



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA

**“CARACTERIZACIÓN FERMENTATIVA DE LEVADURAS  
PRODUCTORAS DE ETANOL A PARTIR DE *Agave cupreata* EN  
LA ELABORACIÓN DE MEZCAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

PRESENTA:

**IBQ. ELIA PÉREZ HERNÁNDEZ**

ASESOR: D. C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

CO-ASESOR: D. C. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

MORELIA, MICHOACÁN

MARZO, 2012

# CONTENIDO

CONTENIDO .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICES DE TABLAS .....	IV
RESUMEN .....	V
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Marco teórico.....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Mezcals .....	6
1.1.2 Diferencias entre mezcal y tequila.....	7
1.1.3 Tipos de mezcal .....	8
1.1.4 Clasificación del mezcal.....	8
1.1.5 El agave.....	9
1.1.6 Denominación de origen.....	11
1.1.7 Normatividad de la industria del mezcal .....	13
1.1.8 Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal.....	15
1.1.9 Fermentación.....	17
1.1.10 Levaduras.....	21
<b>1.2 Planteamiento del problema.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3 Hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4 Justificación .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5 Objetivos .....</b>	<b>31</b>
1.5.1 Objetivo general .....	31
1.5.2 Objetivos específicos.....	31
<b>CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Cepas utilizadas en la experimentación.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Fuente de sustrato .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3 Análisis de las variables para la producción de etanol a nivel matraz .....</b>	<b>33</b>
<b>2.4 Análisis de las variables para la producción de etanol en biorreactor .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5 Preparación de inóculo .....</b>	<b>34</b>
<b>2.6 Formulación de los medios de cultivo de los diferentes tratamientos.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7 Determinación del crecimiento celular.....</b>	<b>35</b>
<b>2.8 Cuantificación del consumo de sustrato .....</b>	<b>36</b>
<b>2.9 Cuantificación de etanol .....</b>	<b>36</b>
<b>2.10 Determinación de la variación de pH .....</b>	<b>36</b>
<b>2.11 Desarrollo de las fermentaciones en biorreactor .....</b>	<b>37</b>
2.11.1 Operación del biorreactor .....	37
<b>2.12 Destilación de los productos de fermentación.....</b>	<b>38</b>
<b>2.13 Identificación de compuestos volátiles.....</b>	<b>38</b>

<b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Identificación morfológica.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Algunos parámetros cinéticos .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 Especificación de las variables independientes del diseño Box-Behnken, nivel matraz.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4 Especificación de las variables de salida o respuesta. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Análisis del diseño experimental Box-Behnken mediante metodología de superficie de respuesta.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6 Análisis de varianza del diseño Box-Behnken.....</b>	<b>45</b>
<b>3.7 Cinética de ensayo con mayor rendimiento de etanol.....</b>	<b>47</b>
<b>3.8 Consumo de sustrato y variación de pH.....</b>	<b>49</b>
<b>3.9 Especificación de las variables independientes del diseño Factorial (<math>2^2</math>) nivel biorreactor.....</b>	<b>49</b>
<b>3.10 Análisis del diseño experimental Factorial <math>2^2</math>.....</b>	<b>53</b>
<b>3.11 Cinéticas del promedio del diseño factorial <math>2^2</math> con su réplica. ....</b>	<b>57</b>
<b>3.12 Cálculo del Número de Potencia del Biorreactor Applikon para criterio de escalamiento.....</b>	<b>58</b>
<b>3.13 Destilación del producto (mezcal) e identificación de los compuestos volátiles. ....</b>	<b>59</b>
<b>3.14 Cuantificación de metanol y etanol.....</b>	<b>61</b>
3.14.1    Cuantificación de metanol .....	61
3.14.2    Cuantificación de Etanol.....	62
<b>CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Conclusiones .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2 Recomendaciones .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPITULO 5. REFERENCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO A. CÁLCULO DE LA POTENCIA.....</b>	<b>71</b>
Cálculo del número de potencia para 50 rpm (0.8333 rps). ....	72
Cálculo del número de potencia para 100 rpm (1.6666 rps). ....	72
Cálculo del número de potencia para 150 rpm (2.5 rps). ....	73
<b>ANEXO B. TABLA DE FISHER.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO C. PARTICIPACIONES DIVERSAS .....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso artesanal de elaboración de mezcal.....	7
Figura 2.	<i>Agave cupreata</i> , región de Etúcuaro, Michoacán.....	10
Figura 3.	Paisaje del tipo de suelo de la región de Etúcuaro, Michoacán.....	10
Figura 4.	Estados comprendidos por la Denominación de Origen Mezcal. Diario Oficial de la Federación, 1994. 12	
Figura 5.	Bioquímica de la reacción de fermentación.....	17
Figura 6.	Cultivos por estría en placa de levaduras, (a) Cultivo de levadura Lev1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), (b) Cultivo de levadura Lev8 y (c) Cultivo de levadura Lev9 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> , var. <i>Drosophilaram</i> ).....	39
Figura 7.	Micrografía (40 x) de levaduras seleccionadas. a) Lev1, b) Lev8 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> ), c) Lev9.40	
Figura 8.	Micrografía (100 x) de gemación de las levaduras seleccionadas. a) Lev1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), b) y c) Lev8 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> ).....	40
Figura 9.	Diagrama estandarizado de Pareto para (a) Crecimiento celular, (b) Etanol producido.....	43
Figura 10.	Efectos de los factores experimentales determinados para (a) Crecimiento celular y (b) Etanol producido.....	43
Figura 11.	Gráfica de superficie de respuesta para (a) Crecimiento celular y (b) Etanol producido.....	44
Figura 12.	Diagrama de contornos de superficie de respuesta para etanol vs Levadura y sustrato, (MINITAB).....	44
Figura 13.	Diagrama de contornos de superficie de respuesta para etanol vs levadura (A) y Sustrato (C), (MINITAB).....	45
Figura 14.	Diagrama de contornos de superficie de respuesta para etanol vs levadura (A) y temperatura (B), (MINITAB). ....	45
Figura 15.	Cinéticas de comportamiento de levadura Lev8. (a) Crecimiento celular. (b) Consumo de sustrato. (c) Variación de pH. (d) Producción de etanol. ....	48
Figura 16.	Biorreactor conectado a todos los dispositivos de equipamiento.....	51
Figura 17.	Biorreactor en el baño con el termocirculador de inmersión y los sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto.....	51
Figura 18.	Diagrama estandarizado de Pareto para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular. ....	53
Figura 19.	Gráfica de superficie de respuesta para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular.....	54
Figura 20.	Interacción de los factores experimentales para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular.....	55
Figura 21.	Gráficos de efectos principales para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular. ....	56
Figura 22.	Cinéticas de crecimiento celular de la levadura Lev8 vs tiempo. ....	57
Figura 23.	Cinéticas de producción de etanol de la levadura Lev8 contra tiempo. ....	58
Figura 24.	Cromatograma de la muestra de mezcal obtenida. ....	60
Figura 25.	Cromatograma de la muestra de mezcal obtenida y sus tiempos de retención. ....	61
Figura 26.	Cromatografía de la mezcla de los estándares. ....	61
Figura 27.	Curva patrón de las diferentes concentraciones de metanol. ....	62
Figura 28.	Curva patrón para metanol.....	62
Figura 29.	Cromatograma de la curva patrón de Etanol.....	63
Figura 30.	Curva patrón de etanol.....	63

## ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación científica del agave. ....	11
Tabla 2.	Especificaciones físicas y químicas para mezcal tipo I y II. ....	15
Tabla 3.	Cepas utilizadas durante el trabajo experimental. ....	33
Tabla 4.	Morfología colonial de las levaduras seleccionadas. ....	40
Tabla 5.	Parámetros cinéticos de las cepas. ....	40
Tabla 6.	Base del diseño experimental Box-Behnken. ....	41
Tabla 7.	Factores y niveles del diseño experimental Box-Behnken. ....	41
Tabla 8.	Diseño experimental Box-Behnken. ....	42
Tabla 9.	Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para crecimiento celular, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0,05 nivel de significancia. ....	46
Tabla 10.	Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para producción de etanol, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0,05 nivel de significancia. ....	46
Tabla 11.	Parámetros cinéticos obtenidos en el ensayo 9 con la levadura Lev8. ....	48
Tabla 12.	Consumos de sustrato y variaciones de pH de los ensayos del diseño Box Behnken. ....	49
Tabla 13.	Detalles del Biorreactor. ....	50
Tabla 14.	Base del diseño experimental Factorial ( $2^2$ ). ....	52
Tabla 15.	Factores y niveles del diseño experimental Factorial ( $2^2$ ). ....	52
Tabla 16.	Diseño experimental Factorial ( $2^2$ ). ....	52
Tabla 17.	Resultados experimentales de las variables de respuesta del diseño factorial ( $2^2$ ). ....	53
Tabla 18.	Análisis de varianza del modelo del diseño factorial para Etanol, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0,05 nivel de significancia. ....	55
Tabla 19.	Análisis de varianza del modelo del diseño factorial para Crecimiento celular, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0,05 nivel de significancia. ....	55
Tabla 20.	Valores de parámetros para el cálculo del número de potencia y la potencia. ....	59
Tabla 21.	Método de operación del cromatógrafo. ....	59
Tabla 22.	Estándares identificados en la muestra destilada de mezcal y sus puntos de ebullición y retención. ....	61

## RESUMEN

Las Cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales, mostrado distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. En el presente trabajo, se estudió la variación de la concentración de biomasa y producción de etanol nivel matraz y nivel biorreactor (tipo tanque agitado escala laboratorio). Se utilizaron tres cepas de levaduras aisladas de fermentos espontáneos de una región productora de mezcal en el estado de Michoacán. Las experiencias se planificaron mediante la utilización de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) y un diseño factorial  $2^{2^2}$  replicado, con el objetivo de formular un medio de cultivo apropiado para la producción de etanol en la elaboración de mezcal, utilizando como sustrato extracto de *Agave cupreata*. Los resultados experimentales fueron analizados mediante un análisis estadístico (Software STATGRAPHICS Plus) con modelos matemáticos de primer y segundo orden.

Estas técnicas lograron un mejoramiento de la producción de mezcal analizándos de manera simultánea diferentes variables involucradas en la fermentación alcohólica y estableciendo la influencia de cada una de ellas sobre la cantidad de etanol producido. Para evaluar las variables y los niveles de operación lo más semejante al proceso original se seleccionaron como variables de estudio: Tipo de levadura (Lev1, Lev8 y Lev9), sustrato inicial (10-14 °Brix) y Temperatura (25-35 °C). Seleccionadas las variables y los niveles de operación se realizó un diseño Box-Behnken a nivel matraz. Para evaluar las variables y los niveles de operación a nivel biorreactor con el objetivo de optimizar los medios de cultivo para fines industriales, se tomaron como factores experimentales la aireación (0.1-1 vvm) y agitación (50-150 rpm). Para ello se empleó un esquema experimental Factorial ( $2^{2^2}$ ). Se mantuvieron constantes la concentración inicial del inóculo, el volumen del medio de cultivo y el pH inicial de 5. Los niveles de operación se establecieron de acuerdo a estudios previos. Durante cada ensayo experimental se evaluaron variables de respuesta como el crecimiento celular por conteo en cámara Neubauer; el consumo de sustrato mediante la técnica DNS (con ácido 3,5-dinitrosalicílico); la cuantificación de etanol mediante método enzimático (Procedimiento de ensayo K-ETOH, Megazyme) y el monitoreo de pH con ayuda de un potenciómetro. Finalmente se destiló el producto mediante un rotavapor y se

realizó la identificación de los compuestos volátiles así como la cuantificación de metanol y etanol por cromatografía de gases.

Los valores de biomasa y etanol obtenidos estuvieron relacionados con el tipo de levadura, las concentraciones iniciales de sustrato, la temperatura, la velocidad de agitación y aireación empleada, determinándose que los mejores rendimientos de etanol ocurrieron con la levadura Lev8 siendo de aproximadamente 12.46 % v/v, concentraciones de sustrato de 12 °Brix y a una temperatura de 28 °C, agitación de 150 rpm y con una aireación de 0.1 vvm.

El mezcal destilado presento una concentración de metanol de 1.89 % y 47.75 % de Etanol determinados mediante cromatografía de gases.

**Palabras clave:** *Diseño experimental, Metodología de superficie de respuesta, Fermentación, Cinética, Etanol.*

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

A través de los años, los microorganismos se han utilizado en muchos procesos de fermentación para elaborar una amplia variedad de productos incluyendo enzimas, alimentos, bebidas, fármacos, combustibles, fertilizantes, entre otros (Moo-Young y Chisti, 1994).

Los biotecnólogos (y en particular los bioingenieros) han hecho posible hacer crecer a los microbios en recipientes en donde es posible proporcionarles todo lo que necesitan, o bien darles sólo los nutrientes necesarios (o no darles otros) de tal manera que produzcan lo que nosotros queremos que produzcan (y casi siempre en cantidades y velocidades que son mucho más grandes que las que ocurren en la naturaleza). Una regla básica de la tecnología de fermentaciones indica que si uno cuida a sus microbios (procurándoles su ambiente óptimo), ellos cuidaran de uno (produciéndoles compuestos o biomasa de utilidad para los humanos). Cuando las células microbianas son muy pequeñas (como en el caso de las bacterias y las levaduras), su tamaño no causa problemas para dispersarse o para homogenizar el sistema y proveer oxígeno suficiente al cultivo (Galindo y *col.*, 2008).

A nivel de investigación, el fermentador más empleado, tanto en la academia como en la industria, es el matraz. Se usa ampliamente para la evaluación y desarrollo de diversos cultivos celulares. Una ventaja de los matraces agitados, es que se pueden llevar a cabo un gran número de experimentos para establecer el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento y rendimiento de los microorganismos. Por su parte, los fermentadores industriales o escala laboratorio presentan un alto grado de equipamiento, incluyendo sistemas de agitación y dispersión de aire para garantizar una buena oxigenación del medio y un eficiente mezclado, así como sensores para conocer el cambio de las variables del cultivo tales como: la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la concentración celular, entre otros (Galindo y *col.*, 2008).

La aireación y el mezclado son las operaciones más importantes que se busca satisfacer en el fermentador pues una proporciona oxígeno al cultivo (en procesos aerobios) y el otro mantiene cierta homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos.

Las células dentro de un biorreactor pueden tener diferentes comportamientos, tanto en su morfología como en su fisiología, dependiendo de las condiciones hidrodinámicas en las cuales se cultiven (Galindo y *col.*, 2008).

Un biorreactor es un recipiente en donde se promueve el crecimiento de organismos para la síntesis de diversos productos biotecnológicos. La función principal de un fermentador es la de proveer un ambiente controlado para alcanzar el crecimiento y la formación óptima de productos, o ambos. Además el fermentador tiene como objetivo garantizar una condición estéril, que permita únicamente el cultivo de la especie biológica de interés (Galindo y *col.*, 2008).

El fermentador tiene tres objetivos primordiales: a) mantener la esterilidad (que permite el cultivo exclusivo de la especie biológica de interés), b) proporcionar oxígeno a las células que se están cultivando en suspensión y c) mantener las condiciones ambientales básicas (como temperatura, oxígeno disuelto y pH) homogéneas que permitan el óptimo desarrollo del cultivo y en los niveles que sean óptimos para la producción del metabolito de interés.

Para lograr esto, un fermentador típico tiene, en primer lugar, que dispersar un gas (aire, que contiene oxígeno) en un líquido (normalmente agua, en la que se disuelven otros nutrientes esenciales, como azúcares y proteínas). Esto se logra burbujeando aire (que ha sido previamente filtrado para evitar introducir contaminaciones al cultivo) dentro del tanque fermentador y dispersando el gas dentro del medio acuoso, mediante el uso de impulsores que rompen las burbujas de gas (que se está inyectando al tanque) en burbujas lo más pequeñas posibles. Lo anterior tiene el propósito de maximizar el área superficial que el gas tiene en contacto con el líquido (para una misma cantidad total de gas, un conjunto de burbujas pequeñas tienen mucho más área que una burbuja grande) (Galindo y *col.*, 2008).

Todo organismo vivo colocado fuera de su hábitat natural experimenta condiciones ambientales que limitan su crecimiento. Durante el cultivo de células en biorreactores se producen cambios en el medio ambiente en cuanto a la temperatura, daños mecánicos debidos a la agitación, pH, concentración de oxígeno y nutrientes. Todos estos cambios dentro del biorreactor “estresan” a las células que necesitan adaptarse a dichos cambios para poder reproducirse. De maneja general se puede decir que todo factor que influye negativamente en la capacidad de reproducción de las células puede considerarse como estrés. Cuando la concentración de alguno o varios nutrientes disminuye de tal forma que la velocidad de reproducción de las células también disminuye, hablamos de un estrés de tipo nutricional. Dependiendo de la magnitud y la duración del estrés, éste puede considerarse como subletal, cuando las células son capaces de reproducirse, aunque a una velocidad, o letal, cuando el daño es tan importante que las células mueren. Así los factores de estrés son herramientas muy importantes para el bioingeniero ya que le permiten controlar tanto el crecimiento como la producción de metabolitos secundarios y, en consecuencia, la productividad de los cultivos de los microorganismos. Cuando se agita mecánicamente, los microorganismos pueden sufrir ruptura celular si la energía introducida por la agitación es mayor que la resistencia de sus membranas. A este tipo de estrés se le conoce hidrodinámico (es decir la velocidad y la dirección con que el medio de cultivo es mezclado) (Galindo y *col.*, 2008).

Las levaduras son microorganismos más complejos y de tamaño más grande que las bacterias (miden alrededor de 10 micras). Son los microorganismos que la humanidad ha usado desde tiempos inmemoriales para producir cerveza, vino y pan. El concepto “fermentación” fue acuñado por Pasteur para describir el desarrollo y actividad de microorganismos bajo condiciones anaerobias, como es el caso de la producción de alcohol. Sin embargo, actualmente el término “fermentación” tiene un significado más amplio y se refiere a las técnicas de cultivo de microorganismos que se encuentran en una solución acuosa y bajo condiciones controladas. En consecuencia, un “fermentador” es un recipiente en donde se promueve el crecimiento de células u organismos con el fin de obtener un producto específico, el cual puede ser el organismo o célula misma, o bien alguna sustancia producida por ellos. Dispersar y mezclar el aire eficientemente en

fermentadores de gran tamaño (de hasta centenas de metros cúbicos) es sin duda uno de los logros más extraordinarios que los ingenieros han aportado a la biotecnología en general y a la tecnología de fermentaciones en particular.

El agua es el componente mayoritario de los caldos de cultivo en los procesos de fermentación y el oxígeno es un gas muy poco soluble en agua. A 25 °C es posible disolver sólo alrededor de 8 mg de oxígeno en un litro de agua. Por ello, es necesario suministrar continuamente este gas al cultivo, lo que se hace burbujeando aire (que contiene 21 % de oxígeno) dentro del fermentador y dispersando el gas lo más exhaustivamente posible. Ello tiene el objeto de generar burbujas pequeñas (que tienen una elevada área superficial por unidad de volumen) y en consecuencia maximizan el área de la interface (esto es de contacto) gas-líquido, disponible para la transferencia del oxígeno (gaseoso) al medio de cultivo (como oxígeno disuelto). Para generar estas burbujas pequeñas se emplean agitadores mecánicos que rompen las burbujas (relativamente grandes) que se generan en la entrada del suministro del gas al fermentador. Además de dispersar finamente el gas, los elementos mecánicos (llamados impulsores) tienen el propósito de recircular y lograr la mayor homogeneidad posible de las burbujas de aire (y de la concentración de oxígeno disuelto y de otros nutrientes) dentro del tanque (Galindo, 2008).

