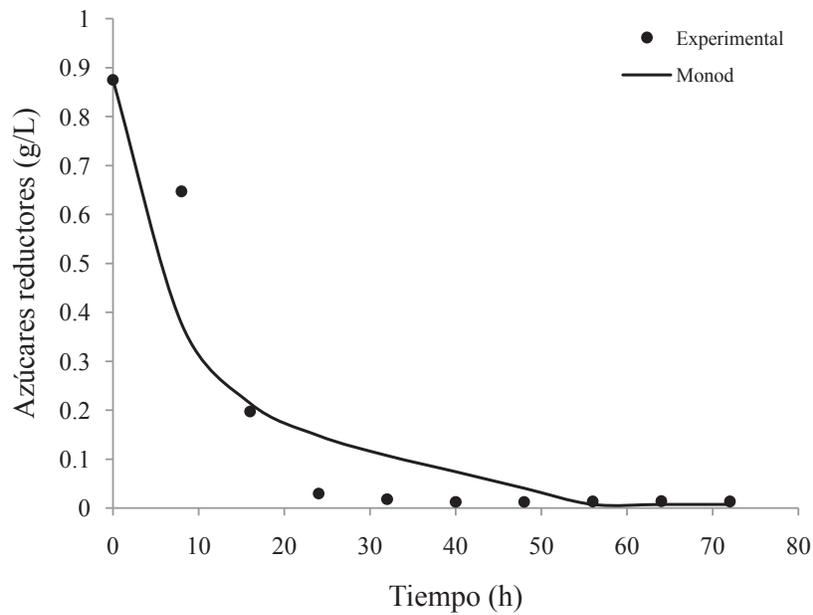


Figura A-9.18. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 9.

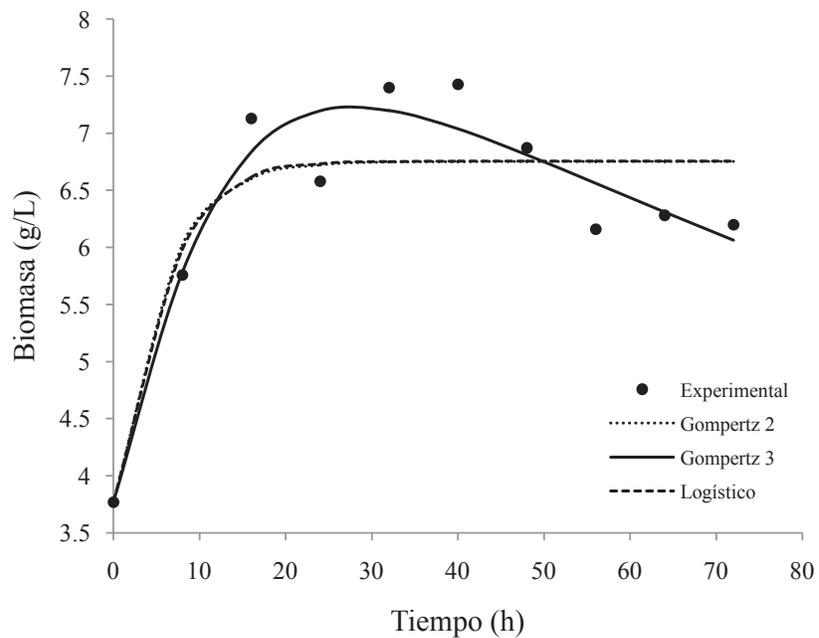


Figura A-9.19. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 10.

