



---

---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA PARA EL DESARROLLO DE  
INÓCULOS EN LA PRODUCCIÓN DE MEZCAL**

**TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTA**

**JORGE TOVAR RODRÍGUEZ**

**ASESOR: DRA. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA  
COASESOR: M. EN C. EDGAR LEÓN ESPARZA IBARRA**

**MORELIA, MICHOACÁN MÉXICO. NOVIEMBRE DE 2010**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO	2
AGRADECIMIENTOS	5
FINANCIAMIENTO	5
GLOSARIO	6
RELACIÓN DE TABLAS	11
RELACIÓN DE FIGURAS	13
NOMENCLATURA	17
RESUMEN	19
ABSTRACT	20
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	21
1.1 Introducción	21
1.2 Justificación	23
1.3 Objetivos	23
1.3.1 Objetivo general	23
1.3.2 Objetivos particulares	24
1.4 Hipótesis de la investigación	24
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO	25
2.1 Definiciones	25

2.2 Proceso de obtención del mezcal	26
2.3 Parámetros que afectan la fermentación	27
2.4 Modelos matemáticos en la descripción de la cinética de crecimiento	31
2.5 Diseño experimental de modelos de superficie de respuesta	36
2.6 Diseño experimental Box-Behnken	38
<b>CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA Y DESARROLLO</b>	<b>39</b>
3.1 Metodología	39
3.2 Ajuste de datos multivariados por el método de los Mínimos Cuadrados	42
3.3 Desarrollo de un programa en MatLab para determinar distintas superficies de respuesta	43
3.3.1 Algoritmo de solución del problema	43
<b>CAPÍTULO 4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>45</b>
4.1 Comportamiento cinético del crecimiento celular	45
4.2 Estudio de las superficies de respuesta	52
4.3 Ajuste de las cinéticas de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato	65
<b>CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>72</b>
5.1 Conclusiones	72
5.2 Recomendaciones para trabajos futuros	73
<b>REFERENCIAS</b>	<b>74</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>81</b>
A1. Determinación de azúcares reductores por el método del ácido	81

dinitrosalicílico

A2. Determinación de nitrógeno amoniacal	82
A.3 Regresión Multilineal	83
A4. Pseudocódigo en MatLab	86
A5. Evaluación de Azúcares con el Refractómetro	88
A6. Cinéticas experimentales	89
A7. Ajuste de datos experimentales para la Biomasa	98

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, Anita Rodríguez Gaona, por la motivación para poder hacer realidad mis sueños.

A mi asesora, la Dra. María Carmen Chávez Parga, por inspirar metas, encauzar objetivos y contagiar en mí la pasión de trabajar por realizarlos.

Al Dr. Rafael Maya Yescas y a la M. en C. Guadalupe Martínez Hernández, por sus precisas y puntuales observaciones que complementaron este trabajo.

A mi compañero y amigo, René Leobardo Martínez Corona, por compartirlo todo conmigo.

## **FINANCIAMIENTO**

Agradecimiento particular a la CIC (Coordinación de la Investigación científica 2008 - UMSNH) y al PROMEP por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de este trabajo.

## GLOSARIO

**Alcohol deshidrogenasas (ADH):** Son un grupo de siete enzimas deshidrogenasa que se producen en muchos organismos y facilitan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH. Su función principal en los seres humanos y muchos otros animales es romper alcoholes que de otra manera podrían ser tóxicos. Algunas alcohol deshidrogenasas catalizan la reacción opuesta, como parte de la fermentación para garantizar un suministro constante de  $\text{NAD}^+$  (Sanghani y col., 2002).

**Atasco de la Fermentación o Stuck Fermentation:** Fenómeno que ocurre cuando la levadura se inactiva antes de que la fermentación se haya completado. Es un hecho no intencional y no deseado que puede conducir a que el producto alcohólico esté dañado. Las causas más comunes son temperaturas altas que matan las levaduras o un mosto deficiente de nitrógeno necesario para que la levadura prospere. Una vez que la fermentación se atasca, es muy difícil reiniciar debido a los compuestos químicos liberados por las células que mueren, ya que inhiben el crecimiento futuro de las levaduras en el lote (Robinson, 2006).

**Autolisis:** Más conocido como auto-digestión, se refiere a la destrucción de una célula a través de la acción de sus propias enzimas. También puede hacer referencia a la digestión de una enzima por otra molécula de la misma enzima.

**Azúcar Reductor:** Es todo el azúcar que, en una solución, tiene un grupo aldehído o un grupo cetona. Esto permite que el azúcar actúe como agente reductor, por ejemplo en la reacción de Maillard y la reacción de Benedict.

**Biomasa:** Es la cantidad de masa que posee un organismo vivo o recientemente vivo.

**Bioquímica:** Es el estudio de los procesos químicos en los organismos vivos. Trata de las estructuras y funciones de los componentes celulares tales como proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas.

**Cepa:** Es una variante genotípica de una especie o, propagada por clonación, que conserva las cualidades que definen a la especie misma.

**Constante:** Término o valor que no cambia en el contexto de su uso.

**Crecimiento exponencial:** En un cultivo, el número de microorganismos crecerá exponencialmente hasta que un nutriente esencial se haya agotado. La reproducción del organismo se puede dar de múltiples maneras, siendo la más común, cuando un primer organismo se divide en dos organismos hijo, y así sucesivamente.

**Destilación:** Es un método de separación de mezclas basado en su diferente volatilidad, en una mezcla de líquido en ebullición. La destilación es una operación unitaria o proceso de separación física, y no una reacción química.

**Enzima:** Son proteínas que catalizan (es decir, aumentar las velocidades de) las reacciones químicas (Smith y col., 1997; Grisham y col., 1999). En las reacciones enzimáticas, las moléculas presentes al inicio del proceso son llamadas sustratos, y la enzima los convierte en moléculas diferentes, denominados los productos. Se sabe que catalizan más de 4000 reacciones bioquímicas (Bairoch, 2000)

**Estrés osmótico:** Es un cambio repentino en la concentración de soluto alrededor de una célula, causando un rápido cambio en el flujo de agua a través de su membrana celular. En condiciones de altas concentraciones de sales, sustratos o cualquier soluto en el sobrenadante, el agua es extraída de las células por ósmosis, inhibiendo el transporte de sustratos y cofactores en la célula, haciendo que ésta colapse. Por otra parte, a bajas concentraciones de solutos, el agua entra en la célula en grandes cantidades, haciendo que se hinche y reviente por apoptosis y por ende muera (Lang y col., 2005).

**Fermentación alcohólica:** Es un proceso biológico en el que los azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa se convierten en energía celular y por efecto de organismos como las levaduras, se producen etanol y dióxido de carbono como productos de desecho metabólico (Stryer, 1975). Debido a que las levaduras realizan este proceso en ausencia de oxígeno, la fermentación del etanol está clasificada como anaeróbica.

**Glicólisis:** También conocida como glucólisis, es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la levadura. Consiste en 10 reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo (Nelson y Cox, 2004).

**Glucosa:** ( $C_6H_{12}O_6$ ) Es un azúcar simple (monosacárido), y un carbohidrato muy importante en la biología. Las células lo utilizan como una fuente de energía y es además

un intermediario metabólico. La glucosa es uno de los principales productos de la fotosíntesis.

**Hidrólisis:** Reacción química durante el cual las moléculas de agua ( $H_2O$ ) se dividen en cationes hidrógeno ( $H^+$ ) y aniones hidroxilo ( $OH^-$ ) en el proceso de un mecanismo químico (Richens, 1997); es el tipo de reacción que se utiliza para romper algunos polímeros.

**Inóculo:** Desarrollo de una cepa de levaduras en condiciones controladas a manera de garantizar que se reproduzcan a una tasa superior a la normal y que todas ellas sean viables para el proceso de fermentación.

**Inulina:** Es un grupo de polisacáridos naturales producidos por muchos tipos de plantas (Roberfroid, 2005). Se utilizan típicamente para almacenar energía.

**Levadura:** Las levaduras son microorganismos eucarióticos clasificados en el reino Fungi, con más de 1500 especies descritas en la actualidad (Kutzman y Fell 2006) y que según se estima, son sólo el 1% de todas las especies de levadura. La mayoría (Kutzman y Piskur, 2006) se reproducen asexualmente por gemación y otras lo hacen por fisión binaria. Las levaduras son unicelulares, aunque algunas especies levaduras pueden ser multicelulares.

**Metabolismo:** Es el conjunto de reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos. Estos procesos permiten a los organismos crecer, reproducirse, mantener sus estructuras y responder a sus ambientes. El metabolismo se divide generalmente en dos categorías. Catabolismo, donde se descompone la materia orgánica y el anabolismo, donde se utiliza energía para construir los componentes de las células, como las proteínas y ácidos nucleicos (Smith y Morowitz, 2004).

**Metabolitos:** Son los productos intermedios y productos del metabolismo. El término metabolito suele estar restringido a pequeñas moléculas. Un metabolito primario está directamente implicado en el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. El alcohol es un ejemplo de un metabolito producido en gran escala de la microbiología industrial. En tanto, un metabolito secundario no está implicado en ninguno de estos procesos (Demain 1980).

**Mezcal:** El mezcal es una bebida alcohólica hecha a partir de la fermentación de mostos de agave, en ocasiones añejado en barricas de roble blanco o encino americano.



**Modelo Matemático:** Es una representación de los aspectos esenciales de un sistema existente (o un sistema a construir), que presenta el conocimiento de dicho sistema en una forma utilizable (Eykhoff, 1974).

**Parámetro:** En matemáticas, estadística y las ciencias matemáticas, un parámetro o medida auxiliar, es una cantidad que sirve para relacionar las funciones y variables con una variable común cuando dicha relación sería difícil de explicar con una ecuación.

**Propiedades organolépticas:** Son el conjunto de descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, como por ejemplo su sabor, textura, olor, color. Todas estas sensaciones producen al comer una sensación agradable o desagradable.

**Reacción de Maillard:** Es una reacción química entre un aminoácido y un azúcar reductor, requiriendo usualmente calor. Es de vital importancia en la preparación o presentación de muchos tipos de comida, como la caramelización o pigmentación marrón de los alimentos (Chichester, 1986).

**Relación C/N:** La relación C/N (C: N) o la relación de carbono-nitrógeno es una relación entre la masa de carbono y la masa de nitrógeno en una sustancia. Puede, entre otras cosas, utilizarse en el análisis de los sedimentos o sustratos. Las proporciones de carbono-nitrógeno son un indicador de limitación de nitrógeno de un medio.

**Represión catabólica:** Es la inhibición de la síntesis de enzimas implicadas en el catabolismo de las fuentes de carbono, permitiendo que aquéllas que no sean las preferidas, se sintetizen con mayor rapidez. (Deutscher, 2008).

**Respiración Aeróbica:** Es un tipo de metabolismo energético en el que los seres vivos extraen energía de moléculas orgánicas, como la glucosa, por un proceso complejo por el cual el carbono es oxidado y el oxígeno procedente del aire es el oxidante empleado.

**Respiración Anaeróbica:** Es un proceso biológico de oxidorreducción de monosacáridos y otros compuestos donde el aceptor terminal de electrones es una molécula inorgánica distinta del oxígeno, y más raramente una molécula orgánica (Lawrence y Holmes, 1989). La realizan exclusivamente algunos grupos de bacterias y para ello utilizan una cadena transportadora de electrones análoga a la de las mitocondrias en la respiración aeróbica (Madigan y col., 2003)

**Sustrato:** Es una molécula en la que actúa una enzima. Las enzimas catalizan reacciones químicas que involucran al sustrato. En el caso de un solo sustrato, éste se une con el sitio activo de la enzima para formar un complejo enzima-sustrato. El sustrato se transforma en uno o más productos, que luego se liberan en el sitio activo. El sitio activo es libre de aceptar otra molécula de sustrato. En las enzimas con más de un sustrato, éstos se unen en un orden particular en el centro activo, antes de reaccionar juntos para producir otros productos.

**Variable:** es un símbolo que representa un valor que puede variar, el término generalmente se presenta en oposición a la constante, lo que es un símbolo de un valor no varía, es decir, completamente fijo o fijo en el contexto de uso.