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico muy complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. Entre todos ellos, las levaduras son los microorganismos clave en la vinificación, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en vino (Torija, 2002).

Es importante el estudio de las fermentaciones espontáneas ya que es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una región. Estas fermentaciones son aquéllas que se producen de forma natural, es decir, las realizan las levaduras provenientes de la planta (agave) y del material de la bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a

lo largo de la fermentación (Kunkee y Amerine, 1970; Ribéreau y col., 1975; Lafon, 1983; Zambonelli, 1988).

Así en los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios son *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia* (Querol y col., 1990; Longo y col., 1991; Fleet y Heard, 1993; Schutz y Gafner, 1994). Después de estos 2 ó 3 primeros días, estos géneros reducen su número, dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como son las *Saccharomyces*. De hecho es considerada la principal especie responsable de las fermentaciones alcohólicas (Ribéreau, 1985).

Algunos estudios realizados han demostrado que algunas especies de no-*Saccharomyces* también contribuyen durante la fermentación, presentando crecimientos significativos que influyen en la composición organoléptica de las bebidas alcohólicas como el mezcal. La diversidad, composición y evolución de la microbiota de levaduras presentes en el mosto depende de varios factores como son la localización geográfica, las condiciones climáticas, así como la variedad y madurez del agave.

Mediante la utilización de diseños experimentales utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) y diseños factoriales, es posible la formulación de un medio de cultivo apropiado para maximizar la producción de etanol en la elaboración de mezcal, con los objetivos de diseñar medios de cultivo para optimizar las variables que maximicen la obtención de etanol en la producción de esta bebida, utilizando levaduras aisladas de fermentos mezcaleros espontáneos y como sustrato jugo de *Agave cupreata*. Así como caracterizar fermentativamente las levaduras aisladas de los fermentos mezcaleros; establecer las condiciones ideales para su máxima producción de etanol y crecimiento celular a nivel matraz e identificar los compuestos volátiles presentes en el producto final.

La mejora de los medios de cultivo con fines industriales, en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo sino también en las condiciones de operación. De

cualquier manera es probable que el medio de cultivo original pueda ser optimizado, modificando el porcentaje de los componentes del medio y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original, para lo cual se requiere del uso de varios métodos de optimización como la utilización de la metodología de superficie de respuesta, escalamiento ascendente (ó descendente), análisis canónico y análisis de cordillera.

## **1.1 MARCO TEÓRICO**

### **1.1.1 MEZCAL**

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México obtenida por destilación y rectificación de los 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, siendo susceptible de ser enriquecido, con hasta 20% de otros carbohidratos permitidos por la Secretaria de Salud en la preparación de dichos mostos, pero sin eliminar los componentes que dan las características a este producto (NOM-070-SCFI-1994).



**Figura 1.** Proceso artesanal de elaboración de mezcal.

Es un líquido incoloro en su estado original aunque puede tomar coloración por procesos de añejamiento, si se hace en barricas de madera. El proceso comienza con la cosecha del agave después de ocho años de cultivo, obteniéndose las piñas maduras del agave, las cuales son cocidas en hornos subterráneos, en esta etapa los polisacáridos, principalmente los de reserva (fructanos), son hidrolizados térmicamente para obtener un jarabe rico en fructosa más susceptible a la actividad de los microorganismos, posteriormente se somete a fermentación alcohólica con levaduras nativas o cepas seleccionadas, finalmente el mosto con un contenido de etanol de 3-6 % v/v aproximadamente se destila para obtener el mezcal blanco o joven (Molina y col., 2007).

### 1.1.2 DIFERENCIAS ENTRE MEZCAL Y TEQUILA

El tequila solamente se produce a partir de la especie *Agave tequilana* (NOM-006-SCFI-1994), mientras que en el caso del mezcal, la Norma Oficial Mexicana indica que se puede emplear en su elaboración una amplia variedad de agaves, siendo los más utilizados: *Agave angustifolia*, *Agave esperrima*, *Agave potatorum* y *Agave salmiana*. Otra diferencia importante entre el mezcal y el tequila es su procesamiento, en el primero, generalmente es

un proceso artesanal, en cambio en el tequila se tiene un proceso tecnificado. También es importante aclarar que las zonas geográficas que cuentan con Denominación de Origen para el mezcal están bastante dispersas en el territorio mexicano, mientras que en el caso del tequila es una región ampliamente reducida, lo que agrega un factor de variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región (Molina y col., 2007).

### **1.1.3 TIPOS DE MEZCAL**

Los tipos de mezcal de acuerdo al porcentaje de carbohidratos provenientes del agave utilizados en la elaboración del mezcal son:

*Tipo 1. Mezcal 100% Agave:* Producto obtenido de la destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los 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 (Sistema producto maguey – mezcal, 2004).

*Tipo 2. Mezcal:* Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de los mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes. Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado (Sistema producto maguey – mezcal, 2004).

### **1.1.4 CLASIFICACIÓN DEL MEZCAL**

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el mezcal se clasifica en 3 categorías:

1. Mezcal añejo o añejado.
2. Mezcal joven.
3. Mezcal reposado (NOM-070-SCFI, 1994).

#### **1.1.4.1 Mezcal añejo o añejado**

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año, en recipientes de madera de roble blanco o encino, cada una con capacidad máxima de 200 litros. En mezclas de diferentes mezcales añejos, la edad para el mezcal resultante es el

promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes (NOM-070-SCFI, 1994).

#### **1.1.4.2 Mezcal joven**

Producto obtenido directa y originalmente con los azúcares extraídos de los agaves, susceptible de ser de ser abocado \*, para el caso del mezcal tipo II hasta con 20% de otros azúcares (NOM-070-SCFI, 1994).

#### **1.1.4.3 Mezcal reposado**

Producto susceptible de ser abocado\* que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino, para su estabilización (NOM-070-SCFI, 1994).

\*Abocado: Procedimiento para suavizar el sabor del mezcal, mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes.

### **1.1.5 EL AGAVE.**

El *Agave* es una planta de la familia de las Agaváceas, de hojas largas y fibrosas de forma lanceolada, de color verde o azuladas cuya parte aprovechable para la elaboración de mezcal es la piña o cabeza (tallo y base de sus hojas) (Durán y Pulido, 2007).

México es el centro de origen de la familia de las Agavaceas, a la cual pertenece el maguey y que incluye 288 especies, 166 de las cuales son magueyes, agrupados en el género *Agave*. En el país se han encontrado 125 especies de agaves, lo que representa el 75% del total mundial (Cervantes, 2000).



**Figura 2.** *Agave cupreata*, región de Etúcuaro, Michoacán.

Se puede decir que los agaves o magueyes se encuentran asociados con todo tipo de paisaje, aunque muestran preferencia por los matorrales xerófilos del Altiplano, tanto en el desierto Sonorense, como en el Chihuahuense y en las zonas semiáridas del sur de México, también se les encuentra en los bosques templados de los diversos sistemas montañosos del país (Fig. 2). Los estados más ricos en diversidad de especies son: Oaxaca, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Jalisco. La amplitud de su rango ecológico le permite desarrollarse desde el nivel del mar en las dunas costeras, hasta los bosques mesófilos localizados a 3 300 msnm. Su nivel óptimo está entre 800 y 2500 msnm. Se les observa con frecuencia en sitios soleados, pedregosos; crecen en sitios planos y en barrancas, siempre que tengan buen drenaje (Fig. 3).



**Figura 3.** Paisaje del tipo de suelo de la región de Etúcuaro, Michoacán.

### 1.1.5.1 Diversidad de usos del agave.

Los usos de los magueyes como recurso natural económicamente redituables de zonas áridas y semiáridas hoy en día pueden reducirse a tres, que en orden de importancia son:

1. Como productores de bebidas destiladas: tequila y mezcal, principalmente.
2. Como productores de bebidas fermentadas: magueyes pulqueros.
3. Como productores de fibras: henequén y lechuguilla.

Sus usos y aprovechamientos han tenido variaciones a través del tiempo, sin embargo, sus propiedades y atributos, algunos de ellos mitificados, han trascendido de tal modo que en la actualidad, los agaves constituyen el primer eslabón de las cadenas productivas Agave-Tequila y Agave-Mezcal, consideradas como dos de las actividades económicas generadoras de empleo y de las más rentables por los ingresos que generan al país, dentro del rubro de las agroindustrias (Gallardo y col., 2008).

### 1.1.5.2 Caracteres generales del género *Agave*.

En la tabla 1 se muestra la clasificación científica del agave.

**Tabla 1.** Clasificación científica del agave.

Reino	Plantas ( <i>Plantae</i> )
Filum	Espermatofitas ( <i>Spermatophyta</i> )
Clase	Monocotiledóneas ( <i>Monocotyledoneae</i> )
Orden	Liliales ( <i>Liliales</i> )
Familia	Agaváceas ( <i>Agavaceae</i> )
Género	<i>Agave</i>
Especie	spp.(diversas especies)
Nombre	<i>Agave spp.</i>

(Cervantes, 2000).

### 1.1.6 DENOMINACIÓN DE ORIGEN.

México tiene la denominación de origen del mezcal, lo cual protege la propiedad intelectual de los productores de los estados considerados en esta denominación. Además, existe una norma oficial mexicana (NOM-070-SCFI-94) que regula la producción y distribución de

esta bebida, sin embargo las leyes mexicanas dificultan enormemente la comercialización del mezcal. Existe además un Consejo Regulator de esta bebida (COMERCAM), como parte de la estructura de la Denominación de Origen, y se están proponiendo múltiples acciones de control y verificación a lo largo de la cadena de producción, que, de implementarse, harán muy difícil la sobrevivencia de las pequeñas fábricas artesanales a favor de las fábricas más industrializadas (UNEP, WCMC, 2002).

#### 1.1.6.1 Estados comprendidos en la denominación de origen.

El 28 de noviembre de 1994 se declaró la denominación de origen del mezcal, esta protege a los productores de bebidas elaboradas mediante la destilación de magueyes de las especies mencionadas en la norma (NOM-070-SCFI-94) para el Mezcal, cinco especies de *Agave*, indicando que también puede usarse otras especies, siempre y cuando no se encuentren incluidas en otra denominación de origen. En cuanto al área, originalmente abarcaba a los municipios de los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango (Fig. 4). En 2001 se incorporaron algunos municipios de Guanajuato y en 2003 otros más de Tamaulipas (Illsley, 2008). En febrero de 2012 se incorporó en esta declaratoria a Michoacán.



**Figura 4.** Estados comprendidos por la Denominación de Origen Mezcal. Diario Oficial de la Federación, 1994.

### **1.1.6.2 Denominación de origen en Michoacán.**

El Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó la denominación de origen al destilado de agave el 2 de febrero del 2012, a fin de que los mezcaleros michoacanos pudieran comercializar su destilado bajo el nombre de Mezcal, la gestión de tal denominación tardó 10 años.

Los municipios del estado incluidos en la denominación son: Acuitzio, Aguililla, Ario, Buenavista, Charo, Chinicuila, Coalcomán de Vázquez Pallares, Cojumatlán de Régules, Cotija, Erongarícuaro, Hidalgo, Indaparapeo, Jiquilpan, La Huacana, Los Reyes, Madero, Marcos Castellanos, Morelia, Queréndaro, Sahuayo, Salvador Escalante, Tacámbaro, Tancítaro, Tarímbaro, Tepalcatepec, Turicato, Tzitzio, Venustiano Carranza y Vista Hermosa, son los municipios que cubre la declaratoria (QUADRATIN, 2012).

Aún falta la publicación de la declaratoria en el diario oficial de la federación, para que entre en vigor de inmediato. Se considera que la Unión de Mezcaleros de Michoacán está a la altura, y que cuenta tanto con los recursos naturales y humanos para que sea elaborada esta bebida en el estado.

### **1.1.7 NORMATIVIDAD DE LA INDUSTRIA DEL MEZCAL**

La producción de mezcal constituye el eslabón final de la cadena productiva Agave-Mezcal, representa una fuente de ingresos complementaria para muchas familias del ámbito rural, principalmente en los municipios reconocidos con tradición mezcalera dentro del estado (Gallardo y *col.*, 2008).

Esta bebida es regulada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-94) que 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 NOM establece las características y especificaciones que deben cumplir los usuarios autorizados para producir y/o comercializar la bebida alcohólica destilada denominada mezcal. El objetivo de la norma es establecer las especificaciones y características a cumplir por los usuarios autorizados para producir y/o comercializar el mezcal. La NOM se apega a las formas

tradicionales del proceso de producción del mezcal, incidiendo en el control de la calidad, higiene y legitimidad del producto; en ella se señalan los requisitos a la producción de mezcal.

Esta NOM se aplica a la bebida alcohólica elaborada con agaves de las siguientes especies:

1. *Agave Angustifolia Haw* (maguey espadín);
2. *Agave Esperrima jacobi*, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo);
3. *Agave Weberi cela*, Amarilidáceas (maguey de mezcal);
4. *Agave Patatorum zucc*, Amarilidáceas (maguey de mezcal);
5. *Agave Salmiana Otto Ex Salm SSP Crassispina (Trel) Gentry* (maguey verde o mezcalero);
6. Otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado. Cultivados en las Entidades Federativas, Municipios y Regiones que señala la Declaración General de Protección a la denominación de origen “mezcal”, en vigor.

Para la comprobación de las especificaciones establecidas en la presente NOM, se aplican la Norma Oficial Mexicana y Normas Mexicanas vigentes que se mencionan a continuación:

1. **NOM-030-SCFI:** Información comercial de cantidad en la etiqueta - Especificaciones.
2. **NMX-V-013:** Bebidas alcohólicas determinación de por ciento de alcohol en volumen (% Vol.) a 20°C.
3. **NMX-V-014-S:** Bebidas alcohólicas destiladas - Determinación de alcoholes superiores (aceite de fusel).
4. **NMX-V-017:** Método de prueba para la determinación de extracto seco y cenizas en bebidas alcohólicas destiladas.
5. **NMX-V-021:** Métodos de prueba para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas.
6. **NMX-Z-012:** Muestreo para la inspección por atributos. (NOM-070-SCFI-94).

7. Especificaciones: El producto objeto de esta NOM en sus tipos I y II deberá cumplir con las siguientes especificaciones físicas y químicas:

**Tabla 2.** Especificaciones físicas y químicas para mezcal tipo I y II.

<i>Especificaciones</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
% de alcohol en volumen a 20°	36.0	55.0
Extracto seco g/L	0.2	10.0
Acidez total (como ácido acético) g/100ml	..... 100.0	170.0 400.0
Alcoholes superiores mg/100ml	100.0	300.0
Metanol mg/100ml		

(NOM-070-SCFI-94).

La NOM-070-SCFI-94, permite la utilización de levaduras cultivadas o no, sin embargo, éstas prácticamente no son utilizadas por los productores, quienes suelen usar el Sulfato de Amonio (20.5 -00- 00), y la Urea (46-00-00), ambos de uso agrícola, como fuentes de Nitrógeno que adicionalmente contienen diversos iones metálicos (Cu, Fe, Zn, Mg, Al, S) no indicados para el consumo humano. Cabe señalar que es frecuente que los productores se excedan en su uso, con la intención de acortar el tiempo de la fermentación a 24 hrs. aplicando hasta 2 Kg. de Sulfato de Amonio a una tina de 1,500 litros., cuando lo normal sería aplicar de ½ a 1 Kg por tina, con lo que la fermentación requeriría de 4 a 5 días; en tanto que la fermentación natural puede requerir, según la temperatura ambiental, de hasta 15 días (Sistema producto maguey–mezcal, 2004).

### **1.1.8 CONSEJO MEXICANO REGULADOR DE LA CALIDAD DEL MEZCAL.**

El COMERCAM se constituyó el 12 de Diciembre de 1997; posteriormente, en mayo del 2000 fue reestructurado, y el 9 de Octubre de 2003 aparece el aviso en el D.O.F. donde se aprueba al organismo verificador y certificador del mezcal, que señala que la NOM se aplicara al 100% a partir del 10 de octubre del 2004. Se trata de un organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte, no lucrativo, de iniciativa privada, autónomo conformado por todos los que intervienen en la cadena productiva: productores de maguey, productores de mezcal, envasadores y comercializadores de mezcal de las entidades federativas comprendidas en la NOM-070-SCFI-1994 y en área protegida por la

denominación de origen “Mezcal”, así como aquellos relacionados directamente que operan fuera de la misma (SAGARPA, 2004).

Entre las funciones más importantes del COMERCAM se tienen:

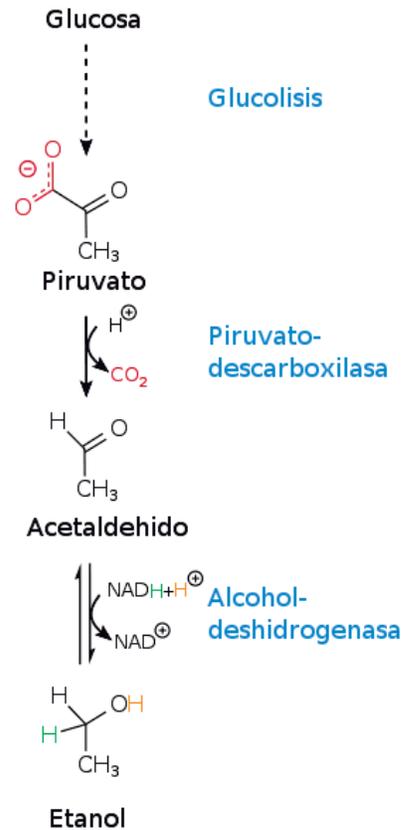
1. Vigilar y promover el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-94).
2. Llevar un registro del inventario del maguey, de la producción de mezcal, de los movimientos e inventarios en bodegas de almacenamiento, reposo y añejamiento del mezcal tanto en las mezcaleras como en las envasadoras.
3. Reglamentar las operaciones comerciales del agave; supervisar las condiciones de higiene y del proceso en las mezcaleras y verificar la procedencia del mezcal en el proceso de envasado.
4. La contratación de servicios para la certificación, unidades de verificación y laboratorios de prueba acreditados.
5. Empezar diversas actividades orientadas a proteger, promover, mejorar y desarrollar la industria del mezcal en el ámbito legal, técnico y comercial.
6. Concertar con instituciones de investigación y apoyo, públicas y privadas, convenios de colaboración orientadas al mejoramiento del rendimiento y calidad del proceso de producción del mezcal (SAGARPA, 2004).

Según la opinión de diversos productores, el inicio de actividades del COMERCAM se da un contexto poco propicio, ya que la crisis que está viviendo el sistema-producto está afectando fuertemente al productor, quien ante la falta de información muestra una actitud poco favorable a aceptar en su persona el control del consejo y por los gastos adicionales que ello le representa, frente a las dificultades que tienen para desplazar su producción; esto obliga necesariamente a un cambio de estrategia que permita la consolidación del organismo, sin tener que recurrir a medidas coercitivas (presencia de PROFECO o de la S.H.C.P.) sino alentando la incorporación, flexibilizando la aplicación de la normatividad sin romperla o trasgredirla, esto es, “poniéndose la camiseta” de los productores, ya que al final de cuentas el Consejo es de ellos (Sistema producto maguey–mezcal, 2004).

### 1.1.9 FERMENTACIÓN.

La fermentación es un proceso biológico en plena ausencia de oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales:

- Un alcohol en forma de etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ).
- Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas.
- Unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.