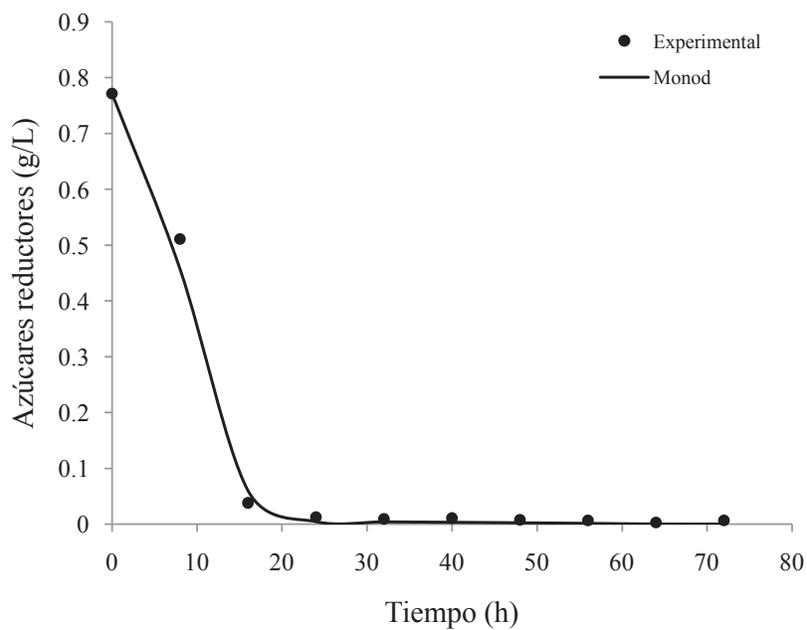


Figura A-9.20. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 10.

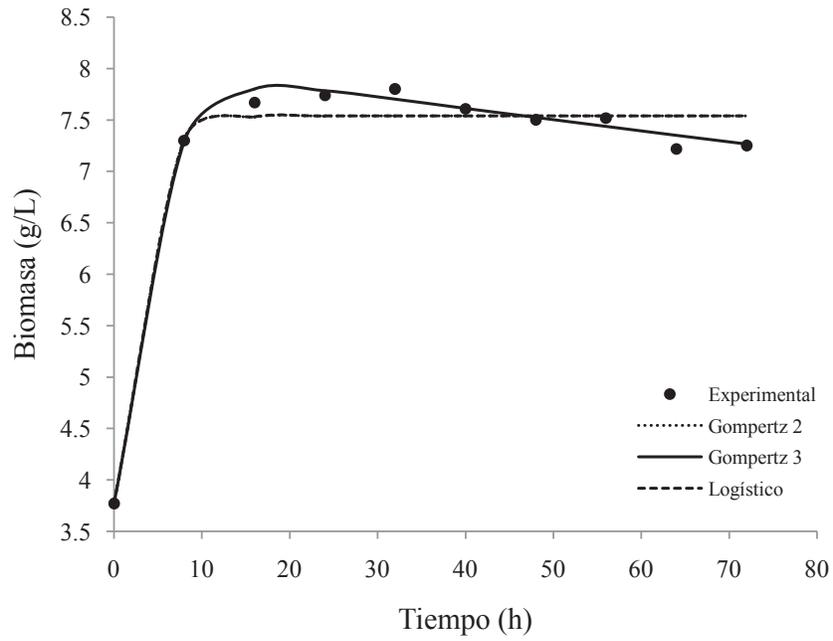


Figura A-9.21. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 11.