## RELACIÓN DE TABLAS

	Página
3.1-1a. Diseño Experimental Box Behnken Codificado	41
3.1-1b. Diseño Experimental Box Behnken Decodificado	41
4.2-1a. Valores iniciales de pH y Nitrógeno Amoniacal	53
4.2-1b. Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques.	53
4.2-1c. Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y $r^2$	53
4.2-1d. Matriz de Diseño	54
4.2-2a. Valores iniciales de pH y Azúcares (°Brix)	55
4.2-2b. Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques	55
4.2-2c. Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y $r^2$	55
4.2-2d. Matriz de Diseño	56
4.2-3a. Valores iniciales de Azúcares (°Brix) y Nitrógeno Amoniacal	57
4.2-3b. Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques	57
4.2-3c. Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y $r^2$	57
4.2-3d. Matriz de Diseño	58
4.2-4a. Valores iniciales de pH, Azúcares (°Brix) y Nitrógeno Amoniacal	59
4.2-4b. Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques	59
4.2-4c. Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y $r^2$	59
4.2-4d. Matriz de Diseño	60
4.2-5. Análisis de Varianza ANOVA	61
4.2-6. Ensayo confirmatorio	65
4.3-1. Coeficiente de Rendimiento $Y_{x/s}$ g de biomasa * g de azúcar <sup>-1</sup> para los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3)	68

4.3-2. Coeficiente de mantenimiento, m para el azúcar obtenido con los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3)	69
4.3-3. Coeficiente de Rendimiento $Y_{x/n}$ g de biomasa * g de nitrógeno <sup>-1</sup> para los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3)	70
4.3-4. Coeficiente de mantenimiento, m para el nitrógeno obtenido con los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3)	71

## RELACIÓN DE FIGURAS

	Página
2.1. Etapas típicas del proceso de obtención del mezcal	26
2.2. Etapas típicas del crecimiento celular en un cultivo por lotes	31
4.1-1a. Comportamiento de pH en matraces 1 a 5	45
4.1-1b. Comportamiento de pH en matraces 6 a 10	46
4.1-1c. Comportamiento de pH en matraces 11 a 15	46
4.1-2a. Consumo de azúcares reductores para los matraces 1 a 5	47
4.1-2b. Consumo de azúcares reductores para los matraces 6 a 10	47
4.1-2c. Consumo de azúcares reductores para los matraces 11 a 15	48
4.1-3a. Cantidad de Sulfato de Amonio presente en matraces 1 a 5	49
4.1-3b. Cantidad de Sulfato de Amonio presente en matraces 6 a 10	49
4.1-3c. Cantidad de Sulfato de Amonio presente en matraces 11 a 15	50
4.1-4a. Biomasa producida por unidad de volumen en matraces 1 a 5	50
4.1-4b. Biomasa producida por unidad de volumen en matraces 6 a 10	51
4.1-4c. Biomasa producida por unidad de volumen en matraces 11 a 15	51
4.2-5a. Superficie de Respuesta y contorno para la producción de Biomasa en función del Sustrato (azúcar) y el pH	63

4.2-5b. Superficie de Respuesta y contorno para la producción de Biomasa en función del Sustrato C (azúcar) y el Sustrato N (nitrógeno amoniacal)	63
4.2-5b. Superficie de Respuesta y contorno para la producción de Biomasa en función del pH y el Sustrato N (nitrógeno amoniacal)	64
4.3-1. Ajuste de Datos experimentales de Biomasa para la prueba confirmatoria, con los modelos de Monod, Logístico, Contois y de Gompertz de dos y tres parámetros	66
4.3-2. Ajuste del consumo de Azúcar para la prueba confirmatoria, con los modelos de Monod, Logístico, Contois y de Gompertz de dos y tres parámetros	66
4.3-3. Ajuste del consumo de Nitrógeno Amoniacal para la prueba confirmatoria, con los modelos de Monod, Logístico, y Gompertz de dos y tres parámetros	67
A6-1. Datos Experimentales para el Matraz 1; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	89
A6-2. Datos Experimentales para el Matraz 2; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	89
A6-3. Datos Experimentales para el Matraz 3; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	90
A6-4. Datos Experimentales para el Matraz 4; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	90
A6-5. Datos Experimentales para el Matraz 5; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	91
A6-6. Datos Experimentales para el Matraz 6; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	91
A6-7. Datos Experimentales para el Matraz 7; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	92
A6-8. Datos Experimentales para el Matraz 8; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	92
A6-9. Datos Experimentales para el Matraz 9; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	93
A6-10. Datos Experimentales para el Matraz 10; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	93

A6-11. Datos Experimentales para el Matraz 11; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	94
A6-12. Datos Experimentales para el Matraz 12; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	94
A6-13. Datos Experimentales para el Matraz 13; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	95
A6-14. Datos Experimentales para el Matraz 14; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	95
A6-15. Datos Experimentales para el Matraz 15; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	96
A6-16. Datos Experimentales para el Matraz 16; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	96
A6-17. Datos Experimentales para el Matraz 17; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH	97
A7-1. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 1 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	98
A7-2. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 2 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	98
A7-3. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 3 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	99
A7-4. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 4 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	99
A7-5. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 5 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	100
A7-6. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 6 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	100

## Logístico

A7-7. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 7 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	101
A7-8. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 8 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	101
A7-9. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 9 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	102
A7-10. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 10 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	102
A7-11. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 11 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	103
A7-12. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 12 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	103
A7-13. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 13 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	104
A7-14. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 14 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	104
A7-15. Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 15 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico	105



## NOMENCLATURA

Símbolo		Unidades
A	Parámetro A diseño Box Behnken, pH	-
B	Parámetro B diseño Box Behnken, azúcares	°Brix
C	Parámetro C diseño Box Behnken, nitrógeno amoniacal	g sulfato de amonio.
$A$	Constante empírica del modelo de crecimiento para el modelo de Gompertz de tres parámetros	$h^{-1}$
$B$	Constante de saturación de Contois	$h^{-1}$
$Dx$	Diferencial de la concentración de biomasa	g biomasa
$Ds$	Diferencial de la concentración de sustrato	g sustrato
$Dt$	Diferencial del tiempo	h
ECM	Error cuadrático Medio	-
$k$	Parámetro cinético de la ecuación de Gompertz de dos y tres parámetros	$h^{-1}$
$Ks$	Constante de Monod	$h^{-1}$
$m_s$	Coefficiente de Mantenimiento celular	g sustrato $h^{-1}$
$t$	Tiempo	h
$x$	Concentración de biomasa	g/L
$x_0$	Concentración de biomasa inicial	g/L
$x_i$	Variables que representan el factor $i$	-
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimiento para el Carbono	g biomasa/g azúcar
$Y_{x/n}$	Coefficiente de rendimiento para el Nitrógeno	g biomasa/g nitrógeno
S	Concentración de Sustrato	g sustrato/L
SC	Suma de cuadrados	-
SRC	Sumatoria de Residuales al cuadrado	-
GI	Grados de libertad	-
MC	Cuadrados medios	-
F	Valor de distribución de probabilidad	-

$p$	Valor estadístico de la prueba $p$	-
$r$	Parámetro de ajuste de datos.	-
$R^2$	Parámetro de ajuste de datos.	-

#### Símbolos griegos

$\beta_0$	Parámetro correspondiente a un modelo lineal de la ecuación 3.5.1 y 3.5.2	-
$\beta_1$	Parámetro correspondiente asociado a una función no lineal de la ecuación 3.5.1.	-
$\beta_2$	Parámetro correspondiente asociado a una función no lineal de la ecuación 3.5.1.	-
$\varepsilon$	Término de error aleatorio	-
$\mu$	Velocidad de Crecimiento específica inicial	$h^{-1}$
$\mu_{max}$	Constante específica de velocidad de crecimiento máxima	$h^{-1}$

## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN CINÉTICA PARA EL DESARROLLO DE INÓCULOS EN LA PRODUCCIÓN DE MEZCAL

Por: Jorge Tovar Rodríguez

Se puede señalar que el crecimiento adecuado de la levadura, previo a la etapa de fermentación, es un paso crítico en el proceso de elaboración del mezcal. Se enfatiza que el desarrollo del inóculo mejora significativamente los rendimientos, la productividad y el tiempo de fermentación. En la actualidad existen pocos reportes en la literatura sobre el impacto del Nitrógeno en la fase de crecimiento exponencial de las levaduras. Aunque se emplean diferentes fuentes de nitrógeno como el cloruro y el sulfato de amonio, no se ha monitoreado su consumo durante el desarrollo de inóculos. Se planteó un diseño de experimentos tipo Box Behnken, teniendo como variables el pH, la concentración de azúcar (jugo de agave, variedad azul) y la concentración de nitrógeno amoniacal (sulfato de amonio) a diferentes niveles, donde la variable de respuesta es la biomasa producida. La fermentación se llevó en una incubadora con agitación mecánica, a 200 rpm durante 24 horas, se tomaron muestras cada 4 horas efectuándose las siguientes determinaciones: comportamiento del pH, concentración de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), concentración de biomasa por el método de peso seco, concentración de nitrógeno amoniacal, usando una técnica colorimétrica.

A partir del análisis estadístico del diseño Box-Behnken, se encontró que las variables más significativas durante la generación del inóculo son la concentración de azúcar, la concentración de nitrógeno amoniacal añadido y por último el pH; encontrando que las condiciones que maximizan la producción de biomasa son: pH de 4.5, concentración de azúcar en 9° Brix y 1.33 g sulfato de amonio/l de medio de cultivo; el tiempo en que se alcanza la máxima producción de levaduras es de 20 horas, a partir de ese momento, la cantidad de biomasa se ve afectada en mayor proporción por la producción de alcohol que inhibe su crecimiento, el agotamiento del sustrato y los desechos propios del metabolismo celular. El valor teórico obtenido a partir del modelo del diseño estadístico para la producción de biomasa fue de 10.4 g de levaduras/l y el valor máximo producido en la etapa de pruebas confirmatorias fue de 9.78 g/l; los valores medios encontrados para el cociente de rendimiento son de 11.61 g de biomasa \* g azúcar<sup>-1</sup>, y de 3.09 g de biomasa \* g de nitrógeno<sup>-1</sup>. Además, se reportan valores de 0.0016 para el coeficiente de mantenimiento con respecto al azúcar y de 0.001152 con respecto al nitrógeno como sustrato. La velocidad específica de crecimiento media es de 0.47h<sup>-1</sup>.

Asesor: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga

Coasesor: M. C. Edgar León Esparza Ibarra.

## ABSTRACT

### KINETIC DESCRIPTION FOR INOCULUMS DEVELOPMENT IN MEZCAL PRODUCTION

By: Jorge Tovar Rodríguez

It is possible to point out that an adequate yeast development previous to the fermentation process is a mezcal production critical step. Inoculum development increases productivity and efficiency as well as fermentation time. Very few reports can be found regarding nitrogen influence during yeast growth phase. Although many nitrogen sources are used such as chloride and ammonium sulfate, its consumption has not been analyzed nor have they been determined during an inoculum development. An experimental Box-Behnken design was set up having as variables pH, sugar concentration (blue agave juice) and ammoniacal nitrogen (as ammonium sulfate) at various levels, where the response variable is the biomass produced. Fermentation was carried out in an incubator shaker at 200 rpm during 24 hours. Samples were taken each four hours and the following tests were made: pH ongoing, reducing sugars concentration using the dinitrosalicylic acid method (DNS), biomass concentration through dry weight method and ammoniacal nitrogen concentration using a colorimetric technique.

From Box-Behnken design's statistical analysis, it was found that the most significant variables affecting inoculums development are sugar concentration and ammoniacal nitrogen, followed by initial pH; it is possible to report that the conditions maximizing biomass are pH equal to 4.5, initial sugar concentration as 9° Brix and 1.33 g of ammonium sulfate per liter of culture. Maximum yeast production is reached after 20 hours of fermentation, and from this moment biomass production is severely affected by alcohol production, substrate consumption and cellular metabolism wastes. Theoretical value obtained from statistic analysis of the model representing biomass production is defined as 10.4 g of yeast/l. Meanwhile, the maximum value reached was 9.78 g of yeast per liter during confirmatory essays. Efficiency values were found as 11.61 g of yeast/g of sugar and 3.09 g of yeast/g of nitrogen. Besides the aforementioned values, maintenance coefficients can be reported as 0.0016 considering sugar as substrate and 0.001152 considering nitrogen as substrate. Medium growth specific rate was found to be  $0.47\text{h}^{-1}$ .