**Figura 5.** Bioquímica de la reacción de fermentación.

En la fermentación los azúcares contenidos en las piñas se transforman en etanol por medio de la fermentación alcohólica, ruta metabólica propia de las levaduras (Fig. 6).

### **1.1.9.1 Fermentación a escala industrial**

A través del tiempo se han introducido modelos de fermentación tales como los sistemas discontinuos y sistemas continuos.

La mayoría de las fermentaciones son procesos discontinuos, cuya cinética propia permite que los equipos sean operados en intervalos. Al final de dicho tiempo, se procede a la recuperación de la levadura por centrifugación. Es un sistema que presenta facilidad en sus operaciones, ya que disminuye los requerimientos para obtener su completa esterilización, evitando así, el riesgo de pérdidas financieras y facilitando el manejo de materias primas. Como desventaja de este sistema, se muestra la decreciente productividad en la fermentación debido al largo tiempo de rotación y retraso en el crecimiento (Quintero, 1981).

### **1.1.9.2 Fermentación discontinua**

Llamados también procesos “Batch” o lote, son de gran importancia comercial para su amplio uso. Las técnicas de instalación de los cultivos discontinuos, van a depender de si el proceso es aerobio o anaerobio (Doran, 1998).

Una fermentación discontinua “Batch” puede considerarse como “sistema cerrado”. A tiempo cero ( $t_0$ ), la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se adiciona nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos, cambia generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células (Doran, 1998).

### **1.1.9.3 Condiciones que deben medirse y controlarse durante una fermentación discontinua.**

Una vez que un microorganismo y un sustrato han sido seleccionados es necesario encontrar las condiciones de operación más adecuadas y que optimicen el sistema. Desde el punto de vista de la operación es muy importante decidir las siguientes variables:

temperatura, pH, aireación, adición de nutrientes, y las variables mediadas de manera intermitente son: biomasa, producto y consumo de sustrato (Quintero, 1981).

#### **1.1.9.4 Temperatura.**

La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras especialmente de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35 °C. La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas, esto afecta de manera importante el crecimiento microbiano (Quintero, 1981).

#### **1.1.9.5 pH.**

El pH es la medida de la concentración de iones hidrógeno y tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y el rendimiento. También es óptimo para algunas especies como la de las levaduras que comprende un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último, puede afectar la floculación de la biomasa o su adhesión al vidrio. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo (Quintero, 1981).

#### **1.1.9.6 Nutrientes.**

Un medio de cultivo debe tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, pero es conveniente señalar que las relaciones entre ciertos elementos son de particular importancia. Según investigaciones realizadas, se ha encontrado que en un cultivo para levaduras en melazas la relación carbono/nitrógeno debe ser 1:1 para que la productividad celular sea máxima. También la relación fósforo/oxígeno es relevante en lo que se refiere a la eficiencia de conversión energética y a la respiración (Quintero, 1981).

#### **1.1.9.7 Aireación.**

La ausencia o abundancia de oxígeno permite una selección tanto de microorganismos como de productos del metabolismo. Cuando el cultivo se produce en presencia de oxígeno molecular, la fermentación se denomina aeróbica y cuando éste carece de oxígeno

anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2% se asimila como material celular. *Saccharomyces c.* es una levadura que posee alta metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaerobia generalmente por la producción de etanol (Owen, 1991).

### **1.1.9.8 Productividad**

La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de volumen, por unidad de tiempo del cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función del tiempo (h). Esta depende del diseño del fermentador, ya que afecta la transferencia de oxígeno que se ve reflejada en el rendimiento obtenido al final de la fermentación (Quintero, 1981). Un microorganismo adecuado para su utilización industrial debe producir la sustancia de interés, pero hay muchos otros aspectos a considerar.

### **1.1.9.9 Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa**

La levadura obtiene la energía a través de dos tipos de metabolismo:

**Asimilación:** En el cual la levadura toma las sustancias nutritivas que necesita del medio en que se desarrolla.

**Desasimilación:** En el cuál, se degradan los hidratos de carbono incorporados a la célula (Jorgensen, 1990).

Se distinguen dos formas de desasimilación, la respiración y la fermentación. La primera se define como un proceso metabólico que conduce a una oxidación total de los hidratos de carbono incorporados bajo formación de dióxido de carbono, agua y energía, generando biomasa (Ecuación 1). Esta vía se presenta como ruta catabólica de glucosa; la mayoría de las células que convierten glucosa en piruvato pasan al ciclo del ácido tricarboxílico, donde se convierten en dióxido de carbono y agua. Lo anterior se presenta en la siguiente ecuación (Jorgensen, 1990).

Ecuación 1:



### **1.1.10 LEVADURAS**

Las levaduras lo mismo que los mohos, son hongos, pero se distinguen de los mohos porque su forma dominante es unicelular. Generalmente se reproducen por gemación. Como células solas, crecen y se reproducen más aprisa que los mohos filamentosos y en proporción a su peso, son más aptas para efectuar cambios químicos porque tienen mayor área superficial en relación a su volumen. Son diferentes de las algas porque no realizan fotosíntesis; tampoco son protozoos puesto que tienen una pared celular rígida. Con facilidad se diferencian de la mayor parte de las bacterias por su tamaño relativamente grande y su morfología. Hay aproximadamente 350 especies de levaduras, separadas en unos 39 géneros. En comparación con otros grupos de microorganismos, las levaduras son pocas, ya que las algas, las bacterias y los protozoos suman varios de miles de especies (Chan y *col.*, 1981).

#### **1.1.10.1 Carácteres de los cultivos**

En la mayoría de los casos, el crecimiento en masa de las levaduras no resulta apropiado para identificar estos microorganismos. En los cultivos en placas de agar, es difícil diferenciar las colonias de levaduras de las colonias bacterianas; la observación microscópica de los microorganismos es la única forma segura que existe para poderlas diferenciar. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas, aunque es posible que tengan aspecto harinoso; la mayoría de las colonias son blancuzcas, aunque algunas tienen un color crema o rosado. Algunas colonias cambian poco de aspecto cuando envejecen.

Las levaduras son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos. En la superficie de un líquido, las levaduras oxidativas pueden crecer en forma de película, de velo o de espuma, y por ello se denominan levaduras formadoras de película. Las levaduras fermentativas suelen crecer en toda la masa del líquido y producen dióxido de carbono (Chan y *col.*, 1981).

#### **1.1.10.2 Propiedades fisiológicas**

A pesar de que las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiologismo, las que tienen importancia en la industria cuentan con un número suficiente

de actividades fisiológicas como para poder estudiarlas desde un punto de vista general, con tal de que se tenga en cuenta que se encontraran excepciones a cualquier afirmación que sobre las mismas se haga. La mayoría de las levaduras corrientes crecen mejor con un copioso aporte de humedad disponible. No obstante, muchas levaduras crecen mejor que la mayoría de las bacterias en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos (de azúcares y sales), de ello se puede deducir que esta clase de levaduras necesitan menos humedad que la mayoría de las bacterias. La mayoría de las levaduras, sin embargo, necesitan más humedad que los mohos.

El intervalo de temperaturas de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general, parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47°C. Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0°C o inferiores. Una reacción ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4.5, estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos. Las levaduras crecen mejor en aerobiosis, aunque en especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis.

En general, los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras. El dióxido de carbono que producen las levaduras que se utilizan en panificación, completa la fermentación del pan, mientras que el alcohol producido por las levaduras fermentativas es el principal producto en la fabricación de bebidas alcohólicas. Las levaduras también contribuyen en la producción de los sabores o bouquet de los vinos.

Los nutrientes utilizados por las levaduras varían desde compuestos sencillos, como son el amoníaco y la urea, a aminoácidos y polipéptidos. Además, las levaduras necesitan factores accesorios de crecimiento.

Las levaduras pueden modificar sus propiedades fisiológicas, a la mayoría se les puede adaptar a crecer en condiciones bajo las cuáles no hubiesen crecido bien antes de haber conseguido la adaptación. A este respecto, constituye un claro ejemplo de las distintas propiedades fisiológicas que se dan dentro de una misma especie al gran número de cepas *Saccharomyces cerevisiae* adaptadas a usos diferentes, como las cepas utilizadas en la elaboración de pan, las utilizadas en la elaboración de cerveza, las utilizadas en la

elaboración de vino, y las cepas o variedades que producen alcohol en elevadas concentraciones (Chan y col., 1981).

### **1.1.10.3 Levaduras de importancia industrial**

La mayoría de las levaduras que se utilizan en la industria pertenecen al género *Sacharomyces*. El término «levadura silvestre» se aplica a cualquier levadura que no sea la que se está utilizando o aquélla cuyo crecimiento se está estimulando. Por consiguiente, una levadura que se emplea para llevar a cabo un determinado tratamiento podría ser una levadura silvestre para otro tipo de tratamiento (Chan y col., 1981).

### **1.1.10.4 Género *Saccharomyces***

Las células de estas levaduras pueden ser redondeadas, ovalas o alargadas y pueden producir un pseudomicelio. Se reproducen por gemación multipolar o mediante la producción de ascosporas, las cuales se pueden formar tras la conjugación de dos células, o pueden derivar de células diploides cuando estas representan la fase vegetativa. Las ascosporas, en número de una a cuatro por asca, suelen ser redondeadas u ovaladas. La especie tipo *S. cerevisiae*, se emplea en muchas industrias alimentarias, utilizándose cepas específicas en la fermentación de pan, como levaduras de superficie en la fermentación de la cerveza inglesa, en la fermentación de los vinos, y en la producción de alcohol, glicerol e invertasa. La formación de agregados celulares y la rápida producción de CO<sub>2</sub> ocasionan el desplazamiento de las células de levadura a la superficie de la masa líquida, y de aquí que a las levaduras responsables de la fermentación se les conozca con la denominación de levaduras de superficie. Las levaduras del fondo del tanque de fermentación no forman agregados de células, crecen más lentamente, y tienen mayor actividad fermentativa a temperaturas más bajas (10 a 15 °C). El hecho de que no se formen agregados de células junto con la mayor lentitud, tanto de su crecimiento como de la producción de CO<sub>2</sub>, permiten que las levaduras sedimenten en el fondo y de aquí el término levadura de fondo. Las citadas propiedades de las levaduras corresponden a observaciones que no explican porque algunas forman agregados, mientras que otras floculan.

La variedad *ellipsoideus* de *S. cerevisiae* es una levadura que produce elevadas concentraciones de alcohol que se utiliza en la fabricación industrial de alcohol, en la elaboración de vinos y de licores de destilación (Chan y *col.*, 1981).

#### **1.1.10.5 Levaduras no convencionales**

En las fermentación espontáneas del jugo de agave para producir tequila, las levaduras pertenecientes a otros géneros diferentes a *Saccharomyces cerevisiae* llamadas no convencionales son particularmente importantes, ya que sintetizan una gran variedad de compuestos volátiles que contribuyen de manera determinante al bouquet de la bebida (Díaz y *col.*, 2008). Estas levaduras no convencionales proliferan en la primera etapa de la fermentación, siendo su población drásticamente reducida, debido a una supuesta intolerancia al etanol (Kunkee, 1984) y/o a una limitación nutricional (Valle, 2009). Estos tipos de levaduras tienen rendimientos de entre 25 a 49 g/L de etanol pero pueden llegar a producir cantidades de etanol incluso iguales a las del género *Saccharomyces*, siempre y cuando se les cultive en un medio apropiado que cumpla con las características nutricionales y físicas para su óptimo desarrollo (Díaz y *col.*, 2011).

#### **1.1.10.6 Diseños experimentales**

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidado como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

#### **1.1.10.7 Etapas en el diseño de experimentos**

Un aspecto fundamental del diseño de experimentos es decidir cuáles pruebas o tratamientos se van a realizar y cuántas repeticiones de cada uno se requieren, de manera que se obtenga la máxima información al mínimo costo posible. El arreglo formado por los diferentes tratamientos que serán corridos, incluyendo las repeticiones, recibe el nombre de matriz de diseño o sólo diseño. Para que un estudio experimental sea exitoso es necesario

realizar, por etapas, diferentes actividades. En este sentido, la etapa más importante y a la que se debe dedicar mayor tiempo es la planeación.

A continuación se describen de manera breve las etapas del diseño de experimentos con objeto de dar una visión global de lo que implica su correcta aplicación.

1. Entender y delimitar el problema u objeto de estudio.
2. Elegir las variables de respuesta que serán medidas en cada punto del diseño y verificar que se mide de manera confiable.
3. Determinar cuáles factores deben estudiarse o investigarse, de acuerdo a la supuesta influencia que tienen sobre la respuesta.
4. Seleccionar los niveles de cada factor, así como el diseño experimental adecuado a los factores que se tienen y al objetivo del experimento.
5. Planear y organizar el trabajo experimental.
6. Realizar el experimento. (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

#### **1.1.10.8 Diseños factoriales**

Un diseño factorial tiene como objetivo estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores, es decir determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor. Los factores pueden ser de tipo cualitativo, o de tipo cuantitativo. Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos

Así la matriz de diseño o arreglo factorial es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores.

El modelo estadístico de efectos para este tipo de diseño (con 2 factores *A* y *B*) está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk};$$
$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, n$$

Donde  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto debido al  $i$ -ésimo nivel del factor  $A$ ,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor  $B$ ,  $(\alpha\beta)_{ij}$  representa al efecto de interacción en la combinación  $ij$  y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante  $\sigma^2$  y son independientes entre sí (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

### 1.1.10.9 Metodología de superficie de respuesta

Existen experimentos con los que no se obtienen las respuestas buscadas o el nivel de mejoras logrado no es suficiente, por lo que es necesario experimentar de manera secuencial hasta encontrar el nivel de mejoras deseado. En este caso, después de una primera etapa experimental quizá sea necesario desplazar la región experimental en una dirección adecuada, o bien, explorar en forma más detallada la región experimental inicial. La forma de realizar ambas cosas son parte de la llamada metodología de superficie de respuesta (MSR), que consiste en una estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto.

La superficie de respuesta se caracteriza ajustando un modelo a los datos experimentales. Los modelos que se utilizan en MSR son básicamente polinomios. De esta manera, si se tienen  $k$  factores, el modelo de primer orden está dado por:  $\beta_0$

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

Y el modelo de segundo orden es:

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

#### 1.1.10.10 Técnicas de optimización

Una vez que se tiene el modelo debidamente ajustado y validado se procede a explorar la superficie descrita por el modelo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de la respuesta, o bien, para determinar la dirección óptima de movimiento en la que se debe experimentar en el futuro. Si el modelo no explica un mínimo de 70% del comportamiento de la respuesta, en términos de  $R^2$ , no se recomienda utilizarlo para fines de optimización porque su calidad de predicción es mala. Se pueden utilizar niveles codificados para los factores (-1, +1), lo cual facilita las interpretaciones y los cálculos. Por lo que siempre que se encuentren las condiciones óptimas o la dirección de experimentación futura, primero se hará en condiciones codificadas y después eso se debe traducir a condiciones o niveles reales (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Una de las técnicas más eficientes para la optimización de procesos es la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR); tiene como objetivo principal determinar las condiciones de operación óptimas para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación. La MSR es utilizada con éxito en la industria química y en los últimos años se le ha dado aplicación en microbiología para la formulación de medios de cultivo, se basa en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, a través de las cuales es posible modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es determinada por varias variables, siendo el objetivo de la misma optimizar esta respuesta. Esta metodología tiene la particularidad de determinar la influencia e importancia de los parámetros estudiados y las interacciones entre estos con un mínimo de ensayos. Este tipo de diseños pueden ser de valor considerable cuando es importante reducir el número de corridas tanto como sea posible (Montgomery, 2004).

El diseño Box-Behnken es aplicado cuando se tienen tres o más factores y suelen ser eficientes en el número de corridas. Por otra parte en los diseños factoriales involucran dos o más factores, cada uno de los cuales con distintos valores o niveles, y cuyas unidades experimentales cubren todas las posibles combinaciones de esos niveles en todo los factores. Este tipo de experimentos permiten el estudio del efecto de cada factor sobre la

variable de respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre la dicha variable. (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Por décadas, la producción de mezcal en el estado de Michoacán ha sido considerada como una actividad informal, la elaboración de esta bebida se ha circunscrito a algunas áreas específicas del territorio estatal, donde la materia prima se obtiene de poblaciones silvestres existentes en tierras de uso común de ejidos y comunidades agrarias, zona en donde proliferan más de una decena de especies; su explotación se realiza de manera sistemática, sin considerar criterios que permitan el repoblamiento natural, mermando cada vez más la disponibilidad del recurso (Gallardo y *col.*, 2008).

Actualmente esta actividad que constituye el eslabón final de la cadena productiva Agave-Mezcal, representa una fuente de ingresos complementaria para muchas familias del ámbito rural, principalmente en los municipios reconocidos con tradición mezcalera dentro del estado, lo que les permite alternarla con la agricultura de temporal, la ganadería o la explotación forestal. Consientes de esta problemática, actualmente en Michoacán se han emprendido diferentes acciones para consolidar este sector productivo con el apoyo del gobierno del estado, mediante la cual se han conformado asociaciones de mezcaleros en los distintos municipios productores de mezcal y se ha fomentado la siembra de *Agave cupreata* que es el utilizado principalmente para la producción de esta bebida; al respecto, la Secretaria de Desarrollo Rural (SEDRU), La Secretaria de Economía (SEDECO) y los diferentes ayuntamientos, han venido trabajando con los productores en la definición de estrategias políticas y acciones que en el corto plazo permitan desarrollar esta actividad de una manera legal y sostenible.

Es por esta razón que el presente proyecto pretende proporcionar a los productores de mezcal de la región de Etúcuaro, Michoacán municipio de Madero herramientas científicas y técnicas que les permitan hacer eficientes sus procesos, como es el uso de levaduras para acelerar la etapa de fermentación puesto que esta únicamente se lleva a cabo por levaduras silvestres presentes en el ambiente, además de mostrar a los productores que es posible

mejorar sus equipos de producción pasando de equipos rústicos a equipos tecnificados que les permitan acelerar sus procesos; obtener mayores rendimientos y menos pérdidas; estandarizar los procesos de producción; obtener un producto regulado bajo las normas establecidas y por último que el productor obtenga mayores rendimientos para que el producto sea distribuido no solo a un mercado local sino contar con las cantidades necesarias para satisfacer el mercado nacional e internacional.

La calidad de una bebida alcohólica no solo se basa en el cumplimiento de las especificaciones de las normas oficiales vigentes, debido a que también se deben considerar algunos factores subjetivos como la aceptación del consumidor en función de las características sensoriales que percibe, las cuales están asociadas a la composición de los productos, ya que la interacción de los componentes volátiles entre sí y con los receptores sensoriales del consumidor, producen las sensaciones sui generis de aroma y sabor (Tesevié y col., 2005).

### **1.3 HIPÓTESIS**

Mediante la utilización de diseños experimentales a nivel matraz y nivel biorreactor, es posible la formulación de un medio de cultivo que maximice la producción de etanol en la elaboración de mezcal, utilizando levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas de una región productora de mezcal.

### **1.4 JUSTIFICACIÓN**

Los mercados nacionales e internacionales para el mezcal requieren de productos y procesos de elaboración estandarizados que permitan la obtención de productos de calidad constante. En este sentido, el proceso vigente de manufactura en la industria del mezcal es totalmente artesanal basándose más en el conocimiento empírico que el técnico-científico, que si bien le confiere características típicas al producto, también limita su comercialización al no contar con bases de ingeniería que permitan desarrollar e implementar procesos estables y eficientes (Serrato y col., 2006).

De las operaciones unitarias implicadas en el proceso de producción, la fermentación es considerada una de las etapas críticas de mayor importancia en cuanto a la producción de etanol.