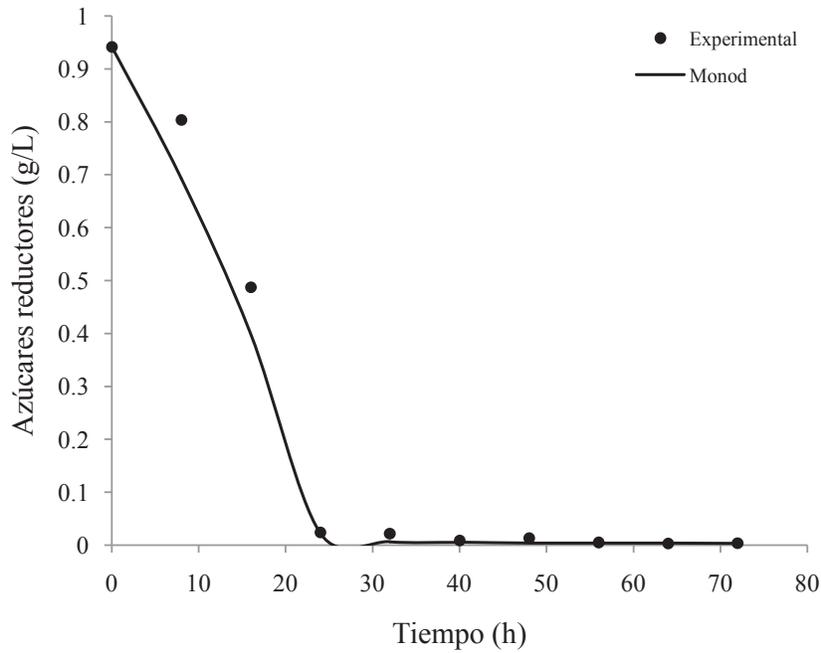


Figura A-9.22. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 11.

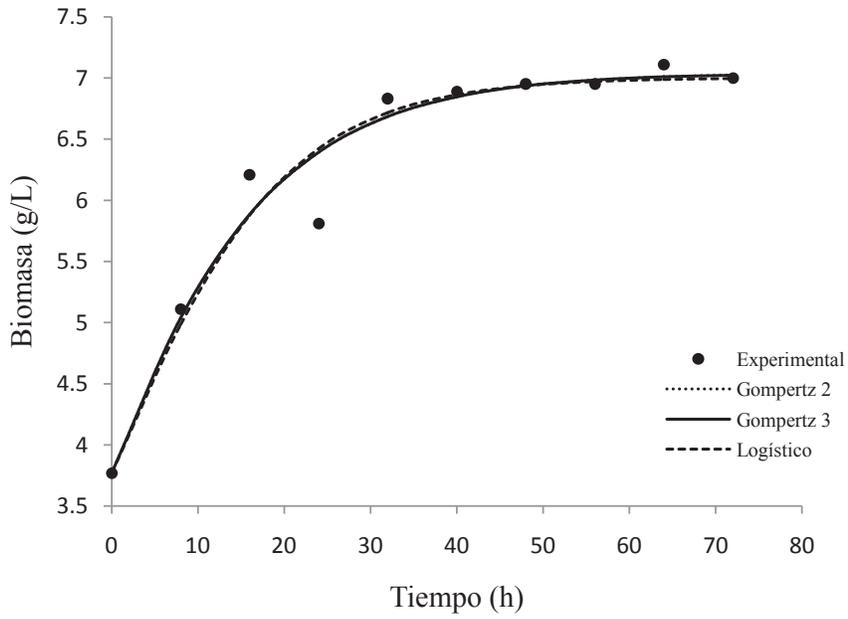


Figura A-9.23. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 12.