Advisor: Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga.

Co-advisor: M. C. Edgar León Esparza Ibarra.

# CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Introducción

La palabra levadura viene del antiguo vocablo inglés, *gyst*, que significa hervir, espuma o burbujas. Las levaduras son probablemente los primeros microorganismos domesticados por el hombre. La gente ha utilizado históricamente las levaduras para la fermentación y para el horneado. Se han hallado evidencias arqueológicas en ruinas egipcias que constan de piedras de moler y hornear y cámaras donde se elaboraba pan con levaduras, así como dibujos de 4.000 años de antigüedad (Phillips, 2009). En 1680 el holandés Anton van Leeuwenhoek las observó al microscopio por primera vez y en 1857 el microbiólogo francés Louis Pasteur demostró en el documento "*Mémoire sur la fermentation alcoolique*" que la fermentación alcohólica es realizada por levaduras (organismos vivos) y no por un catalizador químico (Barnett, 2003).

La historia del empleo de las levaduras por el hombre, las relaciona invariablemente a la producción alcohólica; se les asocia a bebidas como la cerveza y el vino generalmente. Hoy en día la producción de bebidas alcohólicas es una industria masiva y globalizada que explota varias áreas del conocimiento, como la ecología, la bioquímica y sobre todo la ingeniería química, ligada al proceso de producción de éstas.

El mezcal es, por definición, una bebida regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de agave previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. La peculiaridad de preparar levaduras para el proceso de fermentación se conoce como inoculación, que no es más que el desarrollo de una cepa de levaduras en condiciones controladas a manera de garantizar que se reproduzcan a una tasa superior a la normal y que todas ellas sean viables para el proceso.

Dentro de las levaduras utilizadas, se encuentran en su mayoría cepas nativas, presentes en los mostos de agave, siendo la principal o la más usada, la *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es sin duda el microorganismo de mayor relevancia industrial explotado por el hombre. Ningún otro organismo se halla más relacionado a la

evolución del hombre y la tecnología como *S. cerevisiae* y sus especies cercanas. Su contribución al progreso humano se ha debido principalmente a su capacidad de producir etanol al fermentar carbohidratos.

La caracterización cinética implica conocer o determinar parámetros que describen un fenómeno o que dan idea de su comportamiento o respuesta cuando se somete a un cambio. La caracterización cinética de un fenómeno tan complejo como el crecimiento de un microorganismo implica hacer uso de datos experimentales y obtener un modelo matemático que pueda describir con precisión el fenómeno o característica en estudio. Es frecuente observar una dependencia aproximada entre las variables involucradas en un fenómeno en particular y que además son susceptibles de ser expresadas de forma analítica. La dependencia de ellas se denomina correlación. Para poder llegar a esta abstracción de la realidad, es necesario hacer uso de herramientas de cálculo que permitan relacionar datos y describirlos en una ecuación matemática, o sea, un modelo matemático.

Estos mismos modelos son aproximaciones ampliamente utilizadas y que proporcionan resultados satisfactorios cuando su propósito es analizar, comprender y predecir el funcionamiento de algún sistema en función de las variables que lo controlan o gobiernan su dinámica. Ello da cierto grado de certidumbre cuando se pretende adelantarse al comportamiento de tal sistema, así, los modelos matemáticos gozan de gran popularidad en todas las áreas del conocimiento.

Obtener tal elemento descriptivo de un fenómeno enfrenta la mayoría de las veces el problema de ajustar los datos que se obtienen a partir de la experimentación. El uso de herramientas de cálculo y de métodos numéricos es bastante usado en conjunción con las herramientas computacionales con las que se cuenta. La complejidad del fenómeno involucra en ocasiones hacer consideraciones teóricas o simplificaciones en el estudio. En la medida en que se disponga de una herramienta o método de cálculo que permita llegar a esta abstracción matemática sin recurrir a estas simplificaciones, se garantiza que el error cometido es mínimo y que la representación obtenida se acerca más al fenómeno real.

Así, en este trabajo se pretende dar a conocer los parámetros que intervienen en el desarrollo de un inóculo, basándose en los parámetros cinéticos que describen el

crecimiento celular, lo que permitirá tener una cantidad de levaduras elevada para el proceso de fermentación y mejorar los tiempos de reacción.

## **1.2 Justificación**

En la literatura no se han reportado datos de consumo de nitrógeno durante la etapa de crecimiento exponencial para la *S. cerevisiae* en el proceso de fermentación del mezcal, no obstante de ser una bebida con alto grado de tecnificación en el proceso y de amplia explotación económica en muchas regiones del país y con bastante potencial para otras regiones.

Generar un inóculo adecuado permite normalizar criterios y tener condiciones semejantes previas al inicio del proceso de fermentación, de manera que se esperen resultados semejantes en cuanto a la producción etanólica por lotes.

A pesar de que se hallan diversos modelos que describen el crecimiento de las levaduras, no se ha estudiado el efecto que tienen parámetros como la concentración de azúcar, la cantidad de Nitrógeno añadida (cociente C/N) o el pH de arranque.

Es posible mediante un programa computacional, analizar la dependencia de una variable de respuesta, con respecto a otros parámetros y establecer la influencia que éstos tienen en ella de manera que se pueda determinar si los parámetros elegidos tienen efecto en la producción de biomasa y el efecto combinado de éstos (productos cruzados).

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Realizar la caracterización cinética durante el desarrollo de inóculos en la producción de mezcal, y analizar la superficie de respuesta para estimar los parámetros que garantizan la mayor producción de levaduras viables para el proceso de Fermentación.

### 1.3.2 Objetivos Particulares

- Desarrollar un inóculo previo a la fermentación que permita un mejor control del proceso, basándose en la cinética de crecimiento microbiana, probando diferentes concentraciones de nutrientes (azúcares, nitrógeno) en el medio de crecimiento, así como el efecto del valor de pH.
- Estudiar el efecto de los parámetros del diseño experimental Box-Behnken en la variable de respuesta y proponer modelos que la describan mediante el desarrollo de un programa en Matlab<sup>®</sup>.
- Describir matemáticamente las cinéticas del proceso mediante un modelo de superficie de respuesta que permita encontrar los parámetros de interés como: velocidad específica de crecimiento máxima, coeficientes de consumo de sustrato y rendimiento.

### 1.4 Hipótesis de la investigación

La adición de una fuente de nitrógeno previo a la etapa de crecimiento favorece el proceso de fermentación por una parte y además modificando parámetros tales como la cantidad inicial de azúcar y el pH se puede promover el crecimiento celular por encima de la producción de alcoholes que garantiza tener la mayor cantidad de organismos viables para su posterior inoculación.

Se promoverá el crecimiento celular durante la producción de etanol mediante la fermentación de jugos de agave azul, por *Saccharomyces Cervisiae*, y de tener mayor cantidad de organismos viables en el inóculo del proceso, se manipularán parámetros como el cociente C/N, la cantidad de azúcar suministrada y el pH del medio en la etapa previa al crecimiento del microorganismo.



## **CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Definiciones**

Según la Norma Oficial Mexicana (NOM) 070, el mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de agave, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido. El mezcal es un líquido de olor y sabor suigeneris (sic) de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo. (NOM 070-SCFI-1994).

Esta misma norma reconoce dos tipos de mezcal de acuerdo al porcentaje de los carbohidratos provenientes del agave que se utilicen en su elaboración:

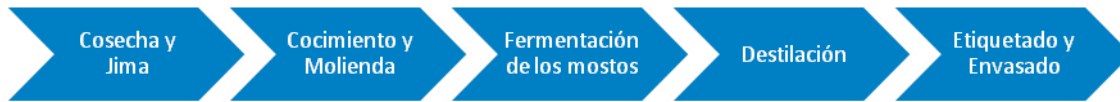
#### **Tipo I.- Mezcal 100% agave**

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

#### **Tipo II.- Mezcal**

Es aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes, conforme al inciso 4.4. Este tipo de mezcal es joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.

## 2.2 Proceso de obtención del mezcal



**Figura 2.1.** Etapas típicas del proceso de obtención del mezcal

En la figura 1.1 podemos identificar las etapas involucradas en el proceso de obtención de mezcal.

El primer paso es la cosecha de agaves maduros y la jima. Durante este proceso se cortan la planta y sus hojas para dejar al descubierto la cabeza. Estas cabezas de agave sin hojas ni raíz también se conocen como piñas. Para bebidas como el tequila, se ha reportado que la edad del agave es un factor importante que afecta la fermentación durante el proceso de elaboración (Pinal y col., 2009).

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

La siguiente etapa es la molienda. Consiste en la extracción del jugo de los agaves cocidos conteniendo los azúcares que serán transformados a etanol durante la fermentación, por lo que esta etapa es fundamental en el rendimiento del proceso. La extracción del jugo contenido en las piñas o cabezas de agave se realiza exprimiéndolas.

Los jugos o mostos de agave obtenidos se someten al proceso de fermentación, mediante el cual se oxidan algunos compuestos orgánicos, tales como los carbohidratos. Los azúcares son los sustratos más comunes de la fermentación (Klein y col., 2005). Para llevar a cabo la

fermentación de bebidas alcohólicas como la cerveza o el vino, se utilizan levaduras; de manera análoga, se producen grandes cantidades de dióxido de carbono.

Para el caso del mezcal, se emplean cepas de levaduras nativas provenientes de los mostos de agave; caracterizando estas cepas se tiene que la levadura que predomina es la *Saccharomyces cerevisiae* y sus variedades.

Dos secuencias fundamentales están involucradas en el metabolismo energético de la *S. cerevisiae*: la glicólisis y la respiración aeróbica. El etanol es un metabolito clave del proceso de metabolismo, siendo un producto final de la glicólisis y de la fermentación etanólica y al mismo tiempo funciona como un sustrato al proveer Carbono necesario durante la respiración aeróbica, y junto con las alcohol deshidrogenasas (ADHs) cataliza la interconversión del acetaldehído y del etanol (Smidt y col., 2008).

### **2.3 Parámetros que afectan la fermentación**

En el proceso de fermentación del tequila, el tipo de cepa de levadura seleccionada, la temperatura de fermentación (30° C a 35° C) y la relación carbono nitrógeno C/N (62 a 188), muestran una influencia significativa en el nivel de alcoholes superiores producidos. Otros parámetros como la fuente de nitrógeno (urea o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y la cantidad de inóculo (5% o 10%) muestran poca o ninguna influencia en la producción de los componentes responsables de las propiedades organolépticas del tequila (Romano y Suzzi, 1993).

Tanto la fuente de nitrógeno seleccionada como la cantidad de inóculo y la combinación de ambos factores, muestran poca o ninguna influencia en la producción de alcoholes isobutílicos o isoamílicos (Berry y Watson, 1991).

La temperatura prueba ser otro factor importante para la elevada producción de alcohol, y la asociación de este parámetro a otras variables, como el tipo de levadura y la relación

C/N. De acuerdo a los datos reportados por Engan (1981), la temperatura tiene un papel crítico en la formación de compuestos volátiles.

Así, resulta claro que uno de los factores más importantes que intervienen en la producción de alcohol, es la cepa utilizada, seguido de la relación C/N y la combinación de ambos factores. Existen diversos reportes acerca de bebidas destiladas y no destiladas que coinciden con estos resultados, los cuales no son atípicos, pues la producción elevada de alcohol es una propiedad intrínseca del metabolismo de cada levadura. Diversos datos de producción de alcohol en levaduras se hallan reportados en la literatura (Engan, 1981; Ramsay y Berry, 1981).

En la levadura, el nitrógeno posee funciones estructurales y funcionales sobre todo como grupo amino en las proteínas y las enzimas. La fuente común suele ser urea, aminoácidos y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Para llevar a cabo la síntesis de proteínas, es fundamental el transporte de azúcares al interior de la célula y para llevar a cabo un transporte más eficiente, el nitrógeno es necesario (Arrizón y Gschaedler, 2002).