Actualmente el proceso utilizado para la elaboración de esta bebida es llevado a cabo de manera artesanal en recipientes abiertos, con únicamente las levaduras presentes en el medio ambiente, estas al ser insuficientes provocan que el tiempo de fermentación sea prolongado y se obtengan bajos rendimientos de etanol.

Entre los problemas que enfrenta la cadena productiva Agave-Mezcal se puede mencionar que:

1. La producción mezcalera es considerada como una actividad estacional, sólo se realiza durante los meses de octubre a mayo, al concluir el temporal de lluvias.
2. La mayoría de las “Vinatas” se ubican cerca de los arroyos o ríos, algunas de ellas en el fondo de profundas barrancas.
3. Existe sobreexplotación de las poblaciones silvestres de agaves mezcaleros, en las diferentes regiones productoras de mezcal.
4. La comercialización del producto, se realiza en pequeña escala y su mercado se circunscribe al ámbito local.
5. Se carece de control en los procesos de elaboración de la bebida, además de que la normatividad es desconocida para la mayoría de los productores.
6. No se utiliza una levadura para realizar la fermentación, este se lleva a cabo únicamente con las levaduras presentes en el ambiente y al ser insuficientes el proceso tiene bajos rendimientos además de un prolongado tiempo de fermentación.
7. No existe un cuidado de esterilidad en el medio ni en el área de producción por lo cual se pueden afectar las características del producto final.
8. El esquema de fermentación es inadecuado.
9. No existen equipos desarrollados para la industria mezcalera en el estado de Michoacán que permitan la estandarización de sus productos.

La producción de mezcal se ha mantenido rezagada y en la informalidad, lo que le ha conferido el legado de una actividad ilícita, por ello es imperante sea revalorada para convertirse en el corto y mediano plazo en una agroindustria rentable, que sirva como detonante para el desarrollo de actividades como la explotación racional del recurso, fomentar la producción, industrialización y comercialización de esta bebida y contribuir al arraigo de la población rural en sus comunidades.

Sin embargo para el logro de estos objetivos, deben resolverse una serie de años problemas que aquejan al sector, comenzando por la regularización de la actividad y la organización de los productores, para que a través de las distintas instancias de gobierno gestionen los apoyos necesarios para la consolidación de esta actividad, en beneficio de ellos mismos y sus familias (Gallardo y *col.*, 2008).

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.1 OBJETIVO GENERAL**

Diseñar un medio de cultivo para optimizar las variables que maximicen la obtención de etanol en la producción de mezcal, utilizando levaduras aisladas de fermentos mezcaleros y como sustrato jugo de *Agave cupreata*.

### **1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar fermentativamente las levaduras aisladas de los fermentos mezcaleros.
2. Establecer las mejores condiciones del medio de cultivo de las cepas para su máxima producción de etanol y crecimiento celular.
3. Estandarizar el proceso de fermentación.
4. Identificar los compuestos volátiles presentes en el producto final mediante cromatografía de gases.
5. Cuantificar la cantidad de etanol y metanol presentes en el producto final por cromatografía de gases.



## CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se describen a continuación los materiales y métodos utilizados durante el trabajo experimental, así como también se describe el procedimiento estadístico al cual se sometieron los datos obtenidos con el fin de determinar las condiciones óptimas.

### 2.1 CEPAS UTILIZADAS EN LA EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron tres cepas de levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas de distintas mezcaleras pertenecientes a la región productora de mezcal Etúcuero, Michoacán, e identificadas molecularmente.

**Tabla 3.** Cepas utilizadas durante el trabajo experimental.

Cepa	Nombre	Género
1	Lev1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8	Lev8	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
9	Lev9	<i>Kluyveromyces marxianus, var. drosophilarum</i>

(Damián y col., 2012).

### 2.2 FUENTE DE SUSTRATO

Se utilizó como sustrato jugo de *Agave cupreata*, de un mismo lote de cultivo, con una edad de madurez promedio de 8 años con origen de Etúcuero, Michoacán, el cual fue previamente hidrolizado y filtrado para su uso posterior.

### 2.3 ANÁLISIS DE LAS VARIABLES PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A NIVEL MATRAZ

Para evaluar los factores y los niveles de operación con el objetivo de maximizar la producción de etanol en la elaboración de mezcal se establecieron como variables A: Tipo de levadura (Lev1, Lev8 y Lev9), B: Sustrato (10-14 °Brix) utilizando el extracto de jugo de *Agave cupreata* y C: Temperatura (25-35 °C), variables que pueden ser controlables en el proceso de fermentación llevado a cabo en las vinatas de la región. Los niveles de

operación fueron establecidos con base a estudios previos realizados. Seleccionadas las variables y los niveles de operación se realizará un diseño Box-Behnken.

## **2.4 ANÁLISIS DE LAS VARIABLES PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN BIORREACTOR**

Para evaluar las variables y los niveles de operación con el objetivo de maximizar la producción de etanol para fines industriales se establecieron las variables A: aireación (0.1-1 vvm (volumen de aire por volumen de medio)) y B: Agitación (50-150 rpm), se inoculará con la cepa pura de la levadura previamente aislada y seleccionada por su capacidad fermentativa y se seleccionará el medio con mayor rendimiento alcohólico. Las fermentaciones se llevaran a cabo en un fermentador tipo tanque agitado (Applikon system). Seleccionadas las variables y sus niveles, se construyó un esquema experimental Factorial ( $2^{2^2}$ ), con una réplica y dos puntos centrales. En todos los ensayos experimentales se mantendrán constantes la concentración inicial del inóculo, el volumen del medio de cultivo y el pH. Tanto los diseños experimentales como el análisis estadístico se realizaran en el software STATGRAPHICS Plus, asistente para interpretar los resultados de cada experimento de manera estadística.

## **2.5 PREPARACIÓN DE INÓCULO**

Para la formulación del inóculo se colocaron 100 ml de jugo de agave previamente filtrado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml; se ajustó la concentración de azúcares a 12 ° Brix empleando un refractómetro de ABBE; con una concentración del 1 % en sales de  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  y mediante un potenciómetro (Hanna instruments) se realizó el ajuste de pH a 5. El medio se somete a esterilización y al terminar se deja enfriar a temperatura ambiente. Mediante un asa de cultivo se tomaron 2 asadas de colonias frescas de la cepa a estudiar presentes en las cajas de Petri y se inocularon en el medio del matraz, todo esto en condiciones de esterilidad. Terminada la inoculación, el matraz se colocó en la estufa de incubación a una temperatura de 28° C durante 48 horas con una agitación de 150 rpm.

## 2.6 FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Para la preparación de estos medios se filtró el jugo del agave hidrolizado, se le ajustó la concentración de azúcares como sólidos solubles por refractometría en la escala de grados Brix según la metodología clásica de la industria azucarera mediante un refractómetro de ABBE adicionando agua destilada, se agregaron sales de  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  en 0.1 % de concentración y se ajustó el pH a 5 (Damián y Pérez, 2009). Esto se llevó a cabo bajo las condiciones formuladas en el diseño experimental respectivamente para cada matraz. Finalmente se colocaron 100 ml de medio formulado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml; el matraz se sella con un tapón de algodón para evitar la contaminación. Se colocaron en el autoclave y se esterilizaron durante 20 minutos a 15 lbs/in a 121 °C. Ya esterilizado el medio se dejó enfriar a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad se procedió a ser inoculado para iniciar la cinética de fermentación con una concentración de  $3 \times 10^6$  cel/mL.

## 2.7 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra del fermento en 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada (dilución 1:10) y se agregaron 2 gotas de azul de tripano para teñir las células no viables, posterior a esto se realiza el conteo en la cámara de Neubauer (Loptik, Labor). La cámara y la laminilla de cuarzo se limpiaron suavemente con alcohol, la laminilla de cuarzo se colocó sobre la cámara en forma vertical, esta debe quedar centrada. Se proceda a llenar la cámara con micropipeta, el llenado debe ser continuo en un solo intento y se lleva al microscopio enfocando el cuadro de conteo con el ocular de 40X. Se ubica la cuadrícula central y se pasa al ocular de 10X, en esta cuadrícula se visualizan 25 cuadros, de los cuales se cuentan las células presentes en 5 campos, generalmente se cuentan los cuadros de las esquinas y el central, lo que garantiza un conteo aleatorio. Para realizar el conteo se pasa al ocular de 40X, donde se visualiza cada uno de los campos. Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Después de contar las células se procede a calcular el número de células por unidad de volumen. Para esto se utiliza el área de cada cuadro, el espacio ocupado por

el líquido en el que están las células que es el mismo espacio que hay entre la cuadrícula de la cámara y la laminilla de cuarzo.

## **2.8 CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO**

Para llevar a cabo dicha metodología se colocaron en un tubo de ensaye (con tapón de rosca) 100 microlitros de la muestra diluida convenientemente, 100 microlitros de reactivo DNS, se tapa el tubo, se agitó y se colocó por 5 minutos en un baño a 95-100 °C. Se dejó enfriar en un baño de hielo y se agregó 1 ml. de agua destilada, finalmente se lee la densidad óptica de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro (UNICO model 1000). Para obtener los valores en g/L de los azúcares reductores totales es necesario construir una curva de calibración con xilosa, fructosa y glucosa respectivamente con la cual se interpolan los datos.

## **2.9 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL**

Se colocaron en una celda de vidrio o plástico con tapa 2 ml de agua destilada, 0.10 mL de la muestra, 0.20 mL de solución tampón pirofosfato, 0.2 mL de solución  $\text{NAD}^+$  y 0.02 mL de la solución de aldehído deshidrogenasa, se colocó en otra celda la misma cantidad de reactivos a excepción de la muestra. Se mezclaron y se leyó la absorción de ambas celdas (340 nm) transcurridos aproximadamente 2 minutos ( $A_1$ ). Se agregaron a cada celda 0.02 mL de la solución de alcohol deshidrogenasa y se leyó la absorción transcurridos aproximadamente 5 minutos ( $A_2$ ). Se procedió a realizar los cálculos pertinentes para obtener la concentración de etanol de la muestra (Procedimiento de ensayo K-ETOH 11/05, Megazyme).

## **2.10 DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE PH**

Para determinar el pH, se tomó la muestra del medio de fermentación en un vaso de precipitado de 50 mL y mediante un potenciómetro (Hanna instruments) se determinó la variación de pH durante la fermentación.

## 2.11 DESARROLLO DE LAS FERMENTACIONES EN BIORREACTOR

Obtenidas las condiciones óptimas por el diseño nivel matraz así como la cepa con el mayor rendimiento de biomasa y etanol se procedió a realizar el diseño factorial ( $2^2$ ) en un biorreactor tipo tanque agitado (Applikon), evaluando como variables de respuesta el crecimiento celular y la producción de etanol.

### 2.11.1 OPERACIÓN DEL BIORREACTOR

Antes de llevar a cabo cada una de las cinéticas en el biorreactor se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Se preparan las soluciones de ácido (HCl) y base (NaOH, 1N) y se vertieron en los recipientes correspondientes para ser esterilizados.

Se llenó el tanque con el medio utilizando un volumen de trabajo de 2 litros.

Se esterilizó en un autoclave el medio de cultivo del tanque y de los matraces con el medio del inóculo, las soluciones buffer, las tuberías para bombas peristálticas y los filtros (con un tapón de algodón y papel aluminio por los extremos), los filtros de aireación y materiales como probetas para la inoculación, así como puntas y tubos eppendorf.

Se procedió a llevar a cabo la inoculación del medio de cultivo de los inóculos, se incubó a la temperatura ( $28^{\circ}\text{C}$ ) y agitación (250 rpm) requeridas por un tiempo de 18-24 horas (crecimiento abundante) en una incubadora con agitación (Shaker Incubator CVP-100B).

Se acoplaron las tuberías de silicón para la adición de buffer y de inóculo en los cabezales de las bombas peristálticas respectivas en el sentido de giro adecuado.

Se ensamblaron el motor en la posición correcta sobre el eje del agitador, sin y se encendió el equipo *Bio-stirrer* para el ajuste de la velocidad de agitación requerida.

Se colocó el termopar en el termopozo lleno con agua o aceite.

Se encendió la *bioconsola* y el medidor de oxígeno disuelto. Se calibraron los electrodos de pH y de oxígeno disuelto con las soluciones respectivas y se desinfectarlos con etanol al 70%. En un ambiente estéril (Campana de flujo laminar CV-2, Ecoshel) se introdujeron los electrodos en el tanque, enroscando, sin apretar demasiado y cuidando que los cables quedaran libres y sin torcer.

En un ambiente estéril se quitó el sello de las tuberías de los buffers y se conectaron a los tubos del tanque y a los recipientes con las soluciones correspondientes. Se conectaron el filtro de aire del compresor al rotámetro y otro más del rotámetro al difusor del tanque por medio de las tuberías de silicón. Se encendió el compresor y el rotámetro.

Se inoculó el tanque del biorreactor con la carga de células determinada.

Se introdujo el fermentador en baño con el termocirculador de inmersión (PolyScience), cuidando que los cables no quedaran tensos.

Se muestreo a diferentes intervalos de tiempo, encendiendo la bomba de alimentación, purgando los primeros mililitros del medio de cultivo y colectando la muestra a analizar.

## **2.12 DESTILACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN**

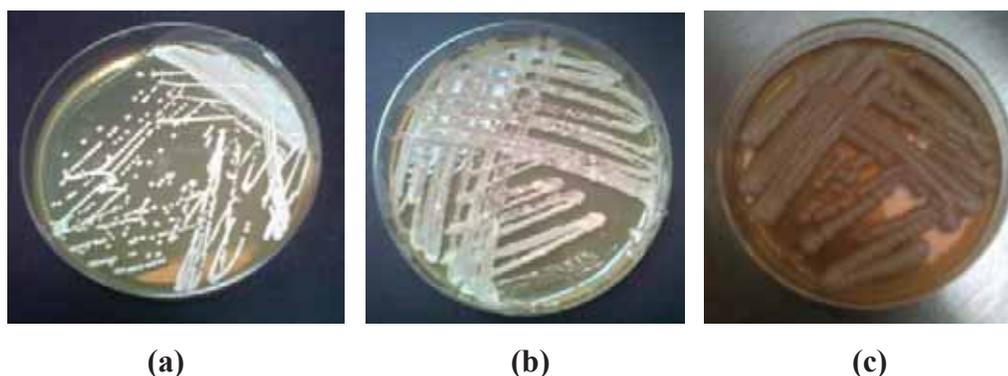
Se realizó una destilación fraccionada del mosto fermentado mediante un rotavapor Heidolph (Hei-VAP Advantage) en un baño de agua a una temperatura de 78 °C, durante 30 minutos a 150 rpm para obtener el producto final mezcal y se procedió a realizar una rectificación del producto destilado bajo las mismas condiciones de operación.

## **2.13 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES**

El mezcal obtenido por destilación procedió a ser analizado mediante un cromatografo de gases (Varian) para lo cual se tomaron muestras de 1 µL del mezcal y de los estándares de metanol, etanol, alcohol isoamílico, alcohol isobutílico y ácido acético, los cuales se inyectaron en el cromatógrafo de gases y se siguió un método (Tabla 18) para su identificación. Las separaciones se llevaron a cabo utilizando una columna capilar de 50 m x 0.32 mm de diámetro interno. Se utilizó nitrógeno de ultra alta pureza, como gas portador, con una presión constante de 10 psi y un flujo de 1.5 mL/min. (Método implementado en la U. M. S. N. H., 2011).

## CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

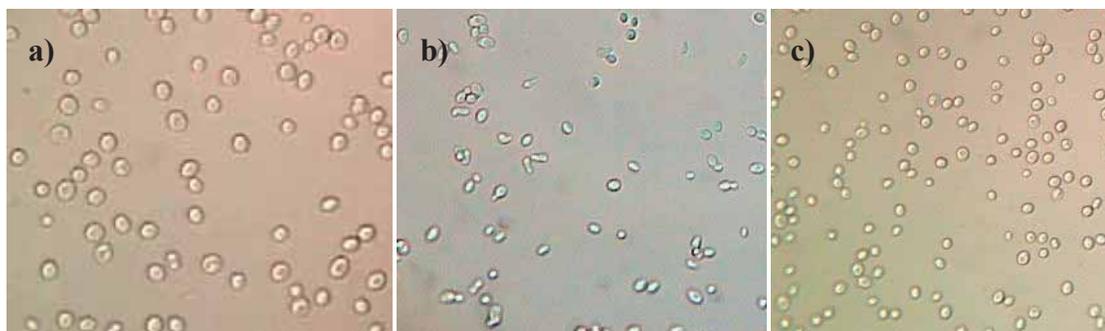
A continuación se muestran (Fig. 6) los cultivos de las cepas utilizadas sembradas en medio sólido enriquecido YPD (Glucosa, extracto de levadura, bactopectona y agar) más jugo de *Agave* para una mejor adaptación de las levaduras al medio, cada una de las cuales fue conservada en medio YPD líquido y glicerol a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 6.** Cultivos por estría en placa de levaduras, (a) Cultivo de levadura Lev1 (*Saccharomyces cerevisiae*), (b) Cultivo de levadura Lev8 y (c) Cultivo de levadura Lev9 (*Kluyveromyces marxianus*, var. *Drosophilarum*).

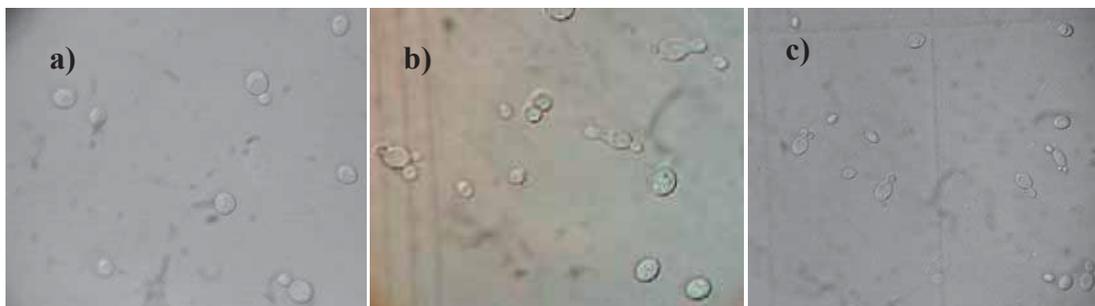
### 3.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Una vez aisladas y resembradas las cepas se realizó una observación al microscopio, en la que se pudo identificar estructuras redondas y ovaladas con tamaños relativamente grandes, también se observó la gemación de algunas de ellas (Fig. 7).



**Figura 7.** Micrografía (40 x) de levaduras seleccionadas. a) Lev1, b) Lev8 (*Kluyveromyces marxianus*), c) Lev9.

Se observó que la levadura 1 presentó un tamaño relativamente grande en cuanto a la levadura 8 y 9, además de presentar una forma esférica. Las levaduras 8 y 9 presentaron una forma ovalada un poco alargada y con gemaciones distintas a la levadura 1 (Fig. 6).



**Figura 8.** Micrografía (100 x) de gemación de las levaduras seleccionadas. a) Lev1 (*Saccharomyces cerevisiae*), b) y c) Lev8 (*Kluyveromyces marxianus*). A continuación se muestran las características morfológicas de las cepas estudiadas.