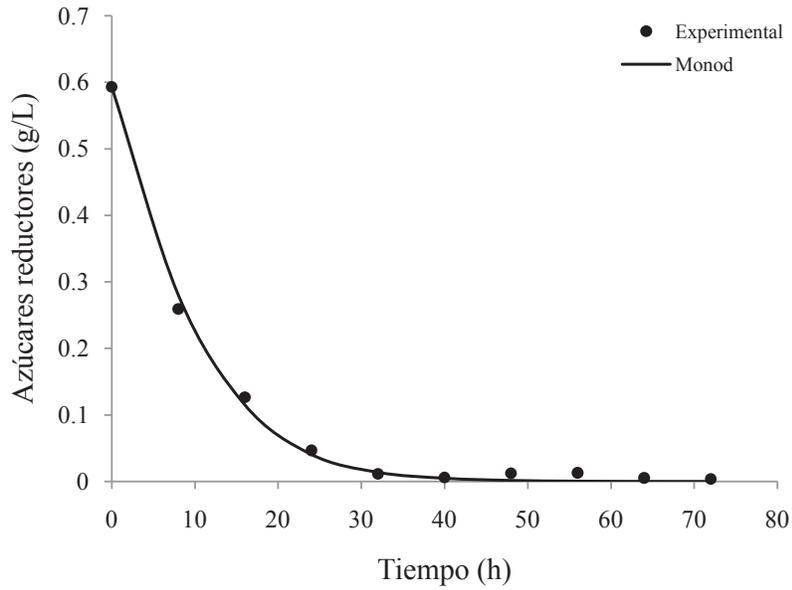


Figura A-9.24. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 12.

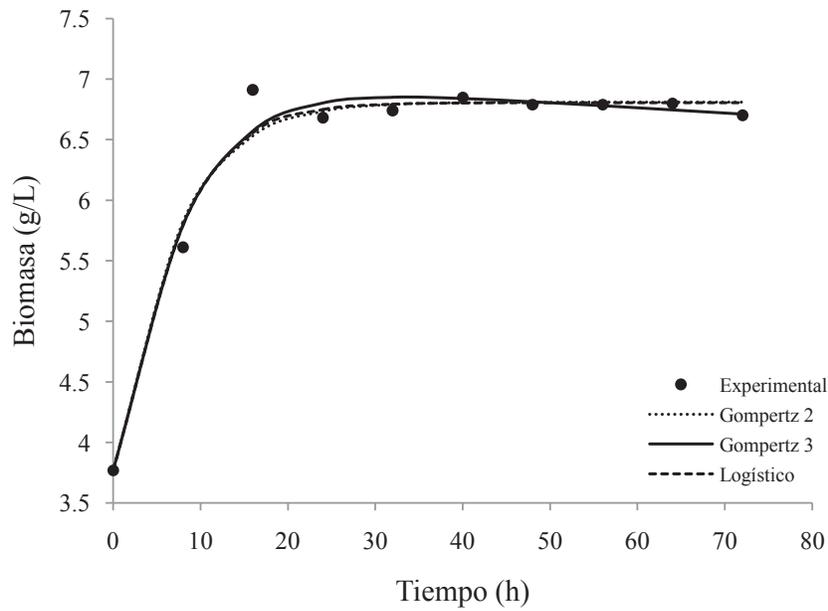


Figura A-9.25. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3 y Logístico para la biomasa en el experimento 13.

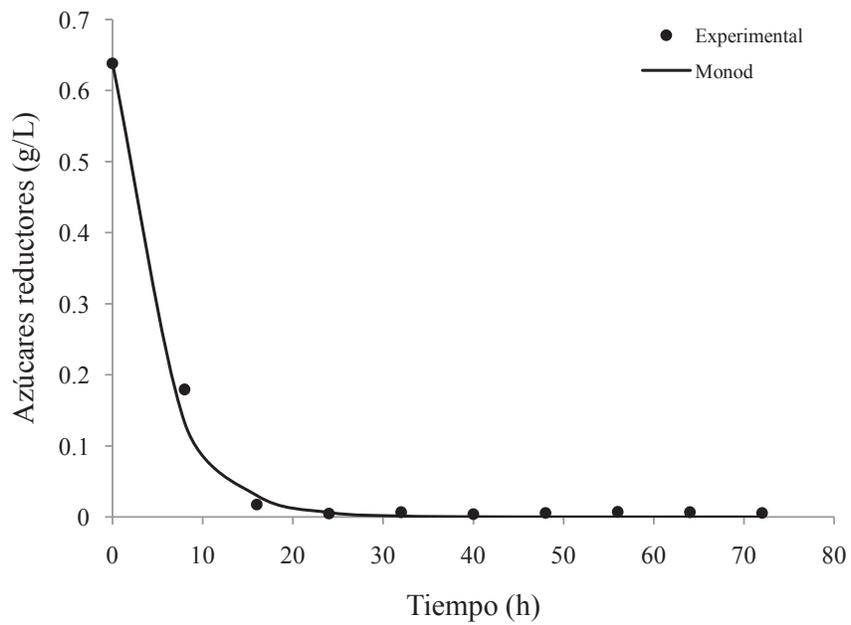


Figura A-9.26. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 13.