En la industria del tequila, la fermentación se lleva a cabo a concentraciones de azúcar que van de los  $50 \text{ gL}^{-1}$  a los  $100 \text{ gL}^{-1}$  (Arrizón y Gschaedler, 2002). En varios estudios se reporta que las concentraciones de azúcar que van de  $120 \text{ gL}^{-1}$  a  $180 \text{ gL}^{-1}$ , muestran un decremento en la viabilidad y crecimiento de las levaduras, sin importar el tipo de cepa utilizada (Bafnacová y col., 1999; Casey e Ingledew, 1986; Ivorra y col., 1999; Xu y col., 1996), fenómeno adjudicado al estrés osmótico de las levaduras (Ivorra y col., 1999). Thomas y col. (1996) estudiaron varias rutas metabólicas bajo estrés osmótico para entender su efecto en el metabolismo de la célula, y hallaron evidencia de que la síntesis de enzimas glicolíticas, encargadas de favorecer la reacción de glicólisis y con ello suministrar energía a la célula, así como la síntesis de enzimas de la hexosa monofosfatada, son reguladas por la cantidad de azúcar y la limitación de nitrógeno.

Otro fenómeno observado es el atasco de la fermentación, (o *stuck fermentation*) relacionado con la inhibición del proceso fermentativo. Se han dado diversas explicaciones para este fenómeno, incluyendo la intoxicación debida a los productos de desecho del

metabolismo, tales como los ácidos hexanóico, octanóico y decanóico (Muñoz e Ingledew, 1990). Por otro lado, se ha comprobado que la adición de nitrógeno reduce este atasco en el proceso (Ingledew y Kunkee, 1985).

Salmon (1989), Mauricio y Salmon (1992) y Salmon y col. (1993), probaron que el principal factor que limita el metabolismo de los procesos fermentativos es la inhibición del transporte de azúcares. La transportación de los azúcares en las levaduras ha sido estudiada con profundidad; se ha caracterizado por la presencia de varios agentes que tienen una afinidad variable por la glucosa (Ciriacy y Reifenberger, 1997). Se ha propuesto que aquéllos que presentan alta afinidad al sustrato pueden sufrir represión catabólica y no pueden ser detectados en fermentaciones efectuadas con elevadas concentraciones de azúcar (Bisson, 1999; Bisson y col., 1987).

Un elemento clave en la síntesis de proteínas es la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Cuando la síntesis de proteínas se inhibe, se inactiva el transporte de azúcares incluso a pesar de que aún existan azúcares en el medio (Bustaria y Lagunas, 1986). Para el caso específico del vino obtenido a partir del jugo de uva, es bien conocido que la falta de nitrógeno asimilable es la causa más recurrente de problemas durante el proceso de fermentación (Ingledew y Kunkee, 1985). Existen muchos estudios acerca del uso de nitrógeno a manera de aminoácidos y amonio además de su impacto en la fermentación alcohólica. Todos ellos coinciden en que si se añade una apropiada fuente de nitrógeno, la fermentación puede ser mejorada al activarse el transporte de los azúcares (Bely y col., 1990; Jiranek y col., 1995; Thomas e Ingledew, 1990). Se puede establecer entonces que una adecuada estrategia de adición de Nitrógeno durante la fermentación, produce la activación del transporte de los azúcares, mejorando así el proceso global, incluso a elevadas concentraciones de azúcar.

Un aspecto fundamental basado en estudios recientes, muestra que los requerimientos de nitrógeno pueden variar de una cepa a otra. (Jiranek y col., 1995; Manginot y col., 1998; Salmon y Mauricio, 1994). Es necesario entonces caracterizar las levaduras aisladas en relación a su requerimiento de nitrógeno de manera que aquella cepa cuya demanda de nitrógeno sea la menor, pueda seleccionarse de entre las demás a modo de optimizar el

proceso. Al incorporar levaduras nativas procedentes de los mostos de agave usados en las fábricas se presenta el problema de la posterior caracterización de las levaduras.

En el caso específico del mezcal, no se hallan reportes relevantes acerca del consumo de nitrógeno en la fermentación. Se puede partir de los datos encontrados para el tequila, pues ambos procesos se pueden considerar análogos. Así, podemos partir de los datos que se reportan para la etapa de fermentación. Por ejemplo, Lachance (1995) determinó las especies de levaduras presentes en el proceso de elaboración de tequila y Pinal y col., (1997) relacionaron el cociente C/N con la producción de alcohol a elevadas concentraciones de azúcar.

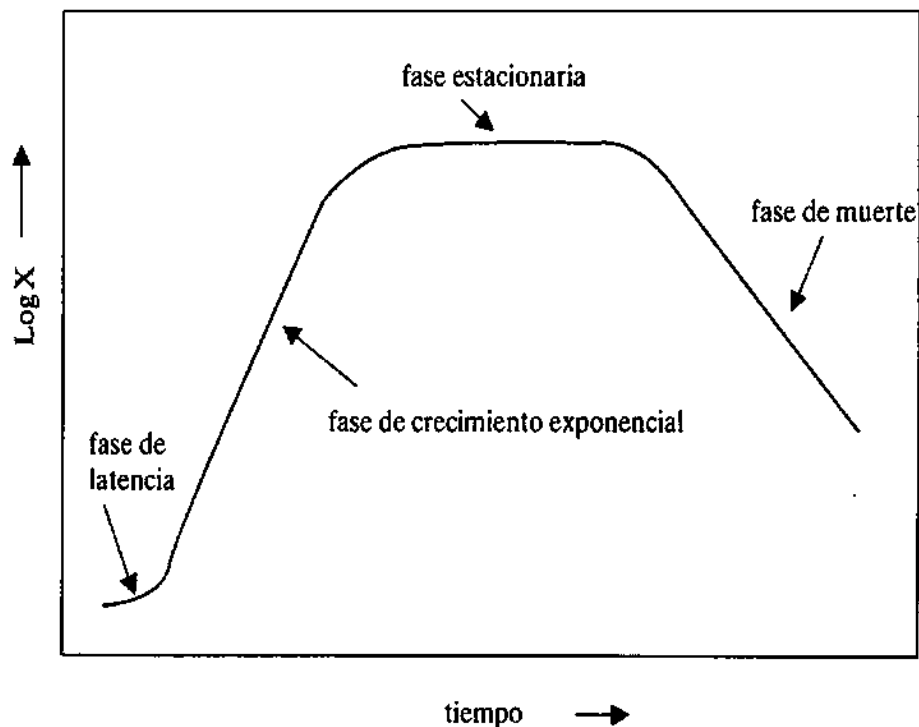
De acuerdo a los datos obtenidos por Arrizón y Gschaedler, (2002), los valores máximos de biomasa obtenidos se producen entre las 20 horas y 30 horas de fermentación, pudiéndose decir que la inoculación es una fermentación incompleta, donde es relevante obtener la mayor cantidad de levaduras posible, todas ellas viables, para posteriormente llevarlas a fermentación, por encima de la producción alcohólica.

Al adicionar una fuente de nitrógeno adicional (en nuestro caso, la sal sulfatada) al inicio de la fermentación, se logra un incremento importante en la eficiencia del proceso y en el tiempo de fermentación. Ello porque el transporte de azúcares es susceptible de ser activado en las etapas tempranas de la fermentación, lo cual es un factor importante porque el nitrógeno es aún asimilable en el medio (Salmon y col., 1998). De manera similar, se ha demostrado que la adición de nitrógeno es más eficiente al inicio de la fermentación o en tales etapas tempranas (Bely y col., 1990). El consumo del nitrógeno añadido se realiza durante las primeras ocho horas de fermentación (Arrizón y Gschaedler, 2002).

Basándose en lo anterior, en este trabajo se planteará una estrategia para mejorar la producción de biomasa, y se propondrá también la cantidad adecuada de nitrógeno a manera de sulfato de amonio (Pinal y col., 1997), que debe emplearse, manejando concentraciones variables de azúcar como se propone en el diseño experimental Box Behnken.

## 2.4 Modelos matemáticos en la descripción de la cinética de crecimiento

Los modelos matemáticos facilitan el análisis de datos y pueden proporcionar una estrategia para describir el comportamiento de las levaduras en etapas tempranas del proceso de fermentación.



**Figura 2.2.** Etapas típicas del crecimiento celular en un cultivo por lotes.

En la Figura 1.1 se muestra el curso de una fermentación en régimen por lotes. En base a la biomasa, se pueden identificar cuatro fases perfectamente diferenciables. En primer lugar existe una fase donde prácticamente no hay división celular pero sí aumento de la masa individual de los microorganismos (fase “lag” o fase de latencia). Le sigue una etapa donde el crecimiento ocurre a velocidad específica ( $\mu$ ) máxima y constante =  $\mu_{\text{max}}$  (fase de crecimiento exponencial). Al final de esta fase se alcanza la máxima concentración celular. Posteriormente hay un rápido período de desaceleración donde  $\mu \rightarrow 0$  y se entra en la fase estacionaria la cual es causada por agotamiento de algún nutriente (el sustrato limitante) o bien por acumulación de inhibidores. Durante esta fase la concentración celular (o de

biomasa) permanece constante. Finalmente se llega a una última etapa donde la concentración de biomasa disminuye por autólisis o como consecuencia del metabolismo endógeno (fase de muerte o decaimiento).

La duración de cada una de estas fases es función del microorganismo en estudio y de la composición del medio de cultivo. En particular la fase lag depende además de la fase de crecimiento en que se encuentran las células en el momento de ser sembradas y de la composición del medio de cultivo en que fueron crecidas. Si éste es igual a la composición del medio en que se van a sembrar y las células están en fase exponencial, la duración de la fase lag, en general se acorta y puede llegar a desaparecer, lo cual es deseable ya que constituye un periodo sin producción.

Los modelos matemáticos pueden describir las velocidades de reacción metabólicas y su estequiometría con base en las condiciones anteriores y actuales del fermentador. Debido a la complejidad metabólica, todos los modelos deben ser una burda simplificación de la realidad.

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

Los modelos no estructurados son muy simples, pues parten de considerar a la biomasa como una cantidad uniforme sin dinámica interna cuya velocidad de reacción depende solamente de las condiciones en la fase líquida del sistema de reacción. Estos modelos sólo contienen cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y formación de productos.

Ellos son una buena aproximación si el tiempo de respuesta de la célula a cambios ambientales es muy pequeño o muy grande comparado con la duración del proceso fermentativo. Es de esperarse que el potencial descriptivo de los modelos biológicos no estructurados sea limitado. Solamente el comportamiento del crecimiento promedio del cultivo se describe tomando en cuenta un promedio de la población de células y un tiempo promedio sobre el ciclo de división celular. En muchos casos esta simplificación es razonable porque es imposible tener un conocimiento exacto de la composición



heterogénea de la biomasa y del estado de los sistemas intracelulares. Pero la simplificación puede causar también errores en el comportamiento estático y dinámico del modelo.

Otro tipo de modelos utilizados lo constituyen los modelos estructurados, que se basan en los componentes de la biomasa, tales como los metabolitos, enzimas, RNA o por variables relacionadas a la población que describen las diferentes morfologías de las células y su envejecimiento.

Los modelos no estructurados empleados para describir la cinética de crecimiento, son los modelos de Gompertz de dos (ecuación. 2.1) y tres parámetros (ecuación. 2.2), el modelo de Monod (ecuación. 2.3), el modelo Logístico (ecuación. 2.4). (Gelmi y col., 2002; Shukla y col., 2005; Znad y col., 2004; Tavares y col., 2005) y el modelo de Contois (ecuación 2.5).

El modelo de Gompertz de dos parámetros es de tipo diferencial, de primer orden, con un coeficiente variable (ecuación 2.1)

$$\frac{dx}{dt} = kxe^{-\mu t} \quad 2.1$$

Aquí,  $x$  es la concentración de biomasa (g/l),  $k$  es un parámetro cinético relacionado con la velocidad de crecimiento específica inicial ( $h^{-1}$ ),  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específica inicial ( $h^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo de reacción (h). Esta considera un crecimiento autolimitado donde la velocidad decrece exponencialmente con el tiempo.