**Tabla 4.** Morfología colonial de las levaduras seleccionadas.

Levadura	Tamaño de la colonia	Forma	Elevación	Color	Consistencia	Margen	Superficie
1	2 mm	Circular	Pulvinada	Beige	Creмосa	Entero	Mate
8	1.4	Irregular	Elevada	Blanco	Creмосa	Entero	Mate
9	1.8	Circular	Pulvinada	Blanco	Creмосa	Entero	Brillante

### 3.2 ALGUNOS PARÁMETROS CINÉTICOS

El tiempo de duplicación (o tiempo de generación) se define como el tiempo que se requiere para que a partir de una célula se formen dos, es decir el tiempo requerido para duplicar el número de células de una población, en las levaduras del genero *Saccharomyces cerevisiae* es de aproximadamente 2 horas (Anaya y col., 2000).

Por otro lado la velocidad de crecimiento es el cambio en el número de generaciones por unidad de tiempo.

En la siguiente tabla (Tabla 5) se muestran algunos de los parámetros cinéticos calculados para las tres cepas seleccionadas.

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de las cepas.

<i>Levadura</i>	<i>Td (hr)</i>	$\delta$ ( <i>hr<sup>-1</sup></i> )	$\mu$ ( <i>hr<sup>-1</sup></i> )	<i>Y<sub>PX</sub> (g/g)</i>
<b>Lev.1</b>	2.8028	0.3568	0.2473	1.4466
<b>Lev.8</b>	2.3576	0.4241	0.294	1.9219
<b>Lev.9</b>	2.9584	0.3380	0.2343	1.4595

Donde: *Td* es el tiempo de duplicación,  $\delta$  es la velocidad de división,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y *Y<sub>PX</sub>* es el rendimiento del producto en este caso etanol.

### 3.3 ESPECIFICACIÓN DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES DEL DISEÑO BOX-BEHNKEN, NIVEL MATRAZ.

Se establecieron como variables experimentales, A: Tipo de levadura (LevI, LevII y LevIII), B: Sustrato inicial (10-14 °Brix) y C: Temperatura (25-35 °C).

**Tabla 6.** Base del diseño experimental Box-Behnken.

Base del diseño	
Número de factores experimentales	3
Número de respuestas	1
Número de corridas	15
Número de puntos centrales	3
Aleatorio	Sí

**Tabla 7.** Factores y niveles del diseño experimental Box-Behnken.

Factores	Niveles		
Levadura	Lev9	Lev1	Lev8
Temperatura	25	30	35
Sustrato	10	12	14

### 3.4 ESPECIFICACIÓN DE LAS VARIABLES DE SALIDA O RESPUESTA.

Se establecieron como variables de respuesta el crecimiento celular y rendimiento de etanol, ya que se pretende maximizar la obtención de este metabolito en la producción de mezcal.

También es importante conocer el comportamiento cinético de cada cepa por lo cual se considera también como variable de respuesta el crecimiento celular.

La tabla 8 muestra la matriz de datos de los 15 tratamientos realizados y los resultados experimentales obtenidos de crecimiento celular y etanol.

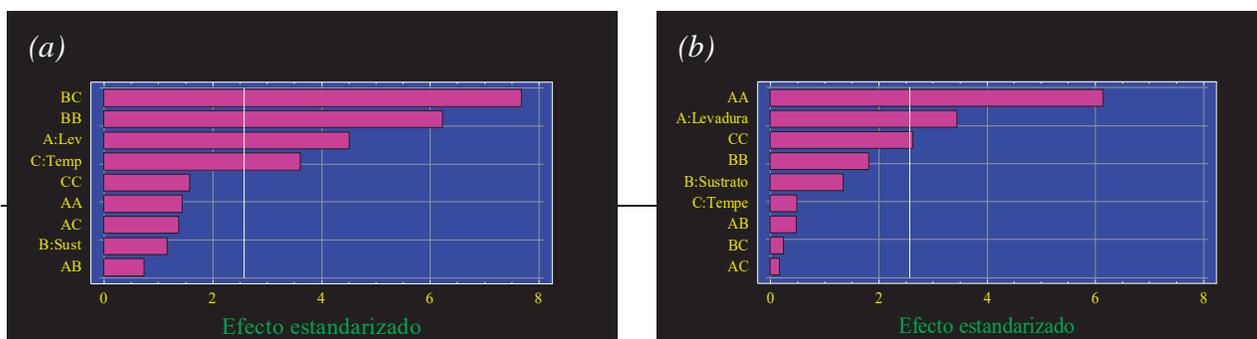
**Tabla 8.** Diseño experimental Box-Behnken.

Ensayo	Levadura	Sustrato (°Brix)	Temperatura (°C)	Células/mL	Etanol (% v/v)
1	+1	0	+1	1.64E+08	11.6
2	0	+1	+1	1.64E+08	4.08
3	0	0	0	2.03E+08	11.67
4	0	+1	-1	1.44E+08	11.7
5	0	-1	+1	1.32E+08	10.97
6	-1	-1	0	2.97E+08	7.6
7	+1	-1	0	2.66E+08	9.51
8	-1	+1	0	3.58E+08	8.12
9	+1	0	-1	1.56E+08	12.45
10	+1	+1	0	2.93E+08	8.93
11	0	0	0	1.40E+08	11.42
12	-1	0	+1	2.93E+08	7.2
13	0	-1	-1	1.29E+08	7.19
14	0	0	0	1.29E+08	11.7
15	-1	0	-1	2.74E+08	10.09

Al observar los resultados obtenidos en cada una de los tratamientos, se puede notar que no todas las combinaciones probadas dan como resultado la misma cantidad de células y etanol, siendo el tratamiento No.8 el más resaltante por la cantidad celular producida: 3.58E+08 cel/mL respectivamente y el No.9 por el porcentaje de Etanol producido: 12.45 % v/v.

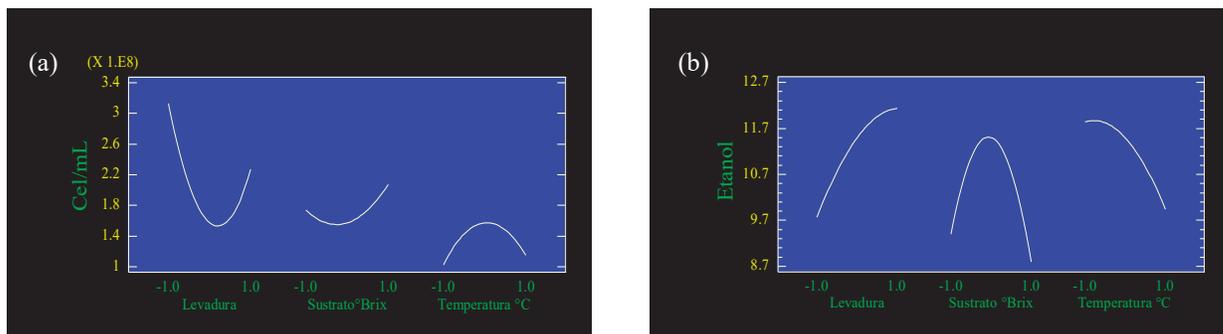
### 3.5 ANÁLISIS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BENHKEN MEDIANTE METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.

Tal como se muestra en el gráfico de Pareto (Figura 9) este tipo de análisis permite estudiar la influencia de las variables sobre la respuesta (producción de biomasa y etanol) y las interacciones entre ellas.



**Figura 9.** Diagrama estandarizado de Pareto para (a) Crecimiento celular, (b) Etanol producido.

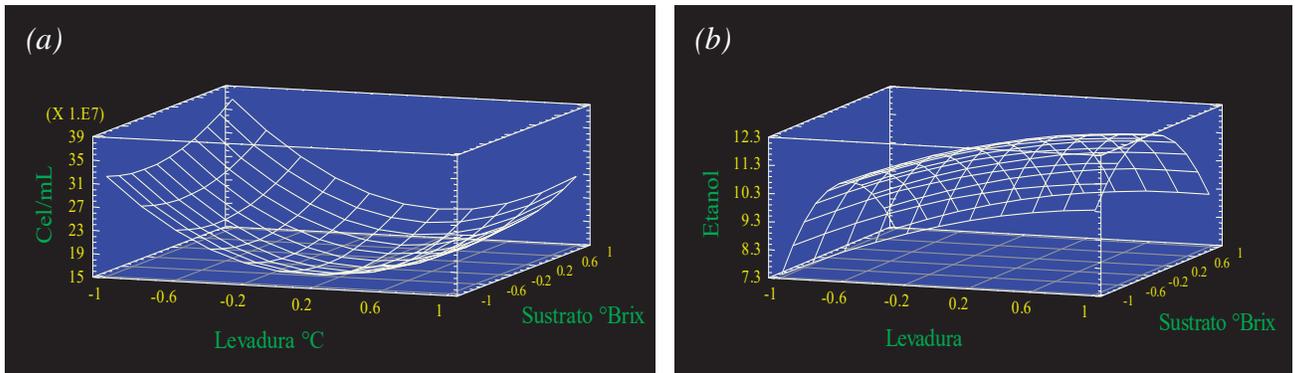
En las siguientes figuras (Fig. 10a y 10b) se puede observar al igual que en el diagrama de Pareto que factor experimental es de mayor influencia en cuanto a la variable de salida, así como estimar en que valores del rango de cada factor es posible obtener un resultado más favorable. Se observa que para la producción de biomasa el factor con mayor influencia es la levadura siendo más ideal utilizar la levadura Lev9 (-1 de acuerdo con el diseño) para producir mayor crecimiento celular. Para la producción de etanol se observa que el factor con mayor influencia es el sustrato, siendo más favorable utilizar sustratos intermedios (10°Brix), la Lev8 (+1 de acuerdo al diseño) y Temperaturas bajas (25-30 °C).



**Figura 10.** Efectos de los factores experimentales determinados para (a) Crecimiento celular y (b) Etanol producido.

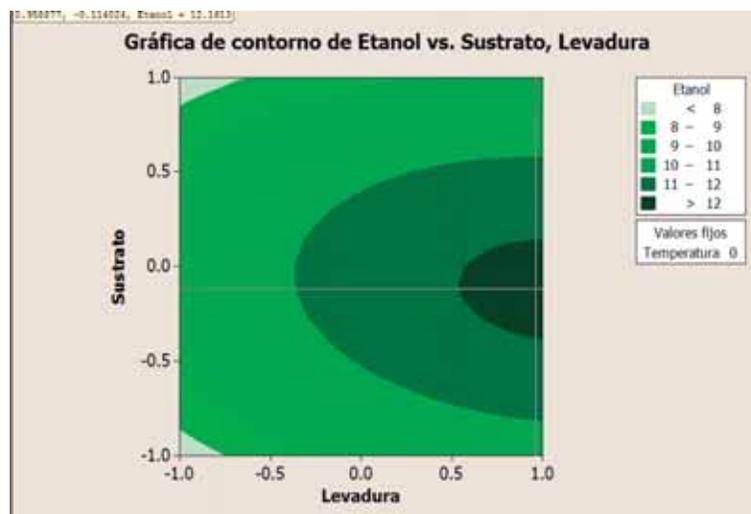
Las gráficas anteriores sugieren el cambio de levadura que se requiere hacer y de su efecto sobre el rendimiento de los productos. El efecto anteriormente descrito se visualiza mejor en las curvas de superficie de respuesta (Fig. 11). En ellas podemos observar que la producción de biomasa es mayor cuando utilizamos la levadura Lev9 (-1) y al aproximarnos a sustratos altos (14°Brix) aunque este no es un factor con gran significancia en el crecimiento celular. Se observa también (Figura 4.b) que para obtener mayores

cantidades de etanol el proceso debe aproximarse hacia sustratos intermedios (12 °Brix) y utilizando la levadura Lev8 (1 de acuerdo con el diseño) y temperaturas bajas (25-30 °C).

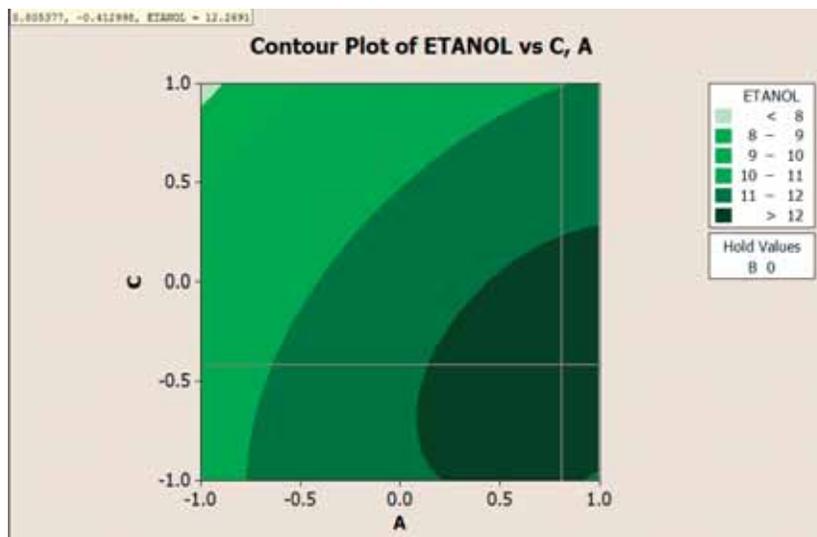


**Figura 11.** Gráfica de superficie de respuesta para (a) Crecimiento celular y (b) Etanol producido.

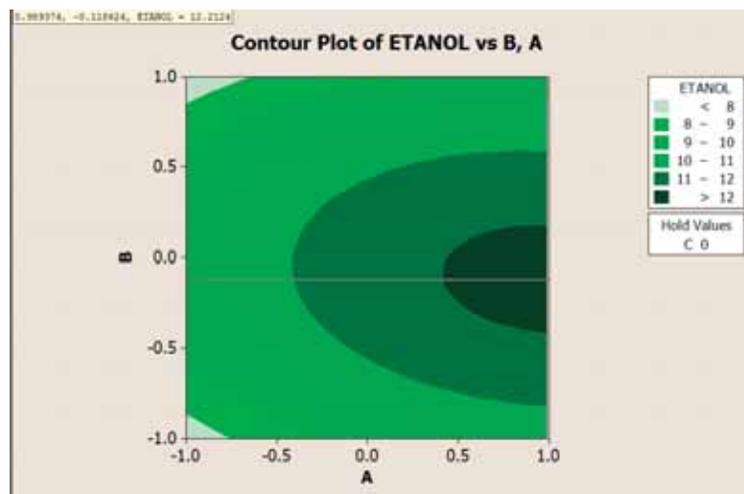
A continuación se muestran los diagramas de contornos de superficie de respuesta construidos con el software Minitab (Fig.12, 13 y 14) los cuales nos demuestran los puntos óptimos del proceso para obtener concentraciones de aproximadamente 12.5 %v/v.



**Figura 12.** Diagrama de contornos de superficie de respuesta para etanol vs Levadura y sustrato, (MINITAB).



**Figura 13.** Diagrama de contornos de superficie de respuesta para etanol vs levadura (A) y Sustrato (C), (MINITAB).



**Figura 14.** Diagrama de contornos de superficie de respuesta para etanol vs levadura (A) y temperatura (B), (MINITAB).

### 3.6 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL DISEÑO BOX-BEHNKEN.

A continuación se muestran los análisis de varianza obtenidos del diseño Box- Behnken para las dos variables de salida.

**Tabla 9.** Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para crecimiento celular, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. \*0,05 nivel de significancia.

<i>Factor</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Relación-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Levadura	1.4792E16	1	1.4792E16	11.29	0.0182
B:Sustrato	2.23613E15	1	2.23613E15	1.80	0.2373
C:Temperatura	2.9707E14	1	2.9707E14	0.24	0.6454
AA	4.68953E16	1	4.68953E16	37.77	0.0017
AB	2.80563E14	1	2.80563E14	0.23	0.6546
AC	3.30625E13	1	3.30625E13	0.03	0.8768
BB	4.08464E15	1	4.08464E15	3.29	0.1294
BC	7.01406E13	1	7.01406E13	0.06	0.8216
CC	8.59221E15	1	8.59221E15	6.92	0.0465
Error Total	6.20824E16	5	1.24165E15		
Total (corr.)		14			

**Crecimiento celular**

R-Cuadrada = 92.7733 %

R-Cuadrada (ajustado para g.l) = 79.7653 %

Error estándar de Est. = 3.5237E7

Valor de error absoluto = 1.74861E7

Estadístico de Durbin-Watson = 1.62718

En la tabla anterior podemos observar el análisis de varianza para crecimiento celular el cual indica cuales de los factores experimentales e interacciones entre ellos son significativos para el proceso. Podemos observar que la levadura (A), la interacción entre ella (AA) y la interacción entre la temperatura (CC) son los factores más significativos con un valor  $P < 0.05$ .

**Tabla 10.** Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para producción de etanol, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. \*0,05 nivel de significancia.

<b>Factor</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>g.l</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Relación-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:Levadura	11.2338	1	11.2338	20.38	0.0063
B:Sustrato	0.7442	1	0.7442	1.35	0.2977
C:Temperatura	7.18205	1	7.18205	13.03	0.0154
AA	1.14416	1	1.14416	2.08	0.2092
AB	0.3025	1	0.3025	0.55	0.4921
AC	1.0404	1	1.0404	1.89	0.2279
BB	21.386	1	21.386	38.80	0.0016
BC	32.49	1	32.49	58.95	0.0006
CC	1.38143	1	1.38143	2.51	0.1742

Total error	2.75592	5	0.551183
Total (corr.)	78.2449	14	

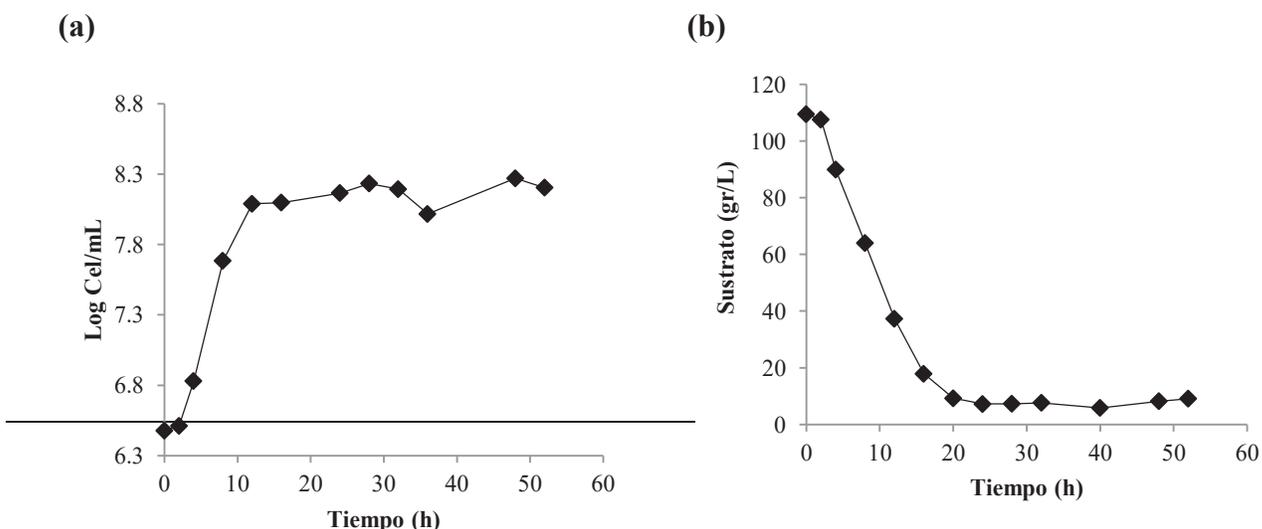
**Producción de etanol**

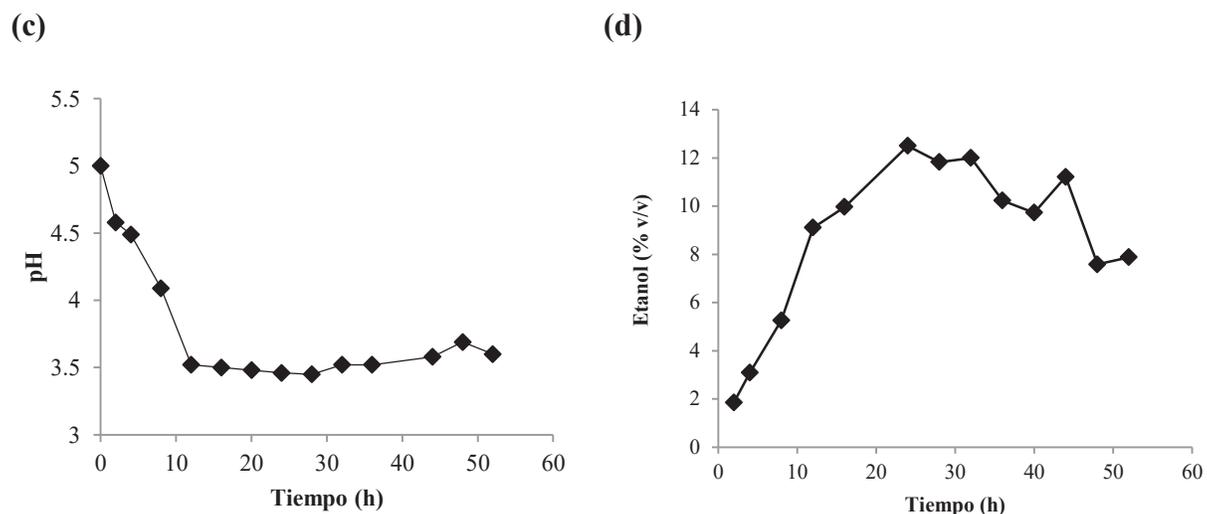
R-Cuadrada = 96.4778 %  
R-Cuadrada (ajustado para g.l) = 90.1379 %  
Error estándar de Est. = 0.742417  
Valor de error absoluto = 0.368889  
Estadístico de Durbin-Watson = 1.56425

La tabla 10 nos muestra el análisis de varianza del proceso, analizando como variable de respuesta la cantidad de etanol producido, se observa que tanto la levadura, la temperatura, la interacción sustrato-sustrato (BB) y la interacción sustrato-temperatura (BC) son factores experimentales significativos para el proceso (Valores-P > 0.05), también nos demuestra que factores no lo son y por lo cual es conveniente eliminarlos del proceso para optimizarlo. El análisis nos arroja una R<sup>2</sup> de un 96.5 % que nos representa que estos valores significativos nos explican el 96,5 % de nuestro proceso.