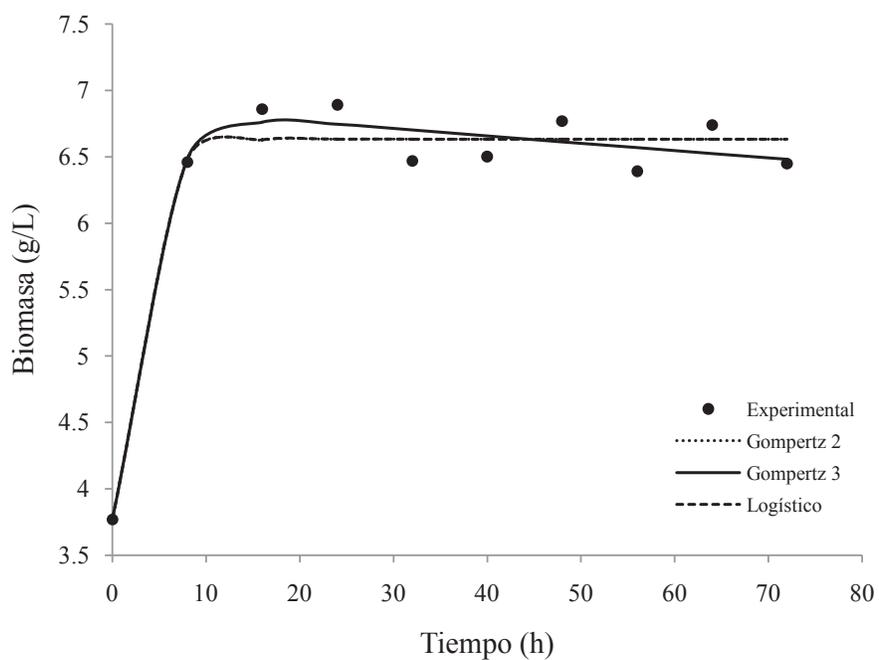


Figura A-9.27. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Gompertz 2, Gompertz 3, y Logístico para la biomasa en el experimento 14.

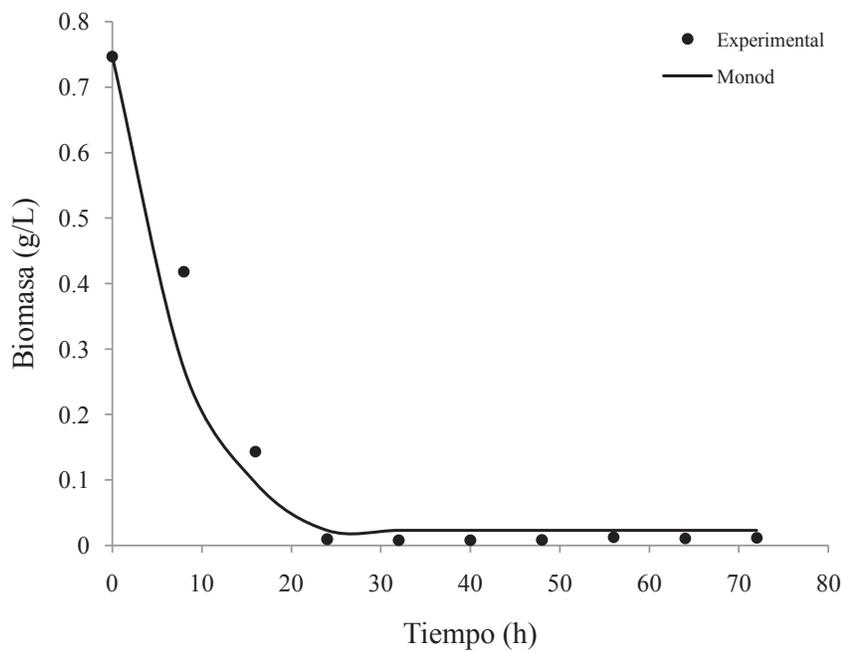


Figura A-9.28. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 14.