El modelo de Gompertz de tres parámetros adiciona el efecto de autoinhibición del crecimiento (ecuación 2.2).

$$\frac{dx}{dt} = kxe^{-\mu t} - ax \quad 2.2$$

Aquí,  $x$  es la concentración de biomasa (g/l),  $k$  es un parámetro cinético relacionado con la velocidad de crecimiento específica inicial ( $h^{-1}$ ),  $a$  es un parámetro cinético relacionado con la inhibición de crecimiento,  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específica ( $h^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo de reacción (h).

El modelo de Monod describe el efecto del nutriente limitante en la velocidad específica de crecimiento.

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_{max} x s}{K_s + s} \quad 2.3$$

Si  $\mu_{max}$  es la velocidad específica de crecimiento máxima es la máxima velocidad que se alcanza cuando el nutriente que limita el crecimiento no está limitado y  $K_s$  es la constante de Monod, definida como la concentración del nutriente limitante en la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima velocidad que puede ser alcanzada.

El modelo logístico de dos parámetros (ecuación 2.4), describe el crecimiento exponencial con un factor de inhibición proporcional a la concentración de biomasa al cuadrado ( $x^2$ ):

$$\frac{dx}{dt} = kx - ax^2 \quad 2.4$$

En donde  $x$  es la concentración de biomasa (g/l),  $k$  es un parámetro cinético proporcional a la concentración de biomasa y “ $a$ ” es un parámetro de inhibición de crecimiento.

El modelo de Contois es de uso generalizado en sistemas en los que se observa cierto grado de inhibición. Este modelo (ecuación 2.5) propone la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{bx + S} \quad 2.5$$

Aquí  $\mu_{max}$  representa la velocidad máxima de eliminación de sustrato,  $S$  es la concentración de soluto,  $x$  es la concentración de biomasa y “ $b$ ” es la constante de saturación de Contois.

El modelo de Monod se encuentra asociado al consumo de sustrato limitante mientras que el resto de los parámetros sólo depende del tiempo (Bailey y Ollis, 1986). Para complementar lo que ocurre en el sistema se debe conocer la cinética de consumo de sustrato. A continuación (ecuación 2.6) se representa el consumo de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno (Gelmi y col., 2002; Bailey y Ollis 1986), ésta considera un cambio

en la concentración debido al consumo paralelo de sustrato para crecimiento y para mantenimiento celular.

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} - m_s \quad 2.6$$

En la ecuación anterior,  $Y_{x/s}$  es el coeficiente de rendimiento y  $m_s$  el coeficiente de mantenimiento.

Se pueden identificar tres tipos de formación de producto, aquella asociada al crecimiento, mixta y no asociada al crecimiento.

Cuando el crecimiento celular está asociado exclusivamente al nutriente limitante, en una relación parecida a la que propone Monod, se puede expresar el término de rendimiento  $Y_{x/s}$  como el balance de masa del sustrato limitante asociado al balance de biomasa, dado que como se muestra en la ecuación 2.5, depende de  $S$ .

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta S} \quad 2.7$$

Considerando un proceso por lotes:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{masa de levaduras formada}}{\text{masa de sustrato consumido}} \quad 2.8$$

El coeficiente de mantenimiento queda definido a partir de la consideración de que el consumo de sustrato es un fenómeno paralelo a la producción de biomasa, y se relaciona con el coeficiente de mantenimiento de la siguiente manera:

$$Y_{x/s} = \frac{Y'_{xS} D}{D + m Y'_{xS}} \quad 2.9$$

Donde  $Y'_{xS}$  es el coeficiente de rendimiento real, que considera que la biomasa se ve afectada por las reacciones que ocurren al interior de la levadura y que consumen biomasa de la misma y  $D$  es un factor de dilución.

## **2.5 Diseño experimental de modelos de superficie de respuesta**

Los modelos de superficie de respuesta (MSR) exploran las relaciones entre varias variables explicativas y una o más variables de respuesta. El método fue presentado por GEP Box y Wilson en 1951. La idea principal de los MSR es utilizar una secuencia de experimentos diseñados para obtener una respuesta óptima. Box y Wilson sugieren usar un modelo polinomial de segundo grado para hacer esto. Asimismo, reconocen que este modelo es sólo una aproximación, sin embargo su uso es generalizado debido a que este modelo es fácil de calcular y aplicar, aun cuando se sabe poco sobre el proceso (Box y Draper, 1987).

Una manera fácil de estimar un modelo polinomial de primer grado, es usar un experimento factorial o un diseño factorial fraccional. Esto es suficiente para determinar qué variables explicativas muestran impacto sobre la variable de respuesta. Una vez que se sospecha cuales son las variables explicativas significativas, es conveniente emplear un diseño más complicado, como un diseño compuesto central puede ser aplicado para estimar un modelo de segundo grado polinomial, que sin embargo, sigue siendo una aproximación, en el mejor de los casos. De cualquier modo, el modelo de segundo grado puede ser utilizado para localizar aproximadamente las condiciones a las cuales la respuesta exhibe un óptimo. (Maximizar, minimizar o alcanzar un objetivo específico) (Atkinson y col., 2007).

En la práctica, tanto los modelos y los valores de los parámetros son desconocidos, y están en todos los casos sujetos a incertidumbre. Es importante considerar que el modelo proporcionará un óptimo numéricamente, sin embargo puede o no representar un óptimo real, pues parte de los errores de las estimaciones y de las insuficiencias del modelo (Atkinson y col., 2007; Cornell, 2002).

En la mayoría de los problemas MSR, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso de la MSR es

encontrar una aproximación adecuada entre la relación funcional y el conjunto de variables independientes.

Por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden (ecuación 2.10).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad 2.10$$

Aquí  $y$  es la respuesta, los términos  $\beta$ 's son parámetros cuyos valores deben determinarse,  $x_1$  es una variable que representa el factor A,  $x_2$  es una variable que representa el factor B y  $\varepsilon$  es el término del error aleatorio. Las variables  $x_1$  y  $x_2$  se definen en una escala codificada de -1 a +1 (los niveles bajo y alto de A y B).

Si hay curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, tal como el modelo de segundo orden (ecuación 2.11).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad 2.11$$

Donde  $y$  es la respuesta, los términos  $\beta$ 's son parámetros cuyos valores deben determinarse,  $x_1$  es una variable que representa el factor A,  $x_2$  es una variable que representa el factor B y  $\varepsilon$  es el error aleatorio. Las variables  $x_1$  y  $x_2$  se definen en una escala codificada de -1 a +1 (los niveles bajo y alto de A y B) y  $\beta_{ij}$  representan los defectos cuadráticos o de segundo orden puros.

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

El detalle de las matrices para ajuste de las superficies de respuesta está disponible en el apéndice A3.

Algunos ejemplos de diseños de superficie de respuesta, son el diseño factorial y el diseño de bloque.

- **Diseño Factorial:** Es un experimento cuyo diseño consta de dos o más factores, cada uno con los posibles valores discretos o "niveles", y cuyas unidades experimentales suponen todas las posibles combinaciones de estos niveles a través de todos esos factores. Se eligió un diseño factorial completo que también se puede llamar diseño completamente cruzado. Este experimento permite estudiar el efecto de cada factor en la variable de respuesta, así como los efectos de las interacciones entre los factores en la variable de respuesta.
- **Diseño de Bloques:** Se utiliza cuando se tiene factores perturbadores y elimina la variabilidad entre dos pruebas (Montgomery, 2004).

## **2.6. Diseño experimental Box-Behnken**

Este modelo experimental de superficie de respuesta fue ideado por George E.P. Box y Donald Behnken en 1960, para lograr los siguientes propósitos (Box y Behnken, 1960):

- Cada factor o variable independiente se coloca en uno de tres valores igualmente espaciados (Por lo menos tres niveles son necesarios para lograr el objetivo primordial del diseño).
- El diseño debe ajustarse a un modelo cuadrático, esto es, debe contener términos cuadráticos y productos de dos factores.
- La relación del número de puntos experimentales en el modelo cuadrático debe ser razonable.
- La varianza debe depender de la distancia de cada punto experimental con respecto al centro (esto es más real con diseños de 4 a 7 factores).

Cada diseño debe ser entendido como una combinación de un diseño factorial de dos niveles, con un diseño de bloque incompleto. En cada bloque, cierto número de factores se consideran como las combinaciones del diseño factorial, mientras que otros se mantienen como valores centrales.

## CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA Y DESARROLLO

### 3.1 Metodología

Se pretende optimizar la producción de levaduras en la etapa de inoculación con el propósito de tener la mayor cantidad de microorganismos con la mayor viabilidad posible para la etapa de fermentación. Las pruebas experimentales que se llevarán a cabo quedan definidas por un diseño de experimentos tipo Box Behnken. Uno de los objetivos primordiales, dada la naturaleza de este particular arreglo experimental, es encontrar la combinación de las variables en estudio que garantiza el valor óptimo de la variable de respuesta. Este tipo de diseño experimental, permite trabajar con tres parámetros en tres diferentes niveles. En este análisis, se pretende optimizar la cantidad de biomasa obtenida manipulando el pH, la concentración inicial de azúcar y la relación C/N a manera de nitrógeno amoniacal añadido  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Definimos los factores A, B y C como el valor de pH inicial, la concentración de jugos de agave y la cantidad de sulfato de amonio utilizada, respectivamente.

*Levadura:* Se usó una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aislada de las levaduras nativas presentes en los jugos de agave usados en la producción de mezcal en el estado de Zacatecas, particularmente en la localidad de Pinos y Villa Hidalgo. Esta levadura se aisló y se mantiene en conservación en la colección del Laboratorio beta de Biotecnología y bioingeniería del Departamento de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química de la UMSNH.

*Medio de Cultivo:* La cepa utilizada, fue crecida en un medio de Agar Papa Dextrosa (PDA comercial) en cajas de Petri estériles y llevadas a una incubadora a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, las levaduras fueron resuspendidas utilizando 20 ml de una solución isotónica al 0.09% de NaCl.

*Condiciones del Inóculo:* Los mostos de agave azul usados provienen de las mezcaleras de Pinos y Villa Hidalgo Zacatecas, concretamente de la “Destiladora los Horconillos la Estanzuela” S.P.R. de R.L. El jugo se filtró y diluyó hasta alcanzar concentraciones de 5°, 7° y 9° Brix, siendo los niveles bajo, medio y alto de acuerdo al diseño experimental

planteado. Posteriormente se esterilizó a 130° C, 139.7 kPa durante 15 minutos. Las cantidades de sulfato de amonio fueron de 0.5 g/l, 1 g/l y 1.5 g/l, añadidos durante la fase de retraso, respectivamente. Los niveles de pH fueron de 4, 4.5 y 5. El pH se controló mediante dos soluciones reguladores de HCl y NaOH 2M. Se emplearon matraces Erlenmayer de 500 ml de capacidad, con 250 ml de jugo de agave e inoculados al 10% en volumen de levaduras en suspensión. La fermentación se llevó a cabo en una incubadora con agitación a 200 rpm y 30° C (LSI-3016R Labtech Co). (CIATEJ, 2004).

Se tomaron muestras de 6 ml cada 4 horas, permitiendo que la fermentación progresara durante 24 horas. Para determinar el pH de la muestra se utilizó un potenciómetro Denver EF1200D. La cantidad de Nitrógeno amoniacal presente se determinó mediante una prueba colorimétrica (Solórzano, 1969 y Presley, 1971) y la cantidad de azúcar presente se determinó con el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico DNS, ambas lecturas realizadas con un espectrofotómetro Jenway, para verificar con detalle ambas técnicas, referirse al apéndice A1.

La determinación de la concentración de biomasa se llevó a cabo por el método de peso seco, empleando un filtro para vacío millipore, bomba de vacío Felisa y membranas millipore de 0.22 µm y de 4.5 cm de diámetro, una vez filtrada la muestra, se llevaron a una mufla a 70° C hasta alcanzar peso constante. La técnica completa se ubica en el apéndice A2.