**3.7 CINÉTICA DE ENSAYO CON MAYOR RENDIMIENTO DE ETANOL**

A continuación se muestran las cinéticas (ensayo 9) de crecimiento, consumo de sustrato, pH y producción de etanol de la levadura Lev8 perteneciente al género *Kluyveromyces marcianus* (Damían y col., 2011), la cual presento el mayor rendimiento de etanol (12.46 % v/v) de acuerdo con los valores arrojados por el análisis del diseño experimental. El crecimiento celular incrementó de una carga inicial de 3x10<sup>6</sup> cel/mL a una final de aproximadamente 1.56x10<sup>8</sup> cel/mL. El sustrato inicial para este ensayo fue de 109.5 gr/L (10°Brix) llegando a una cantidad final de 9.01 gr/L. Finalmente el comportamiento del pH varió de un pH inicial de 5 a un final de 3.6.





**Figura 15.** Cinéticas de comportamiento de levadura Lev8. (a) Crecimiento celular. (b) Consumo de sustrato. (c) Variación de pH. (d) Producción de etanol.

Los gráficos fueron construidos por los valores obtenidos durante cada muestreo como se muestra a continuación (Tabla 11).

**Tabla 11.** Parámetros cinéticos obtenidos en el ensayo 9 con la levadura Lev8.

Horas	Etolanol (% v/v)	Cel /mL	ART'S (g/L)	pH
0	0.0000	3.00E+06	109.4992	5
2	1.8541	3.25E+06	107.5952	4.58
4	3.0894	6.75E+06	89.8998	4.49
8	5.2602	4.83E+07	64.0285	4.09
12	9.1061	1.23E+08	37.2613	3.52
16	9.9620	1.25E+08	17.8859	3.5
20	9.0561	1.46E+08	9.2621	3.48
28	11.8255	1.71E+08	7.2462	3.46
32	12.4600	1.56E+08	7.3022	3.45
36	10.2283	1.04E+08	7.4522	3.52
40	9.7265	1.54E+08	7.6382	3.52
44	11.2100	1.70E+08	5.8462	3.58
48	7.5843	1.87E+08	8.1982	3.69
52	7.8778	1.60E+08	9.0941	3.6

### 3.8 CONSUMO DE SUSTRATO Y VARIACIÓN DE pH.

Otros de los parámetros determinados para cada ensayo del diseño experimental Box-Behnken fueron la cuantificación del sustrato como azúcares reductores totales (ART's) y la variación de pH durante cada muestreo, los resultados se muestran en la tabla siguiente (Tablas 11).

**Tabla 12.** Consumos de sustrato y variaciones de pH de los ensayos del diseño Box Behnken.

Ensayo	Sustrato inicial (gr/L)	Sustrato final (gr/L)	pH inicial	pH final
1	109.5	2.49	5	3.67
2	129.89	2.76	5	3.91
3	109.5	2.21	5	3.91
4	129.89	4.41	5	3.87
5	87.32	2.65	5	3.78
6	87.32	3.61	5	3.96
7	87.32	6.01	5	3.98
8	129.89	1.81	5	3.88
9	109.5	8.20	5	3.6
10	129.89	5.91	5	3.25
11	109.5	3.84	5	3.19
12	109.5	2.09	5	3.59
13	87.32	1.65	5	3.53
14	109.5	3.68	5	3.2
15	109.5	2.43	5	3.6

Como se puede observar los ensayos iniciaron con concentraciones de sustrato diferentes por los tres niveles del diseño (10 °Brix = 87.32 gr/L; 12 °Brix = 109.5 gr/L y 14 °Brix = 129.89 gr/L) y los sustratos finales obtenidos fueron bajos entre 2 y 8 gr/L aproximadamente, lo que nos demuestra que se consumió prácticamente todo el sustrato presente en los distintos tratamientos de cultivo. En el caso del pH, todos los ensayos iniciaron a un pH constante de 5 y finalizaron con un pH similar promedio de 3.66, lo que nos demuestra que se acidificó el medio de cultivo en todos los casos, esto por la producción de ácido acético principalmente.

### 3.9 ESPECIFICACIÓN DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES DEL DISEÑO FACTORIAL ( $2^{2^2}$ ) NIVEL BIORREACTOR.

Una vez concluido el diseño del análisis Box-Behnken se procedió a determinar un criterio de escalamiento para desarrollar el siguiente diseño experimental factorial a nivel biorreactor utilizando condiciones de 12 °Brix en concentración inicial de sustrato, temperatura de 28 °C y la levadura Levadura Lev8, valores óptimos obtenidos del análisis del diseño Box-Behnken de segundo orden. Se establecieron como variables experimentales, A: aireación (0.1-1 vvm (volumen de aire por volumen de medio)) y C: Agitación (50-150 rpm).

Las experiencias fueron realizadas en un biorreactor marca Applikon de 3 litros de capacidad, equipado con controladores de velocidad de agitación, pH, oxígeno y temperatura. Los detalles del mismo se muestran en la Tabla 8. El biorreactor fue operado en forma semicontinua respecto de la fase líquida y continua respecto de la fase gas (aire). El pH del medio fue monitoreado con un sensor en forma continua y controlado en  $5 \pm 0.2$  unidades por la adición de NaOH 1N empleando un controlador ADI 1030 (Applikon Instruments) y bomba peristáltica (Marter Flex pump drive). La temperatura se controló en  $28 \pm 0.5$  °C mediante un termocirculador de inmersión (PolyScience 7306AAIB) y la velocidad de aireación se mantuvo constante entre 0.1-1(vvm) mediante un rotámetro (Cole Parmer). La velocidad de agitación fue controlada por medio de un controlador P100 (ADI 1032 Applikon) y para la determinación de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, se empleó un sensor CRODE provisto de membranas de titanio.

**Tabla 13.** Detalles del Biorreactor.

<b>Detalles del Biorreactor</b>	
Volumen del biorreactor (m <sup>3</sup> )	0.003
Volumen de trabajo (m <sup>3</sup> )	0.0025
Diámetro del biorreactor (m)	0.13
Altura del líquido (m)	0.17
Tipo de agitador	Rushton
Número de paletas de un agitador	6
Diámetro del agitador (m)	0.045
Ancho de la paleta (m)	0.011
Longitud de la paleta (m)	0.011
Número de agitadores	2
Posición desde la base 1 <sup>er</sup> agitador (m)	0.04

---

Posición desde la base 2 <sup>do</sup> agitador (m)	0.125
Número de deflectores	3
Ancho de un deflector (m)	0.013
Tipo de distribuidor de aire	tubo perforado
Número de orificios del distribuidor	7
Diámetro de los orificios (m)	0.001

---



**Figura 16.** Biorreactor conectado a todos los dispositivos de equipamiento.



**Figura 17.** Biorreactor en el baño con el termocirculador de inmersión y los sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

Se inoculó con la cepa pura de la levadura previamente aislada y seleccionada por su capacidad fermentativa del diseño anterior y se seleccionó el medio con mayor rendimiento alcohólico obtenido del análisis estadístico del diseño Box-Behnken. Seleccionadas las variables y sus niveles, se construyó un esquema experimental Factorial ( $2^{2^2}$ ) replicado.

**Tabla 14.** Base del diseño experimental Factorial ( $2^{2^2}$ ).

Base del diseño	
Número de factores experimentales	2
Número de respuestas	1
Número de replicas	1
Número de corridas	10
Número de puntos centrales	2
Aleatorio	Sí

**Tabla 15.** Factores y niveles del diseño experimental Factorial ( $2^{2^2}$ ).

Factores experimentales	Niveles		
	Bajo	Intermedio	Alto
Aireación (vvm)	0.1	0.5	1
Agitación (rpm)	50	100	150

**Tabla 16.** Diseño experimental Factorial ( $2^{2^2}$ ).

Ensayo	Agitación	Aireación
1	-1	1
2	-1	-1
3	0	0
4	1	-1
5	1	1
6	-1	1
7	-1	-1
8	0	0
9	1	-1
10	1	1

Los niveles de operación fueron establecidos con base a estudios previos realizados. En todos los ensayos experimentales se mantuvo constante la concentración inicial del inoculo, el volumen del medio de cultivo y la concentración de sales de  $(\text{NH}_4)_2 \text{H}_2\text{PO}_4$ .

Se utilizó el software BioExpert Lit para el control de pH, Temperatura y oxígeno disuelto.

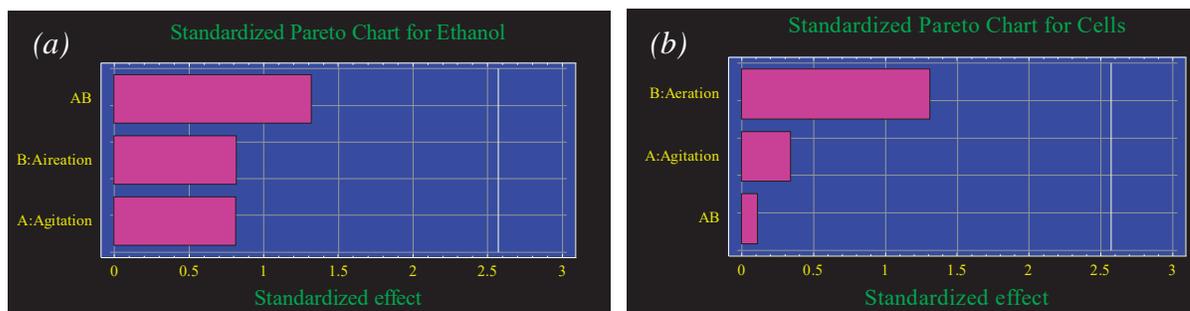
**Tabla 17.** Resultados experimentales de las variables de respuesta del diseño factorial ( $2^2$ ).

Ensayo	Agitación	Aireación	Células/mL	Etanol (%v/v)
1	-1	1	$2.215 \times 10^8$	11.76
2	-1	-1	$2.34 \times 10^8$	15.06
3	0	0	$2.54 \times 10^8$	10.63
4	1	-1	$2.3 \times 10^8$	13.27
5	1	1	$2.19 \times 10^8$	14.94
6	-1	1	$2.49 \times 10^8$	11.87
7	-1	-1	$1.77 \times 10^8$	14.77
8	0	0	$1.98 \times 10^8$	10.58
9	1	-1	$1.99 \times 10^8$	15.09
10	1	1	$2.61 \times 10^8$	14.88

La tabla 16 nos muestra los valores máximos obtenidos en cada ensayo, observándose mayor crecimiento celular en el ensayo 10 ( $2.61 \times 10^8$  cel/mL) y mayor producción de etanol en los ensayos 2 y 9 (15.06 y 15.09 % v/v respectivamente).

### 3.10 ANÁLISIS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL $2^2$ .

Al aplicar las fórmulas para estimar los efectos, estos se pueden graficar en los diagramas de Pareto estandarizados, para así visualizar cuáles tienen mayor impacto sobre la variable de respuesta.

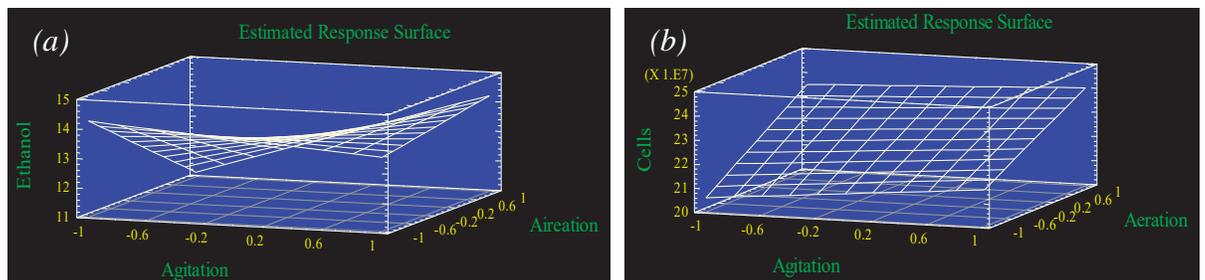


**Figura 18.** Diagrama estandarizado de Pareto para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular.

Por lo tanto se puede observar que los valores absolutos de la estimación de los efectos estandarizados (barras rosas) no sobrepasan la línea blanca que representa el valor crítico,

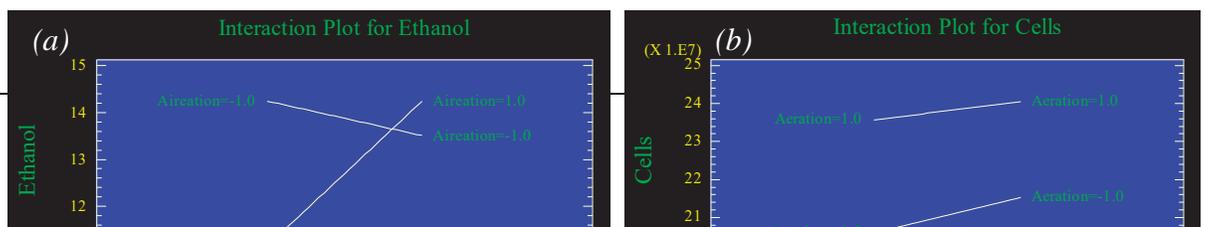
como se muestra en las figuras anteriores. De esta manera los efectos cuyas barras superen tal línea serán significativos y viceversa.

En las figuras 19a y 19b se muestran los gráficos de superficie de respuesta que nos permiten tener una visualización de lo que significa el modelo ajustado. Éste representa una superficie de respuesta sobre la región experimental y son particularmente útiles cuando se tienen dos factores como en este caso. Los gráficos (Fig. 19) nos demuestran en que región del proceso y valores de los factores experimentales obtenemos mayor producción de etanol, así como de biomasa. Para este proceso en particular se observa que hay mayor producción de etanol en agitaciones elevadas y aireaciones bajas. En el caso del crecimiento celular se observa que las mejores condiciones para su producción se presentan con agitación elevada y aireación elevada, lo que es lógico ya que las levaduras requieren mayor oxigenación para su desarrollo contrario a la producción de etanol ya que este se produce en condiciones anaerobias por lo cual se produce en condiciones de aireación baja.



**Figura 19.** Gráfica de superficie de respuesta para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular.

El análisis del modelo nos permite conocer también si los factores experimentales en el proceso interaccionan entre sí como se muestra en los diagramas de la figura 20, en estos se observa que en cuanto a la producción de etanol si existe interacción entre los factores y que esta interviene también en la producción del metabolito de interés, si existe interacción de los factores, el efecto del incremento de la aireación sobre la producción de etanol es diferente dependiendo del nivel de la agitación, para el caso del crecimiento celular no existe interacción de los factores experimentales.



**Figura 20.** Interacción de los factores experimentales para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular.

Otra herramienta básica e indispensable para el análisis de los diseños experimentales es la ANOVA ó análisis de varianza, lo que nos permite saber cuáles de los efectos de los factores actúan sobre la variable de respuesta.

**Tabla 18.** Análisis de varianza del modelo del diseño factorial para Etanol, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. \*0,05 nivel de significancia.

<i>Factor</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Relación-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Agitación	2.6001	1	2.6001	0.66	0.4530
B:Aireación	2.6232	1	2.6232	0.67	0.4512
AB	6.8724	1	6.8724	1.75	0.2434
Bloques	0.0008	1	0.0008	0.00	0.9892
Error Total	19.6626	5	3.9325		
Total (corr.)		9			

$$R^2 = 39.6689$$

**Tabla 19.** Análisis de varianza del modelo del diseño factorial para Crecimiento celular, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. \*0,05 nivel de significancia.

<i>Factor</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Relación-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Agitación	1.0224E14	1	1.0224E14	0.12	0.7466
B:Aireación	1.5097E15	1	1.5097E15	1.72	0.2464
AB	1.1045E13	1	1.1045E13	0.01	0.9150
Bloques	5.4908E14	1	5.4908E14	0.63	0.4645
Error Total	4.3817E15	5	8.7635E14		
Total (corr.)	6.5539E15	9			

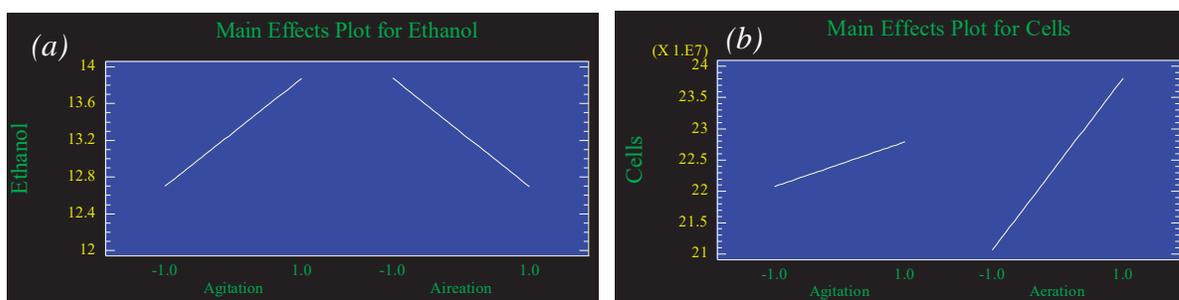
$$R^2 = 33.1427$$

En los análisis de varianza obtenidos anteriormente se aprecia que los valores del *valor-p* son mayores en ambos casos a  $\alpha = 0.05$ , por lo que se acepta la hipótesis nula (ningún factor es significativo en cuanto a la variable de respuesta). Al observar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se concluye que el análisis solo nos logra explicar el 39.6 y 33.14 % del

proceso para cada caso (variabilidad del proceso), porcentaje no significativos para considerar utilizar este análisis de varianza ya que los factores experimentales solo explican estos porcentajes del proceso en cuanto a la variable de salida.