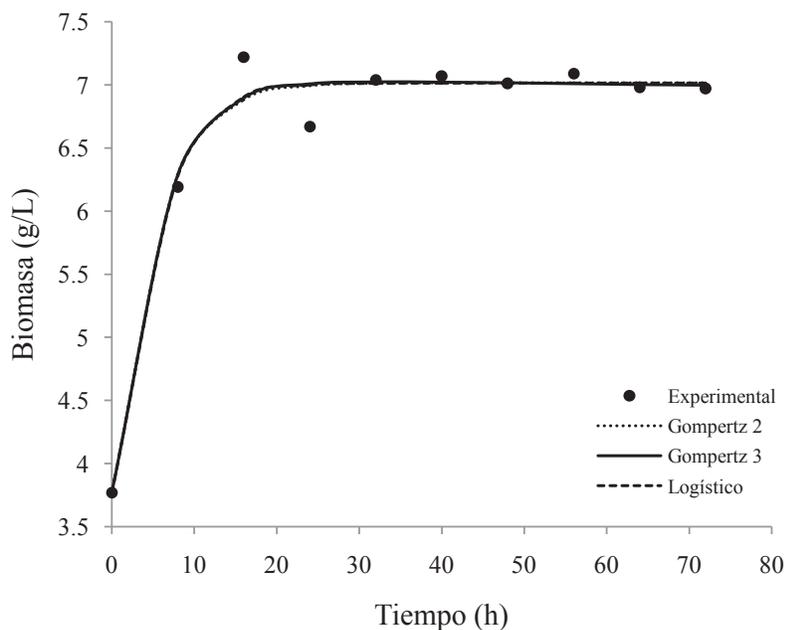


Figura A-9.29. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo Gompertz 2, Gompertz 3, y Logístico para la biomasa en el experimento 15.

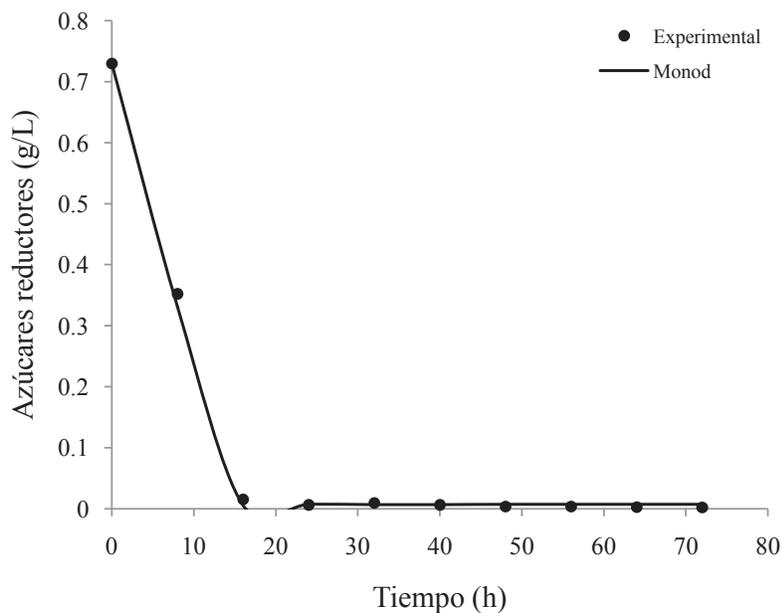


Figura A-9.30. Ajuste de datos experimentales mediante el modelo de Monod, para el sustrato en el experimento 15.