Con ello, se puede construir la siguiente matriz que representa el arreglo experimental de Box Behnken, se trata de 15 matraces, cada uno sometido a distintos niveles por cada factor.



**Tabla 3.1-1a.** Diseño Experimental Box Behnken Codificado (Por niveles)

Matraz	pH	Azúcar	Nitrógeno
1	-1	-1	0
2	-1	0	1
3	-1	1	0
4	0	-1	-1
5	0	1	1
6	1	-1	0
7	0	0	0
8	1	0	-1
9	1	1	0
10	0	0	0
11	0	1	-1
12	0	-1	1
13	0	0	0
14	-1	0	-1
15	1	0	1

**Tabla 3.1-1b.** Diseño Experimental Box Behnken Decodificado.

Matraz	pH	Azúcar, °Brix	Nitrógeno, gr/l
1	4	5	1
2	4	7	1.5
3	4	9	1
4	4.5	5	0.5
5	4.5	9	1.5
6	5	5	1
7	4.5	7	1
8	5	7	0.5
9	5	9	1
10	4.5	7	1
11	4.5	9	0.5
12	4.5	5	1.5
13	4.5	7	1
14	4	7	0.5
15	4	7	1.5

Para elaborar un análisis estadístico confiable, se propuso realizar cada prueba experimental por duplicado, si bien incrementa el número de grados de libertad, permite tener más certeza al determinar si los parámetros en estudio son significativos y tienen el efecto esperado en la variable de respuesta.

Al obtenerse el modelo matemático que relaciona a los parámetros elegidos, se puede optimizar el valor de la variable de respuesta y determinar cuál es la combinación que

maximiza dicho parámetro. Una vez obtenidos tales valores se procede a realizar una prueba confirmatoria también por duplicado para ajustar posteriormente las cinéticas.

### 3.2 Ajuste de datos multivariantes por el método de los Mínimos Cuadrados

En el manejo de datos tabulares o experimentales, en ocasiones se tienen más de una variable independiente a manejar, de tal forma que se requiere poder correlacionar el comportamiento de estas variables entre sí.

En el caso de las superficies de respuesta, y particularmente para el Diseño experimental planteado, es posible estudiar la dependencia que existe entre la variable de respuesta y los parámetros elegidos; con respecto de un par de ellos o los tres.

Es importante señalar que es posible discriminar entre modelos estadísticamente. No es suficiente con comparar la sumatoria de residuales al cuadrado (SRC) que genera cada modelo ya que, generalmente, el modelo que tenga un mayor número de parámetros propiciará una menor SRC. Teniendo en cuenta lo anterior, la comparación se basa en determinar si vale la pena utilizar más parámetros para disminuir la SRC. Por lo anterior, los ajustes de datos experimentales obtenidos por los modelos propuestos, pueden ser comparados estadísticamente mediante los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ), que se encuentra en función del coeficiente de determinación.

$$r = \sqrt[3]{r^2} = \sqrt{\frac{\sum(y - \hat{y})^2}{\sum(y - \bar{y})^2}} \quad 3.1$$

Donde  $r$  es el coeficiente de correlación,  $r^2$  es el coeficiente de determinación; “ $y$ ” representa los valores experimentales,  $\hat{y}$  son los valores ajustados y  $\bar{y}$  es el valor medio obtenido.

Entonces para determinar cuál de estas combinaciones es más representativa de los datos, se compararán los valores de  $r$  obtenidos en cada caso. Para verificar a detalle el método y algoritmo de solución, así como el programa en MatLab que permite estudiar estas dependencias, referirse al apéndice A3.

Un parámetro de interés, es el valor de la significancia estadística. En pocas palabras, se define como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es verdadera (decisión conocida como error de tipo I, o "falso positivo"). La decisión se toma a menudo utilizando el valor P (o p-valor): si el valor P es inferior al nivel de significación, entonces la hipótesis nula es rechazada. Cuanto menor sea el valor P, más significativo será el resultado.

### **3.3 Desarrollo de un programa en MatLab para determinar distintas superficies de respuesta**

El objetivo de desarrollar un programa es poder interpolar entre los datos experimentales obtenidos, y así proponer una ecuación que representa la superficie de respuesta.

En esta etapa, se pretenden estimar distintas superficies de respuesta, y el comportamiento de la variable de respuesta seleccionada si ésta depende de dos o de tres variables independientes.

#### **3.3.1 Algoritmo de solución del problema**

1. INICIO

2. ENTRADA: Número de datos, Número de variables independientes, grado del polinomio a ajustar.

3. Elaborar matriz de diseño

4. Obtener términos cruzados

5. Obtener términos cuadráticos

6. Obtener la matriz de sumatorias

7. Hacer ceros los elementos del vector columna b.

8. Hacer ceros los elementos de la matriz de sumatorias.

9. Obtener vector de términos independientes.

10. Resolver el sistema de ecuaciones lineales simultáneas.

11. Obtener los parámetros estadísticos del ajuste (Sumatoria de residuos al cuadrado, SRC; Error cuadrático medio, ECM; y el coeficiente de correlación, r)

12. SALIDA: Coeficientes del polinomio ajustado, Matriz de Diseño, SRC, ECM y r

13. FIN

El pseudocódigo del programa realizado se ubica en el apéndice A4.

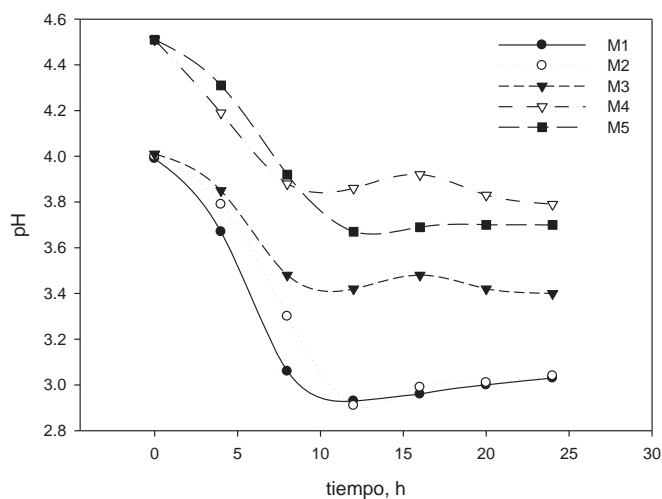
En otras palabras, los datos de entrada, son los vectores  $y$ , la respuesta y  $x_1, x_2, \dots, x_n$  vectores, tantas variables independientes se tengan. La salida, son los coeficientes del modelo ajustado, el ECM, la SRC y el valor de “r”, además de la matriz de diseño.

## CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

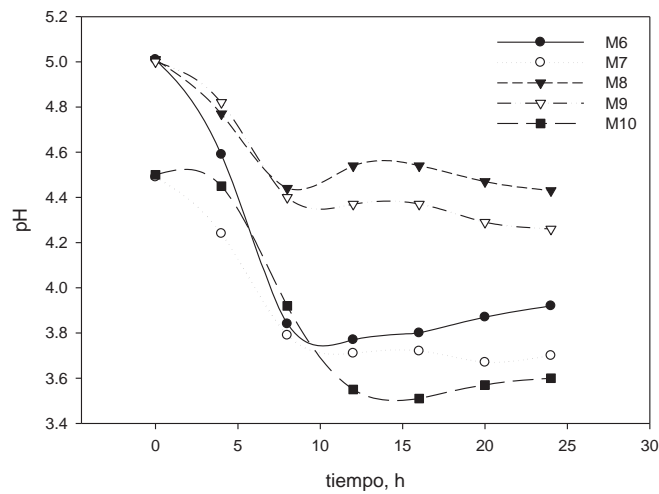
### 4.1 Comportamiento cinético del crecimiento celular

En las figuras 4.1-a a la 4.1-4c, se presentan los resultados obtenidos para los valores de pH, el consumo de azúcares reductores, consumo de nitrógeno y producción de biomasa, respectivamente, durante el desarrollo de los inoculos con respecto del tiempo.

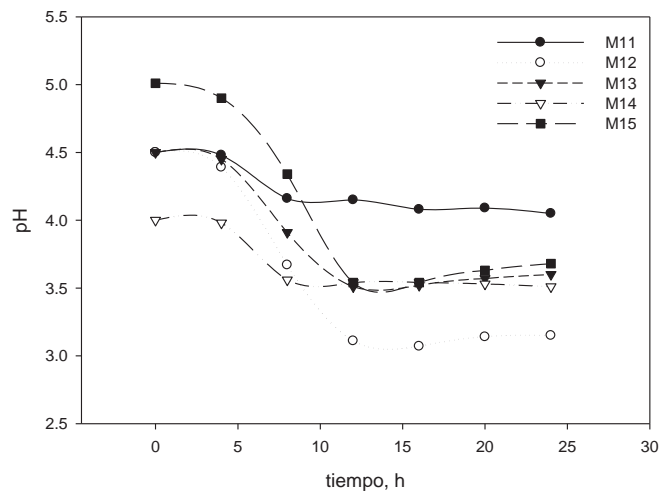
El tiempo total de fermentación de los medios de cultivo, fue de 24 horas. Se muestran en las figuras 4.1-1a a 4.1-1c los perfiles de pH para cada matraz.



**Figura 4.1-1a.** Comportamiento de pH en matraces 1 a 5.



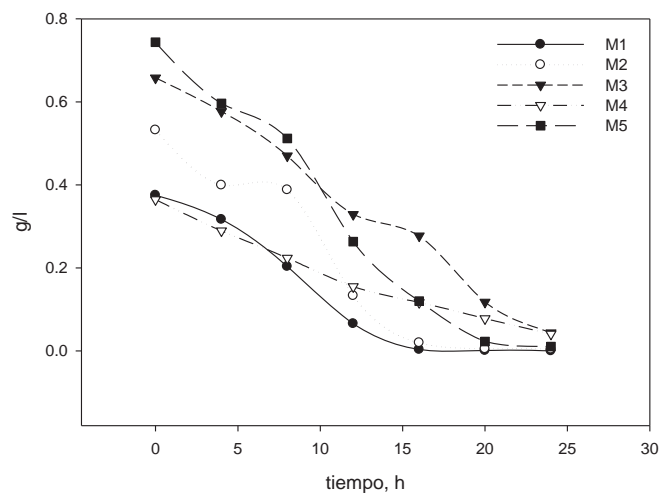
**Figura 4.1-1b.** Comportamiento de pH en matraces 6 a 10.



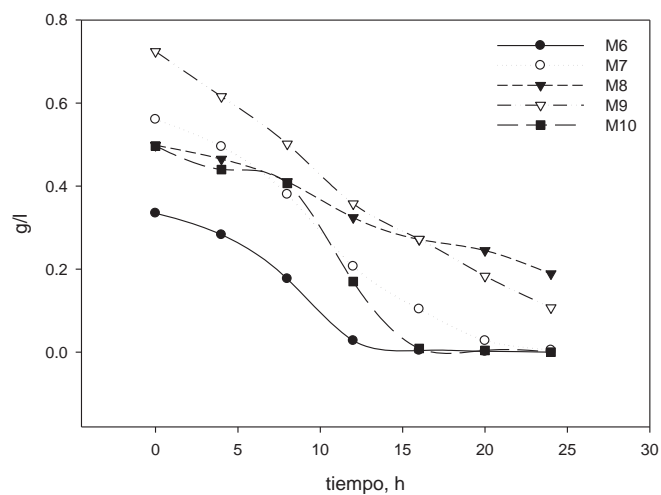
**Figura 4.1-1c.** Comportamiento de pH en matraces 11 a 15.

Es perceptible que durante las etapas iniciales de la fermentación, sin importar el pH de arranque, el sistema tiene la capacidad de amortiguarlo. Durante las primeras horas de fermentación, la caída de los valores iniciales es significativa y posteriormente se estabiliza; esta caída inicial se debe a la acidificación de la mezcla de reacción por efecto de la producción de alcohol.