El valor de la significancia observada o *valor-p* es el área bajo la curva de la distribución  $F_{1,5}$ , lo que nos permite comparar el estadístico de prueba contra un número crítico de tablas. En esta caso de las tablas de la distribución  $F$  (anexo A), se lee que el valor crítico para  $\alpha = 0.05$  es  $F_{1,5} = 6.61$ . Como los valores  $F_0$  (*Relación-F*) son menores que  $F_{1,5} = 6.61$  en todos los casos se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alterna con lo cual se concluye que no existe diferencia o efecto de los factores experimentales en cuanto a las variables de respuesta.

Sin embargo aunque este diseño no aporó muchos resultados útiles que permitieran mejorar el proceso de fermentación a nivel biorreactor, existen otros gráficos de efectos principales (Fig. 21a) de la cual se desprende que se debe aumentar la agitación pero no la aireación si queremos obtener mayores rendimientos de etanol. En cuanto al crecimiento celular se observa (Fig. 21b) que se debe aumentar la agitación y la aireación si se requiere obtener mayores rendimientos de biomasa. Además se logro observar que si hubo un aumento en la producción de etanol a nivel biorreactor siendo de aproximadamente 15.09 % en comparación con el diseño a nivel matraz en el que se obtuvo una cantidad de etanol de aproximadamente 12.45 %.



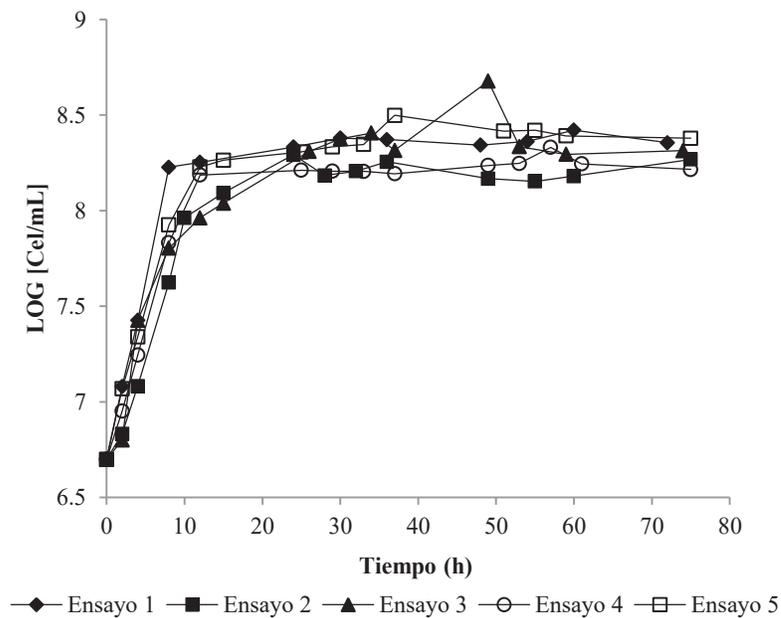
**Figura 21.** Gráficos de efectos principales para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular.

Estos gráficos son útiles ya que con el análisis de esta primera etapa experimental quizá sea necesario desplazar la región experimental (moverse de lugar) en una dirección adecuada, o bien explorar en forma más detallada la región experimental inicial, lo cual puede ser

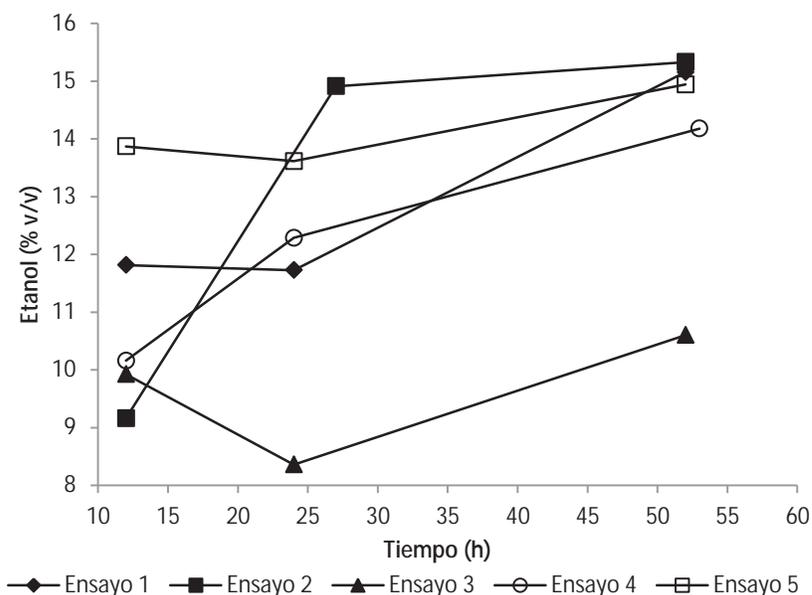
posible si se utiliza la metodología de superficie de respuesta como una segunda alternativa de experimentación.

### 3.11 CINÉTICAS DEL PROMEDIO DEL DISEÑO FACTORIAL $2^2$ CON SU RÉPLICA.

A continuación se muestran las cinéticas de crecimiento celular y producción de etanol de la levadura Lev8, además de las cinéticas de los puntos centrales (promediados con su respectiva replica). Se observa (Fig. 22) que el crecimiento celular fue similar en todos los ensayos demostrando que los tratamientos no fueron significativos para esta variable de respuesta. Se observa también (Fig. 23) que los ensayos 1, 2 y 5 presentaron mayor producción de etanol en cuanto a los ensayos 3 y 4.



**Figura 22.** Cinéticas de crecimiento celular de la levadura Lev8 vs tiempo.



**Figura 23.** Cinéticas de producción de etanol de la levadura Lev8 contra tiempo.

### 3.12 CÁLCULO DEL NÚMERO DE POTENCIA DEL BIORREACTOR APPLIKON PARA CRITERIO DE ESCALAMIENTO.

El problema de una escala a otra es uno de los de mayor importancia no sólo en fermentación sino en la industria en general. En el laboratorio comúnmente se opera con matraces agitados o pequeños fermentadores, donde se buscan nuevos productos, se estudian mecanismos de control y se mejoran las cepas de producción. En la planta piloto se estudian efectos de aeración, temperatura y control de pH y los fermentadores de producción deben operar siguiendo un calendario fijo; además tratan de aumentar la productividad.

La concentración relativa del producto final en una fermentación es afectada por P/V (Potencia sobre volumen) o  $K_{La}$  (coeficiente volumétrico de transferencia de masa). En la práctica se pueden elegir varios criterios de escalamiento para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos.

Para este caso el criterio de escalamiento elegido fue el de Potencia por unidad de volumen constante ( $P/V \propto (N^3 D^2)$ ), para lo cual se requiere de los siguientes cálculos.

El diseño experimental incluye dos niveles de agitación y uno más como punto central por lo que se requiere realizar el cálculo para 50, 100 y 150 rpm, ya anteriormente se obtuvo que la agitación ideal para obtener mayores concentraciones de etanol es la de 150 rpm.

**Tabla 20.** Valores de parámetros para el cálculo del número de potencia y la potencia.

Agitación rpm (N)	Agitación rps (N)	Número de Reynolds	Número de Potencia (Np)	Potencia (P) (kW)
50	0.8333	1182.35	4	$8.586 \times 10^{-7}$
100	1.6666	2297.67	4.2	$7.2127 \times 10^{-6}$
150	2.5	3547.07	4.5	$2.61 \times 10^{-5}$

### 3.13 DESTILACIÓN DEL PRODUCTO (MEZCAL) E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES.

Finalmente se destiló el mosto fermentado (1,790 mL) mediante un rotavapor Heidolph (Hei-VAP Advantage) obteniéndose 70 mL de mezcal con 45 % de alcoholes determinados mediante un alcoholímetro (Brannan) y se identificaron los estándares y tiempos de retención de etanol, metanol, alcohol isoamílico, alcohol iso-butílico y ácido acético (Fig. 26), así como la obtención del cromatograma de la muestra de mezcal, mediante cromatografía de gases (VARIAN) (figuras 24 y 25).

El método utilizado por el cromatógrafo de gases se muestra en la tabla 19.

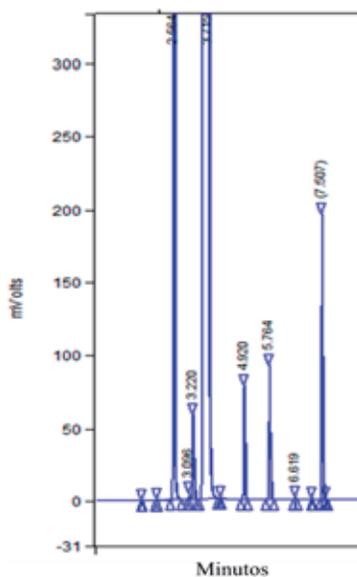
**Tabla 21.** Método de operación del cromatógrafo.

Componente	Valor establecido
Horno 1070 (°C)	150
Flujo de la columna (mL/min)	1.5
Presión de la columna (psi)	10
Horno de la columna (°C)	250

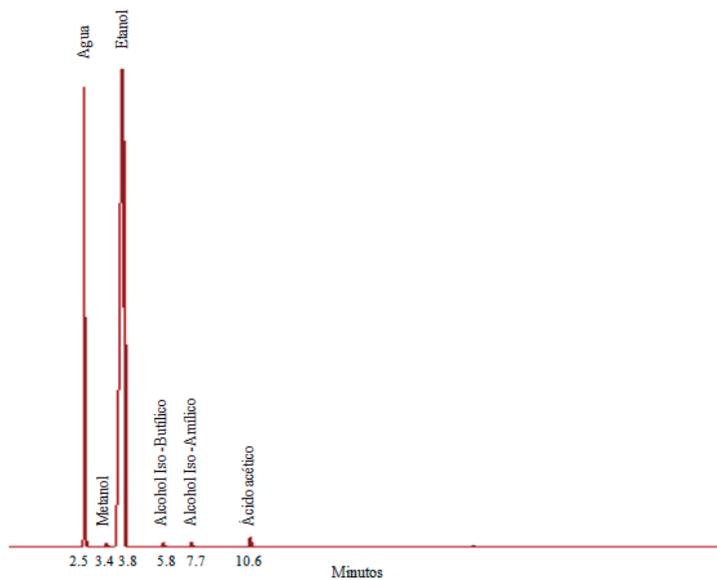
Horno FID (°C)

250

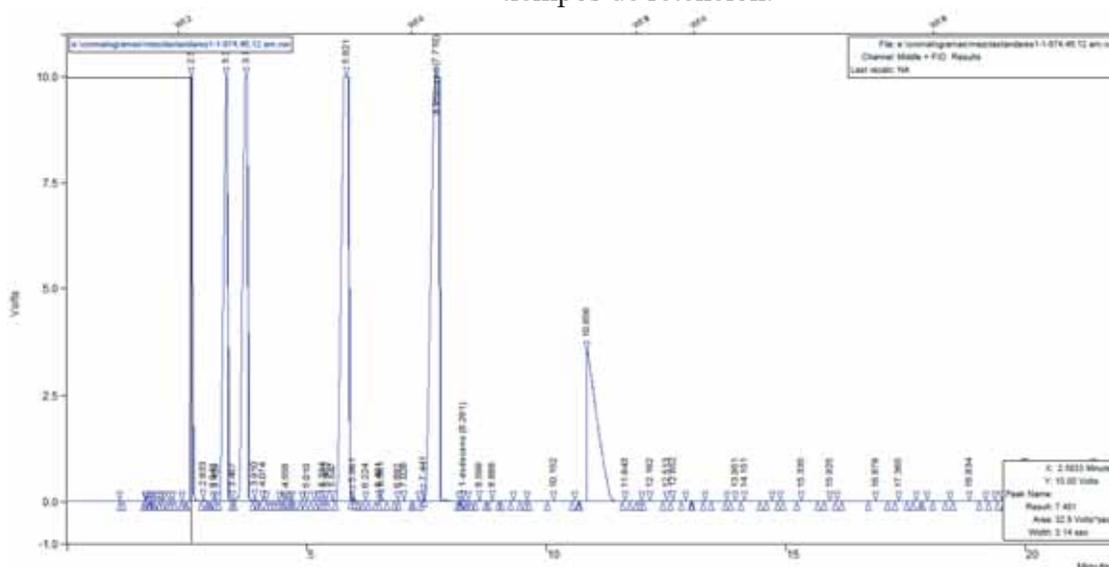
A continuación se muestra el cromatograma obtenido de la muestra de mezcal inyectada en el cromatografo. Se pueden identificar 6 picos intensos, que posteriormente fueron identificados por el análisis de los estándares mencionados anteriormente.



**Figura 24.** Cromatograma de la muestra de mezcal obtenida. La siguiente es una figura que nos representa la magnitud real de los picos de los compuestos con mayor concentración en el mezcal y sus tiempos de retención.



**Figura 25.** Cromatograma de la muestra de mezcal obtenida y sus tiempos de retención.



**Figura 26.** Cromatografía de la mezcla de los estándares.

**Tabla 22.** Estándares identificados en la muestra destilada de mezcal y sus puntos de ebullición y retención.

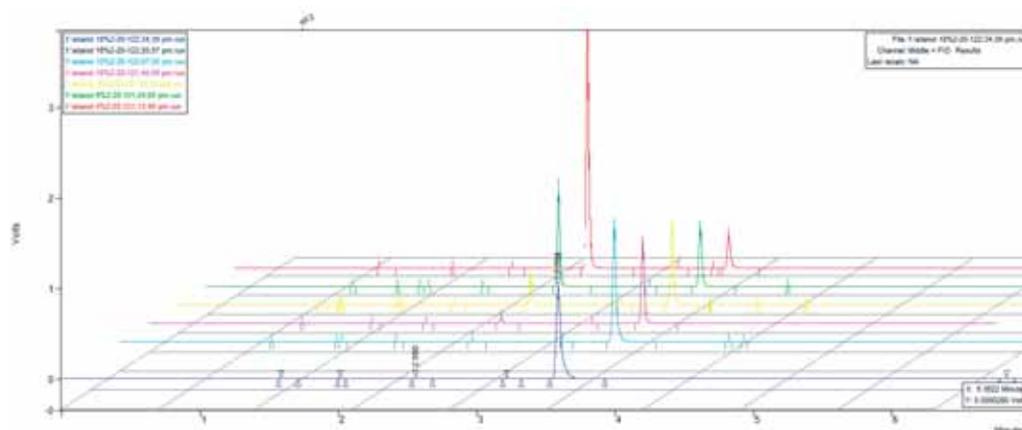
Estándar	Punto de ebullición (°C)	Tiempos de retención (min)
Agua	100	2.55
Metanol	64.7	3.365
Etanol	78	3.774
Alcohol isobutílico	108	5.852
Alcohol isoamílico	131.6	7.758
Ácido acético	117.9	10.6

### 3.14 CUANTIFICACIÓN DE METANOL Y ETANOL

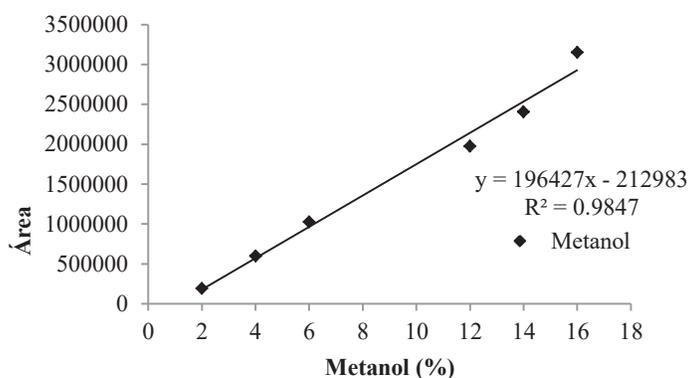
Para la cuantificación de metanol y etanol se construyó una curva patrón con las áreas de los picos arrojados por los cromatogramas de las distintas concentraciones de metanol y etanol.

#### 3.14.1 CUANTIFICACIÓN DE METANOL

En el caso de la construcción de la curva patrón para el metanol se inyectaron en el cromatograma muestras con concentraciones del 2-18 %.



**Figura 27.** Curva patrón de las diferentes concentraciones de metanol.



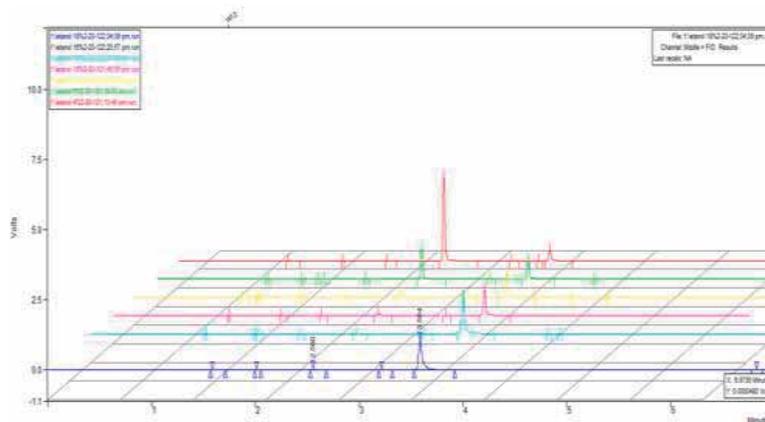
**Figura 28.** Curva patrón para metanol.

Con la ecuación de regresión del gráfico se obtuvo la concentración de metanol en la muestra destilada de mezcal siendo de 1.89 % (18.9 mg/100mL), valor que se encuentra dentro de la especificación de metanol en mezcal por la NOM.

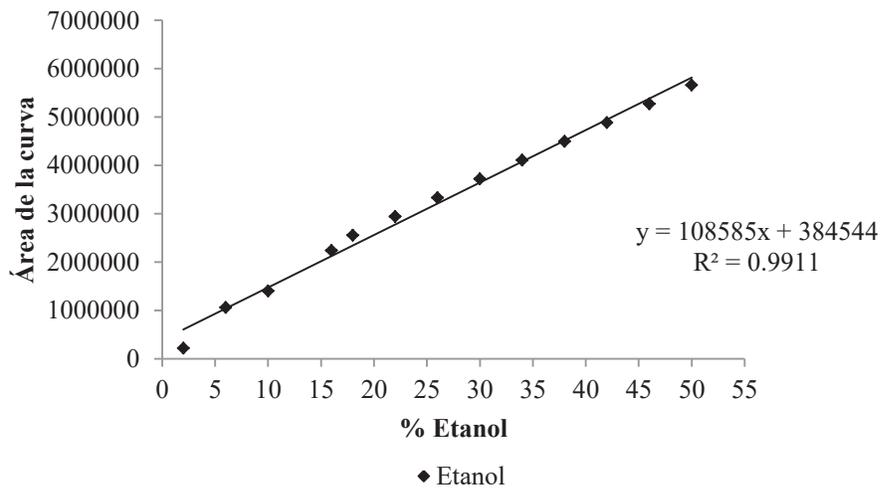
### 3.14.2 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL.