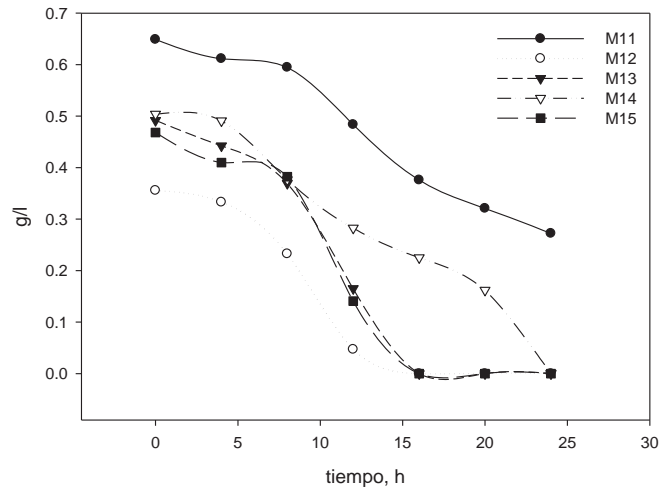
En las figuras 4.1-2a a 4.1-2c, se puede apreciar el consumo de los azúcares.



**Figura 4.1-2a.** Consumo de azúcares reductores para los matraces 1 a 5.



**Figura 4.1-2b.** Consumo de azúcares reductores para los matraces 6 a 10.



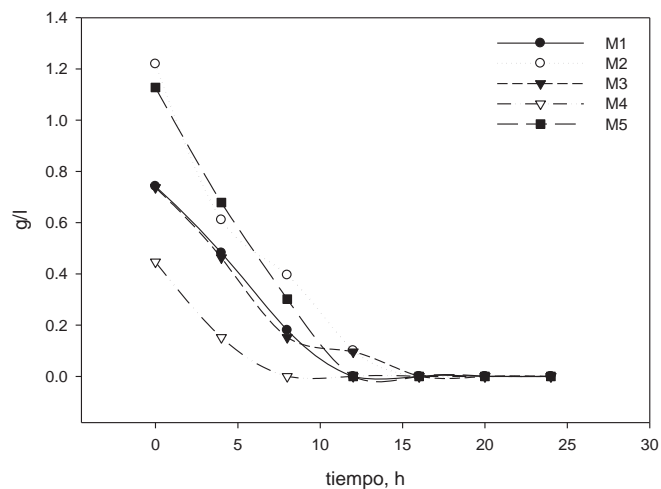
**Figura 4.1-2c.** Consumo de azúcares reductores para los matraces 11 a 15.

Se puede observar que la concentración de uno de los sustratos, representado por la cantidad de azúcares, cae considerablemente una vez transcurridas diez horas de fermentación. Los valores llegan a ser cero a pesar de que la cantidad de azúcares en la mezcla de reacción es diferente de cero, pues el análisis del ácido dinitrosalicílico sólo considera azúcares reductores, que son los únicos susceptibles de ser transformados en alcohol.

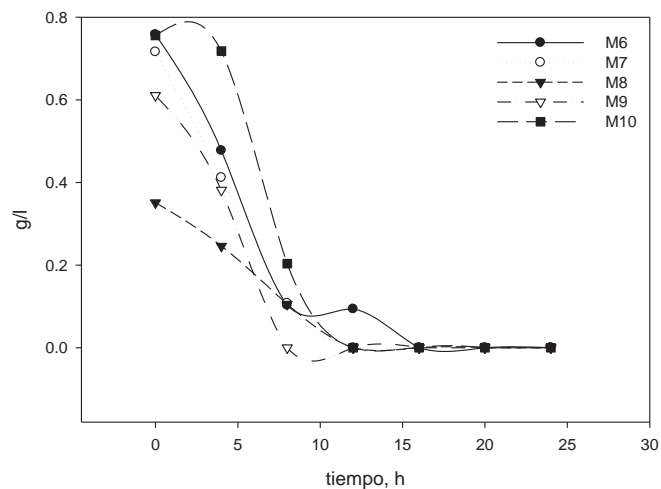
La cantidad de azúcares totales se puede determinar con un refractómetro en grados brix. El detalle de esta determinación se puede verificar a detalle en el apéndice A5.



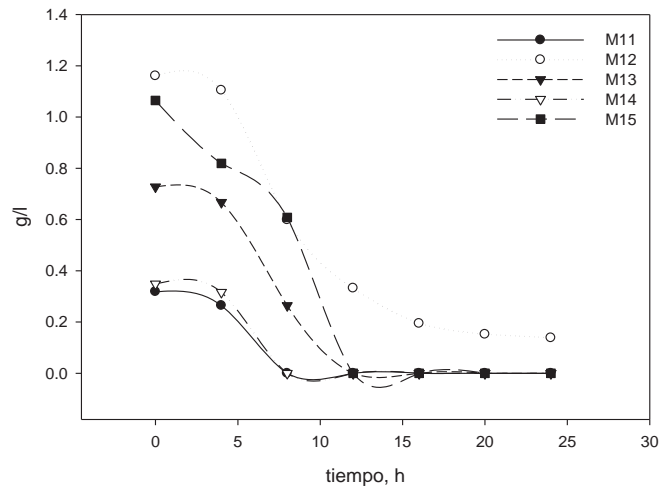
En las figuras 4.1-3a a 4.1-3c, se aprecia el consumo acelerado de otro de los sustratos considerados en esta prueba, el nitrógeno amoniacal.



**Figura 4.1-3a.** Cantidad de Sulfato de Amonio presente en matraces 1 a 5.



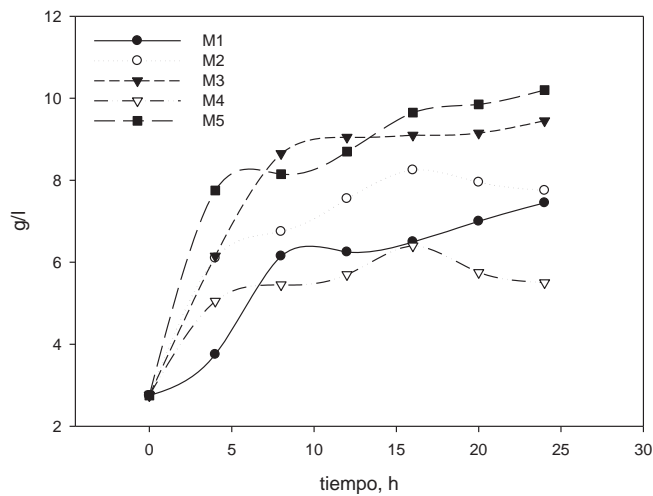
**Figura 4.1-3b.** Cantidad de Sulfato de Amonio presente en matraces 6 a 10.



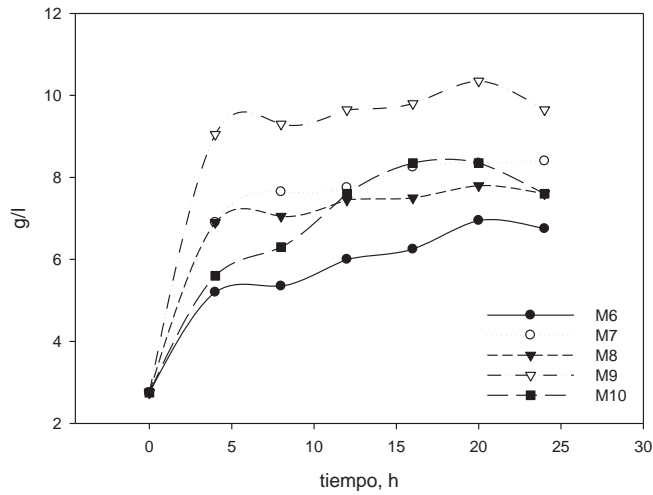
**Figura 4.1-3c.** Cantidad de Sulfato de Amonio presente en matraces 11 a 15.

El nitrógeno suministrado se consume casi en su totalidad durante las primeras diez horas de fermentación.

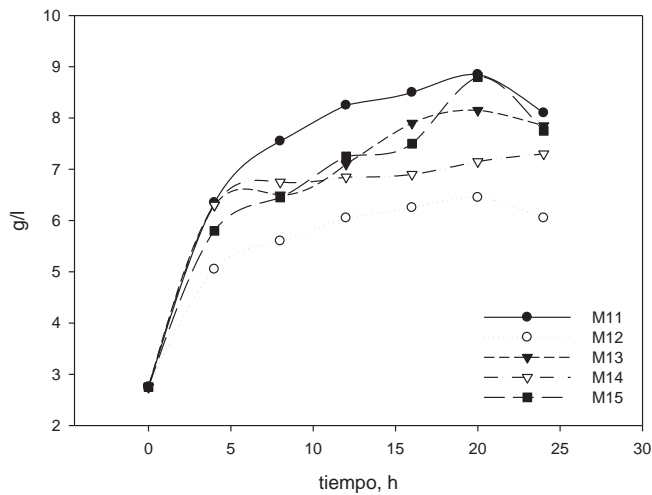
En los matraces 4.1-4a a 4.1-4c podemos apreciar la tendencia que sigue la variable de respuesta.



**Figura 4.1-4a.** Biomasa producida por unidad de volumen en matraces 1 a 5.



**Figura 4.1-4b.** Biomasa producida por unidad de volumen en matraces 6 a



10.

**Figura 4.1-4c.** Biomasa producida por unidad de volumen en matraces 11 a 15.

Se puede señalar que existe una correspondencia entre el comportamiento de la variable de respuesta y el sustrato no crítico, en este caso el sulfato de amonio. Es apreciable la etapa de crecimiento exponencial descrita en el apartado anterior, así como la etapa de retraso, pues se puede observar que durante las primeras horas de fermentación no se muestran cambios significativos y posteriormente se presenta un agotamiento de la fuente de nitrógeno, sin que la cantidad de biomasa deje de crecer. Transcurridas doce horas de fermentación se nota que el nitrógeno se ha consumido.

## **4.2 Estudio de las superficies de respuesta**

Con los valores experimentales obtenidos, descritos en la sección anterior, se pueden obtener distintas superficies de respuesta y analizar el efecto individual y combinado de los parámetros de estudio, así como el efecto por pares y total. Para ello se proponen cuatro casos particulares, donde se estudiará el comportamiento de la biomasa con respecto a dos de los tres parámetros y todos ellos combinados.

Como se indicó en el algoritmo de solución, se muestran para cada caso los valores de entrada y las superficies de respuesta obtenidas en cada caso. Sea para cada uno de los casos, pH el valor del pH, A, la cantidad de nitrógeno amoniacal (gr/l), B la cantidad de biomasa (gr/l) y S la concentración de azúcares expresada en °Brix. SRC es la sumatoria de residuos al cuadrado, ECM queda definido como el error cuadrático medio y  $r^2$  es el coeficiente de determinación.

CASO 1. La Biomasa depende de pH y A.