En el caso de la construcción de la curva patrón para el Etanol se inyectaron en el cromatograma muestras con concentraciones del 2-50 %, esto por el valor obtenido mediante el alcoholímetro que se reportó de 45 % de alcohol en la muestra destilada del mezcal.

Con la ecuación de regresión del grafico del área de la curva del cromatograma contra las distintas concentraciones de etanol se obtuvo la concentración de este en la muestra destilada de mezcal siendo de 46.75 % valor que se encuentra dentro de las especificaciones de la norma del mezcal.



**Figura 29.** Cromatograma de la curva patrón de Etanol.



**Figura 30.** Curva patrón de etanol.

## **CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **4.1 CONCLUSIONES**

Mediante la metodología de superficie de respuesta fue posible encontrar la formulación de un medio de cultivo que mejorará la producción de etanol durante la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal (Sustratos bajos 10-12 °Brix y temperaturas de 25-35 °C).

Se estableció que la levadura Lev8 es la que presenta mayor producción de etanol, siendo de aproximadamente 12.46 % v/v.

Las levaduras Lev8 y Lev9 presentaron un crecimiento similar (3.84E+08 y 3.83E+08 cel/mL, respectivamente) y mayor al de la levadura Lev1 (2.03E+08 cel/mL).

Se concluyó que el crecimiento celular fue similar en todos los ensayos del diseño Factorial  $2^2$  nivel biorreactor, demostrando que los tratamientos no fueron significativos para esta variable de respuesta, sin embargo el ensayo 10 presentó el mayor crecimiento siendo este de  $2.61 \times 10^8$  cel/mL. Se observó también que los ensayos 1, 2 y 5 (con sus replicas) presentaron mayor producción de etanol (15.15, 14.915 y 14.91 % v/v, respectivamente) en cuanto a los ensayos 3 y 4 (10.6 y 14.18 % v/v). Se determinó que los mejores rendimientos de etanol ocurren con una agitación de 150 rpm y una aireación de 0.1 vvm.

### **4.2 RECOMENDACIONES**

1. Realizar diseños experimentales para optimizar medios de cultivo involucrando otros factores experimentales como concentraciones de nutrientes, vitaminas, minerales entre otros.
2. Estudio de los consorcios microbianos durante las fermentaciones espontáneas.
3. Estudio de cultivos mixtos mediante diseños experimentales de mezclas entre levaduras, bacterias y hongos.

4. Identificación de más de los posibles compuestos volátiles presentes en los mezcales destilados.
5. Cuantificación de los compuestos volátiles presentes en los mezcales obtenidos.

## CAPITULO 5. REFERENCIAS

### ARTÍCULOS PUBLICADOS

Anaya, V., De la Luna, A., González, A. (2000). El genoma y el transcriptoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. México. 1-2.

Cervantes, R. M. C. (2000). Los agaves. México. 63-66 y 73.

Díaz, M. D. M., Córdova, L. J. A., Valle, R. J. O. (2011). Efecto interactivo de las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico en la fermentación de jugo de agave con *kloeckera africana*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Guadalajara, Jalisco.

Díaz, M. D. M., Délia M.L., Estarrón, E. M. y Strehaiano, P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*. 42-7:608-616.

Durán, H. y Pulido, J. (2007). Análisis de la molienda en el proceso de elaboración de mezcal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). San Luis Potosí, México.48.

Fleet, G.H. y Heard, G.M. (1993) Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Galindo E., Peña C. y Serrano C. L. (2008). Domesticar microorganismos en un biorreactor: Los retos del bioingeniero. México. 1-4, 6, 8-10.

Galindo F. E. (2008). Aspectos de ingeniería en fermentaciones: como mezclar gases, líquidos y sólidos. México. 1-5.

- Moo-Young, M. y Chisti, Y. (1994). Biochemical engineering in biotechnology. Pure and Appl. Chem. 117-136.
- Molina, G. J. A., Botello, A. J. E., Estrada, B. A., Navarrete, B. J. L., Jiménez, I. H., Cárdenas, M. M. y Rico, M. R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. Celaya, Gto. México. 43.
- Kunkee, R. E. y Amerine, M. (1970) Yeasts in winemaking. In: The Yeasts, vol 3: Yeast Technology. (Eds.A.H. Rose y J.S. Harrison) pp. 5-72. Academic Press, London.
- Kunkee, D. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. Food Microbiology. 1:315-332.
- Lafon, L. S. (1983). Wine and brandy. In: Biotechnology, vol 5: Food and Feed Production with Microorganisms. (Eds. H.J. Rehm y G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie, Weinheim.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. Am. J. Enol. Vitic. 42, 141-144.
- Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T. (1990). A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). J. Food Sci. 55, 114-122.
- Ribéreau, G. J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. y Sudraud, P. (1975) Sciences et Techniques du Vin, vol. 2. Dunod, Paris.
- Ribéreau, G. P. (1985). New developments in wine microbiology. Am. J. Enol. Vitic. 36, 1-10.

- Schütz, M. y Gafner, J. (1994) .Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. Lett. Appl. Microbiol. 19, 253-257.
- Tesevié, V., Nikicevié, N., Jovanovié, A., Djokovié, D., Vujisié, L., Vuckovié, I., y Bonié, M. (2005). Volatile Components from Old Plum Brandies. Food Technology and Biotechnology. 43 (4), 367-372.
- Torija M. M. J. (2002). Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. 5-7
- UNEP, WCMC, Grupo de Estudio Ambientales. (2002). Informe de mercadeo maguey/mezcal. México. 3-18.
- Valle, R. J.O., Córdova J.A., Estarrón, E. M., Hernández, C. G. y Díaz, M. D. M. (2009). Effect of the amino-acids supplementation on the *Agave tequilana* juice fermentation by *Kloeckera africana* in batch and continuous cultures. En revisión por Journal of the Science of Food and Agriculture.
- Zambonelli, C. (1988). Microbiología e Biotecnología dei Vini. Edagricole, Bologna.

## LIBROS

- Chan, E. C. S., Pelkzar, M. J. y Reid, R. D. (1981). Microbiología. 4ta Edición. México. 271.
- Doran, P. (1998). Principios de Ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 289-291.
- Gallardo, V. J., Gschaedler, M. A. C., Cházaro, B. M., Tapia, C. E., Villanueva, R. S., Salado, P. J. H., Villegas, G. E., Medina, N. R., Aguirre, O. M. & Vallejo, P. M.

(2008). La producción de mezcal en el estado de Michoacán. México.11, 30-32, 63, 112.

Gutierrez, P. H. y De la vara, S. R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México, D. F. 168-221, 386-420.

Jongensen, A. (1990). Microbiología de las fermentaciones industriales. Séptima Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 22-25.

Owen, P. (1990). Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 27-36.

John, G. C. (2006). Procesos de transporte y principios de procesos de separación. México. 158-173.

Montgomery, D. C. (2004). Diseño y Análisis de experimentos. Universidad Estatal de Arizona. Arizona. 457-461.

Quintero, R. (1981). Ingeniería Bioquímica. Primera edición. Editorial Alambra. México. 33-37.

## **TESIS**

Damián, R. R. M., Chávez, P. M. C., González, H. J. C., Pérez, H. E. (2010). Aislamiento y caracterización molecular y fermentativa de una levadura utilizada para la producción de etanol en la elaboración de mezcal. México.

Álvarez, J. L., Chávez, P. M. C., Damián, R. R. M., González, H. J. C., Ortiz, L. F. (2012). Aislamiento, caracterización molecular y bioquímica del consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica en la producción de mezcal en Michoacán. México.

Serrato, J. O. (2006). Estudio del consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica natural del extracto de *Agave salmiana* para la producción de mezcal en Guanajuato. Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya Guanajuato, México. 1-7.

### **SITIOS WEB**

Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-1994). (1994). Bebidas alcohólicas. Especificaciones. [www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-070-SCFI-1994](http://www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-070-SCFI-1994).

QUADRATIN, Agencia Mexicana de Información y análisis. (2012). Michoacán, México. [www.quadratin.com.mx](http://www.quadratin.com.mx).

SAGARPA, Delegación Oaxaca, SEDAFP del Gobierno del Estado y Consejo Oaxaqueño del Maguey y Mezcal A.C. (2004). Plan rector del sistema producto Maguey-Mezcal. México. 100-101. [www.oedrusoaxaca.gob.mx/padronmagueymezcal/.../planrectorma](http://www.oedrusoaxaca.gob.mx/padronmagueymezcal/.../planrectorma).

## ANEXO A. CÁLCULO DE LA POTENCIA

Los cálculos fueron realizados para un Biorreactor tipo tanque agitado Applikon.

### Fórmulas a utilizar:

#### Número de Reynolds.

$$N'_{Re} = \frac{D_a^2 N \rho}{\mu}$$

Donde:

$N'_{Re}$  = Número de Reynolds del impulsor

$D_a$  = Diámetro del impulsor (agitador)

$N$  = Velocidad de agitación en rev/s

$\rho$  = Densidad del fluido en  $kg/m^3$

$\mu$  = Viscosidad del fluido en  $\frac{kg}{m} \cdot s$

#### Número de Potencia.

$$Np = \frac{P}{\rho N^3 D_a^5}$$

Donde:

$Np$  = Número de Potencia

$P$  = Potencia en J/s

$\rho$  = Densidad del fluido en  $\frac{kg}{m^3}$

$N$  = Velocidad de agitación en  $\frac{rev}{s}$

$D_a$  = Diámetro del impulsor (agitador)

#### DATOS.

$$D_a = 45cm - 0.045$$

$$N_1 = 50 rpm - 0.833333/seg$$

$$N_1 = 100 rpm - 1.66667/seg$$

$$N_1 = 150 \text{ rpm} - 2.5/\text{seg}$$

$$\rho_{12^\circ\text{Brix}} = 1057.9923 \text{ kg/m}^3$$

$$\mu_{12^\circ\text{Brix}} = 1.51 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$$

### CÁLCULO DEL NÚMERO DE POTENCIA PARA 50 RPM (0.8333 RPS).

Calculando el Número de Reynolds:

$$N'_{Re} = \frac{(0.045)^2 * \left(\frac{0.833333}{\text{seg}}\right) (1057.9923 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3})}{1.51 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}}$$

$$N'_{Re} = 1182.35$$

Obteniendo el número de potencia del gráfico (figura 3.4-5. Página 163. Procesos de Transporte y Principios de Procesos de Separación. (Geankoplis, 2006).

$$Np = 4$$

Despejando P (potencia del impulsor) de la fórmula para Np:

$$P = Np \rho N^3 D_a^5$$

$$P = (4) * \left(1057.9923 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right) * \left(\frac{0.833333}{\text{seg}}\right)^3 * (0.045)^5$$

$$P = 4.52 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \frac{\text{m}^2}{\text{s}^3} = 4.52 \times 10^{-4} \text{ Watts (W)}$$

Y por tener dos turbinas en un mismo eje  $P_f = P * 1.9$  (Procesos de Transporte y Principios de Procesos de Separación (Geankoplis, 2006). Página 164.

Por lo tanto:

$$P = 8.586 \times 10^{-4} \text{ W} = 8.586 \times 10^{-7} \text{ kW}$$

### CÁLCULO DEL NÚMERO DE POTENCIA PARA 100 RPM (1.6666 RPS).

Calculando el Número de Reynolds:

$$N'_{Re} = \frac{(0.045)^2 * \left(\frac{1.66667}{\text{seg}}\right) (1057.9923 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3})}{1.51 \times 10^{-3} \text{Pa.s}}$$

$$N'_{Re} = 2297.67$$

Obteniendo el número de potencia del grafico (figura 3.4-5. Página 163. Procesos de Transporte y Principios de Procesos de Separación. (Geankoplis, 2006).

$$Np = 4.2$$

Despejando P (potencia del impulsor) de la fórmula para Np:

$$P = Np \rho N^3 D_a^5$$

$$P = (4.2) * \left(1057.9923 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right) * \left(\frac{1.66667}{\text{seg}}\right)^3 * (0.045)^5$$

$$P = 7.2126 \times 10^{-3} \text{kg} \cdot \frac{\text{m}^2}{\text{s}^3} = 7.2126 \times 10^{-3} \text{Watts (W)}$$

Y por tener dos turbinas en un mismo eje  $P_f = P * 1.9$  (Procesos de Transporte y Principios de Procesos de Separación. (Geankoplis, 2006). Página 164.

Por lo tanto:

$$P = 7.2126 \times 10^{-3} \text{W} = 7.2127 \times 10^{-6} \text{kW}$$

### CÁLCULO DEL NÚMERO DE POTENCIA PARA 150 RPM (2.5 RPS).

Calculando el Número de Reynolds:

$$N'_{Re} = \frac{(0.045)^2 * \left(\frac{2.5}{\text{seg}}\right) (1057.9923 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3})}{1.51 \times 10^{-3} \text{Pa.s}}$$

$$N'_{Re} = 3547.07$$

Obteniendo el número de potencia del grafico (figura 3.4-5. Página 163. Procesos de Transporte y Principios de Procesos de Separación. (Geankoplis, 2006).

$$Np = 4.5$$

Despejando P (potencia del impulsor) de la fórmula para Np:

$$P = Np \rho N^3 D_a^5$$

$$P = (4.2) * \left( 1057.9923 \frac{kg}{m^3} \right) * \left( \frac{2.5}{seg} \right)^3 * (0.045)^5$$

$$P = 1.3727 \times 10^{-2} kg \cdot \frac{m^2}{s^3} = 1.3727 \times 10^{-2} Watts (W)$$

Y por tener dos turbinas en un mismo eje  $P_f = P * 1.9$  (Procesos de Transporte y Principios de Procesos de Separación. (Geankoplis, 2006). Página 164.

Por lo tanto:

$$P = 2.608 \times 10^{-2} W = 2.61 \times 10^{-5} kW$$

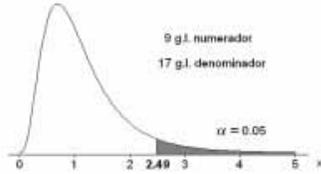
# ANEXO B. TABLA DE FISHER



Centro de Ciencias Básicas  
Departamento de Estadística

$\alpha = 0.05$

VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN F



Grados de libertad del denominador	Grados de libertad del numerador																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	25	30	40	60	120	240	1000
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	243.90	245.95	248.02	249.26	250.10	251.14	252.20	253.25	253.79	254.19
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.46	19.46	19.47	19.48	19.49	19.49	19.49
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.63	8.62	8.59	8.57	8.55	8.54	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.18	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.64	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.52	4.50	4.46	4.43	4.40	4.38	4.37
6	5.99	5.14	4.75	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.83	3.81	3.77	3.74	3.70	3.69	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.40	3.38	3.34	3.30	3.27	3.25	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.11	3.08	3.04	3.01	2.97	2.95	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.89	2.86	2.83	2.79	2.75	2.73	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.73	2.70	2.66	2.62	2.58	2.56	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.60	2.57	2.53	2.49	2.45	2.43	2.41
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.50	2.47	2.43	2.38	2.34	2.32	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.41	2.38	2.34	2.30	2.25	2.23	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.34	2.31	2.27	2.22	2.18	2.15	2.14
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.28	2.25	2.20	2.16	2.11	2.09	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.23	2.19	2.15	2.11	2.06	2.03	2.02
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.18	2.15	2.10	2.06	2.01	1.99	1.97
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.14	2.11	2.06	2.02	1.97	1.94	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.90	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.07	2.04	1.99	1.95	1.90	1.87	1.85
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.84	1.82
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.02	1.98	1.94	1.89	1.84	1.81	1.79
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.00	1.96	1.91	1.86	1.81	1.79	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.97	1.94	1.89	1.84	1.79	1.76	1.74
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.74	1.72
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.94	1.90	1.85	1.80	1.75	1.72	1.70
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.92	1.88	1.84	1.79	1.73	1.70	1.68
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.68	1.66
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.89	1.85	1.81	1.75	1.70	1.67	1.65
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.88	1.84	1.79	1.74	1.68	1.65	1.63
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.78	1.74	1.69	1.64	1.58	1.54	1.52
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.95	1.87	1.78	1.73	1.69	1.63	1.58	1.51	1.48	1.45
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.69	1.65	1.59	1.53	1.47	1.43	1.40
80	3.96	3.11	2.72	2.49	2.33	2.21	2.13	2.06	2.00	1.95	1.88	1.79	1.70	1.64	1.60	1.54	1.48	1.41	1.37	1.34
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93	1.85	1.77	1.68	1.62	1.57	1.52	1.45	1.38	1.33	1.30
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.60	1.55	1.50	1.43	1.35	1.31	1.27
1000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.11	2.02	1.95	1.89	1.84	1.76	1.68	1.58	1.52	1.47	1.41	1.33	1.24	1.18	1.11

## ANEXO C. PARTICIPACIONES DIVERSAS

1. **Nombre:** I Simposium en Biotecnología Alimentaria y Ambiental.  
**Tipo:** Simposium.  
**Fecha:** 13 de mayo del 2011.  
**Lugar:** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.  
**Participación:** Asistencia.
  
2. **Nombre:** 1er. Congreso Nacional de Investigación en Ciencias y Tecnología en Ingeniería Bioquímica.  
**Tipo:** Congreso.  
**Fecha:** 13 de mayo del 2011.  
**Lugar:** Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Michoacán.  
**Participación:** Ponencia y asistencia.
  
3. **Nombre:** Segundo Foro Académico del Posgrado en ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Michoacana.  
**Tipo:** Foro.  
**Fecha:** 18 – 20 de mayo de 2011.  
**Lugar:** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.  
**Participación:** Ponencia y asistencia.
  
4. **Nombre:** XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.  
**Tipo:** Congreso.  
**Fecha:** 19 – 24 de junio del 2011.  
**Lugar:** Juriquilla, Querétaro, Querétaro.  
**Participación:** Presentación de cartel y asistencia.
  
5. **Nombre:** 3er Congreso internacional de Biología, Química y Agronomía: “Aportes de la Química a las Ciencias Biológicas y Agronómicas”.  
**Tipo:** Congreso.  
**Fecha:** 28 de Septiembre – 01 de Octubre del 2011.  
**Lugar:** Universidad Autónoma de Guadalajara. Zapopan, Jalisco.  
**Participación:** Cartel.
  
6. **Nombre:** 29<sup>TH</sup> International Specialised Symposium on Yeasts.  
**Tipo:** Simposium.  
**Fecha:** 29 de Agosto – 2 de septiembre del 2011.  
**Lugar:** Guadalajara, Guadalajara.  
**Participación:** Ponencia.
  
7. **Nombre:** Curso teórico – práctico de Cromatografía de Gases, Asequim.  
**Tipo:** Curso teórico – práctico.  
**Fecha:** 8 – 9 de septiembre del 2010.

**Lugar:** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

8. **Nombre:** Curso teórico-práctico de espectroscopia infrarroja en el Spectrum 100S.  
**Tipo:** Curso teórico – práctico.  
**Fecha:** 25 y 26 de febrero del 2011.  
**Duración:** 16 horas.  
**Lugar:** Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Michoacán.
9. **Nombre:** Curso teórico-práctico de espectroscopia UV/VIS, aplicaciones y uso de equipo Perkin Elmer Lambda 35.  
**Tipo:** Curso teórico – práctico.  
**Fecha:** 16 y 17 de enero del 2012.  
**Duración:** 16 horas.  
**Lugar:** Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Michoacán.