**ENTRADA:** Vectores  $x_1, x_2, \dots, x_n$ ; (pH, A) y Respuesta, vector b (valores experimentales de concentración de biomasa)

**Tabla 4.2-1a.** Valores iniciales de pH y Nitrógeno Amoniacal

pH	4	4	4	4.5	4.5	5	4.5	5	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4	5
A	1	1.5	1	0.5	1.5	1	1	0.5	1	1	0.5	1.5	1	0.5	1.5

**Tabla 4.2-1b.** Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques.

B bq1	6.55	7.425	9.325	5.25	12.125	6.25	8.45	7.5	9.76	7.56	8.46	5.85	8.1	6.7	7.68
B bq2	7	7.95	9.15	5.75	9.85	6.95	8.35	7.8	10.35	8.35	8.85	6.45	8.15	7.15	8.8

**SALIDA:** Coeficientes de la ecuación de superficie de respuesta, SRC, ECM,  $r^2$  y matriz de Diseño.

**Tabla 4.2-1c.** Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y  $r^2$ .

Coeficientes	Parámetros
-5.9781	SRC = 57.1416
4.3807	
5.4487	ECM = 2.3809
-0.1750	
-0.4140	$r^2 = 0.1112$
-1.7890	

**Tabla 4.2-1d. Matriz de Diseño.**

1.0000	4.0000	1.0000	4.0000	16.0000	1.0000
1.0000	4.0000	1.5000	6.0000	16.0000	2.2500
1.0000	4.0000	1.0000	4.0000	16.0000	1.0000
1.0000	4.5000	0.5000	2.2500	20.2500	0.2500
1.0000	4.5000	1.5000	6.7500	20.2500	2.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.5000	1.0000	4.5000	20.2500	1.0000
1.0000	5.0000	0.5000	2.5000	25.0000	0.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.5000	1.0000	4.5000	20.2500	1.0000
1.0000	4.5000	0.5000	2.2500	20.2500	0.2500
1.0000	4.5000	1.5000	6.7500	20.2500	2.2500
1.0000	4.5000	1.0000	4.5000	20.2500	1.0000
1.0000	4.0000	0.5000	2.0000	16.0000	0.2500
1.0000	5.0000	1.5000	7.5000	25.0000	2.2500
1.0000	4.0000	1.0000	4.0000	16.0000	1.0000
1.0000	4.0000	1.5000	6.0000	16.0000	2.2500
1.0000	4.0000	1.0000	4.0000	16.0000	1.0000
1.0000	4.5000	0.5000	2.2500	20.2500	0.2500
1.0000	4.5000	1.5000	6.7500	20.2500	2.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.5000	1.0000	4.5000	20.2500	1.0000
1.0000	5.0000	0.5000	2.5000	25.0000	0.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.5000	1.0000	4.5000	20.2500	1.0000
1.0000	4.5000	0.5000	2.2500	20.2500	0.2500
1.0000	4.5000	1.5000	6.7500	20.2500	2.2500
1.0000	4.5000	1.0000	4.5000	20.2500	1.0000
1.0000	4.0000	0.5000	2.0000	16.0000	0.2500
1.0000	5.0000	1.5000	7.5000	25.0000	2.2500

La ecuación que representa la superficie de respuesta es:

$$B = -5.9781 + 4.3807 * pH + 5.4487 * A - 0.175 * pH * A - 0.414 * pH^2 - 1.789 * A^2 \quad 4.1$$

CASO 2. La Biomasa depende de pH y S

**ENTRADA:** Vectores  $x_1, x_2, \dots, x_n$ ; (pH, S) y Respuesta, vector  $b$  (valores experimentales de concentración de biomasa)

**Tabla 4.2-2a.** Valores iniciales de pH y Azúcares (°Brix)

pH	4	4	4	4.5	4.5	5	4.5	5	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4	5
S	5	7	9	5	9	5	7	7	9	7	9	5	7	7	7

**Tabla 4.2-2b.** Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques.

B bq1	6.55	7.425	9.325	5.25	12.125	6.25	8.45	7.5	9.76	7.56	8.46	5.85	8.1	6.7	7.68
B bq2	7	7.95	9.15	5.75	9.85	6.95	8.35	7.8	10.35	8.35	8.85	6.45	8.15	7.15	8.8

**SALIDA:** Coeficientes de la ecuación de superficie de respuesta, SRC, ECM,  $r^2$  y matriz de Diseño.

**Tabla 4.2-2c.** Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y  $r^2$ .

Coeficientes	Parámetros
4.1244	SRC = 14.3330
0.9683	
-0.7242	ECM = 0.5972
0.2481	
-0.2473	$r^2 = 0.7771$
0.0341	

**Tabla 4.2-2d. Matriz de Diseño.**

1.0000	4.0000	5.0000	20.0000	16.0000	25.0000
1.0000	4.0000	7.0000	28.0000	16.0000	49.0000
1.0000	4.0000	9.0000	36.0000	16.0000	81.0000
1.0000	4.5000	5.0000	22.5000	20.2500	25.0000
1.0000	4.5000	9.0000	40.5000	20.2500	81.0000
1.0000	5.0000	5.0000	25.0000	25.0000	25.0000
1.0000	4.5000	7.0000	31.5000	20.2500	49.0000
1.0000	5.0000	7.0000	35.0000	25.0000	49.0000
1.0000	5.0000	9.0000	45.0000	25.0000	81.0000
1.0000	4.5000	7.0000	31.5000	20.2500	49.0000
1.0000	4.5000	9.0000	40.5000	20.2500	81.0000
1.0000	4.5000	5.0000	22.5000	20.2500	25.0000
1.0000	4.5000	7.0000	31.5000	20.2500	49.0000
1.0000	4.0000	7.0000	28.0000	16.0000	49.0000
1.0000	5.0000	7.0000	35.0000	25.0000	49.0000
1.0000	4.0000	5.0000	20.0000	16.0000	25.0000
1.0000	4.0000	7.0000	28.0000	16.0000	49.0000
1.0000	4.0000	9.0000	36.0000	16.0000	81.0000
1.0000	4.5000	5.0000	22.5000	20.2500	25.0000
1.0000	4.5000	9.0000	40.5000	20.2500	81.0000
1.0000	5.0000	5.0000	25.0000	25.0000	25.0000
1.0000	4.5000	7.0000	31.5000	20.2500	49.0000
1.0000	5.0000	7.0000	35.0000	25.0000	49.0000
1.0000	5.0000	9.0000	45.0000	25.0000	81.0000
1.0000	4.5000	7.0000	31.5000	20.2500	49.0000
1.0000	4.5000	9.0000	40.5000	20.2500	81.0000
1.0000	4.5000	5.0000	22.5000	20.2500	25.0000
1.0000	4.5000	7.0000	31.5000	20.2500	49.0000
1.0000	4.0000	7.0000	28.0000	16.0000	49.0000
1.0000	5.0000	7.0000	35.0000	25.0000	49.0000

La ecuación que representa la superficie de respuesta es:



$$B=4.1244+0.9683*pH-0.7242*S+0.2481*pHS-0.2473*pH^2+0.0341*S^2 \quad 4.2$$

CASO 3. La Biomasa depende de S y A

**ENTRADA:** Vectores  $x_1, x_2, \dots, x_n$ ; (S, A) y Respuesta, vector b (valores experimentales de concentración de biomasa)

**Tabla 4.2-3a.** Valores iniciales de Azúcares (°Brix) y Nitrógeno Amoniacal.

S	5	7	9	5	9	5	7	7	9	7	9	5	7	7	7
A	1	1.5	1	0.5	1.5	1	1	0.5	1	1	0.5	1.5	1	0.5	1.5

**Tabla 4.2-3b.** Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques.

B bq1	6.55	7.425	9.325	5.25	12.125	6.25	8.45	7.5	9.76	7.56	8.46	5.85	8.1	6.7	7.68
B bq2	7	7.95	9.15	5.75	9.85	6.95	8.35	7.8	10.35	8.35	8.85	6.45	8.15	7.15	8.8

**SALIDA:** Coeficientes de la ecuación de superficie de respuesta, SRC, ECM,  $r^2$  y matriz de Diseño.

**Tabla 4.2-3c.** Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y  $r^2$ .

Coeficientes	Parámetros
3.4944	SRC = 8.2786
0.0643	
1.5949	ECM = 0.3449
0.4206	
0.0275	$r^2 = 0.8712$
-1.7281	

**Tabla 4.2-3d. Matriz de Diseño.**

1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	7.0000	1.5000	10.5000	49.0000	2.2500
1.0000	9.0000	1.0000	9.0000	81.0000	1.0000
1.0000	5.0000	0.5000	2.5000	25.0000	0.2500
1.0000	9.0000	1.5000	13.5000	81.0000	2.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	7.0000	1.0000	7.0000	49.0000	1.0000
1.0000	7.0000	0.5000	3.5000	49.0000	0.2500
1.0000	9.0000	1.0000	9.0000	81.0000	1.0000
1.0000	7.0000	1.0000	7.0000	49.0000	1.0000
1.0000	9.0000	0.5000	4.5000	81.0000	0.2500
1.0000	5.0000	1.5000	7.5000	25.0000	2.2500
1.0000	7.0000	1.0000	7.0000	49.0000	1.0000
1.0000	7.0000	0.5000	3.5000	49.0000	0.2500
1.0000	7.0000	1.5000	10.5000	49.0000	2.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	7.0000	1.5000	10.5000	49.0000	2.2500
1.0000	9.0000	1.0000	9.0000	81.0000	1.0000
1.0000	5.0000	0.5000	2.5000	25.0000	0.2500
1.0000	9.0000	1.5000	13.5000	81.0000	2.2500
1.0000	5.0000	1.0000	5.0000	25.0000	1.0000
1.0000	7.0000	1.0000	7.0000	49.0000	1.0000
1.0000	7.0000	0.5000	3.5000	49.0000	0.2500
1.0000	9.0000	1.0000	9.0000	81.0000	1.0000
1.0000	7.0000	1.0000	7.0000	49.0000	1.0000
1.0000	9.0000	0.5000	4.5000	81.0000	0.2500
1.0000	5.0000	1.5000	7.5000	25.0000	2.2500
1.0000	7.0000	1.0000	7.0000	49.0000	1.0000
1.0000	7.0000	0.5000	3.5000	49.0000	0.2500
1.0000	7.0000	1.5000	10.5000	49.0000	2.2500

La ecuación que representa la superficie de respuesta es:

$$B=3.4944+0.0643*S+1.5949*A+0.4206*S*A+0.0275*S^2-1.7281*A^2$$

4.3

CASO 4. La Biomasa depende de pH, S y A

**ENTRADA:** Vectores  $x_1, x_2, \dots, x_n$  (pH, S y A) y Respuesta, vector  $b$  (valores experimentales de concentración de biomasa)

**Tabla 4.2-4a.** Valores iniciales de pH, Azúcares (°Brix) y Nitrógeno Amoniacal.

pH	4	4	4	4.5	4.5	5	4.5	5	5	4.5	4.5	4.5	4.5	4	5
S	5	7	9	5	9	5	7	7	9	7	9	5	7	7	7
A	1	1.5	1	0.5	1.5	1	1	0.5	1	1	0.5	1.5	1	0.5	1.5

**Tabla 4.2-4b.** Valores obtenidos para la Biomasa en ambos bloques.

B bq1	6.55	7.425	9.325	5.25	12.125	6.25	8.45	7.5	9.76	7.56	8.46	5.85	8.1	6.7	7.68
B bq2	7	7.95	9.15	5.75	9.85	6.95	8.35	7.8	10.35	8.35	8.85	6.45	8.15	7.15	8.8

**SALIDA:** Coeficientes de la ecuación de superficie de respuesta, SRC, ECM,  $r^2$  y matriz de Diseño.

**Tabla 4.2-4c.** Coeficientes para el polinomio de respuesta, SRC, ECM y  $r^2$ .

Coeficientes	Parámetros
0.5594	SRC = 6.7840
2.3600	
-1.0266	ECM = 0.3392
2.4413	
0.2481	$r^2 = 0.8945$
-0.1750	
0.4206	
-0.3825	
0.0256	
-1.7575	

**Tabla 4.2-4d.** Matriz de Diseño.

1.0000	4.0000	5.0000	1.0000	20.0000	4.0000	5.0000	16.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.0000	7.0000	1.5000	28.0000	6.0000	10.5000	16.0000	49.0000	2.2500
1.0000	4.0000	9.0000	1.0000	36.0000	4.0000	9.0000	16.0000	81.0000	1.0000
1.0000	4.5000	5.0000	0.5000	22.5000	2.2500	2.5000	20.2500	25.0000	0.2500
1.0000	4.5000	9.0000	1.5000	40.5000	6.7500	13.5000	20.2500	81.0000	2.2500
1.0000	5.0000	5.0000	1.0000	25.0000	5.0000	5.0000	25.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.5000	7.0000	1.0000	31.5000	4.5000	7.0000	20.2500	49.0000	1.0000
1.0000	5.0000	7.0000	0.5000	35.0000	2.5000	3.5000	25.0000	49.0000	0.2500
1.0000	5.0000	9.0000	1.0000	45.0000	5.0000	9.0000	25.0000	81.0000	1.0000
1.0000	4.5000	7.0000	1.0000	31.5000	4.5000	7.0000	20.2500	49.0000	1.0000
1.0000	4.5000	9.0000	0.5000	40.5000	2.2500	4.5000	20.2500	81.0000	0.2500
1.0000	4.5000	5.0000	1.5000	22.5000	6.7500	7.5000	20.2500	25.0000	2.2500
1.0000	4.5000	7.0000	1.0000	31.5000	4.5000	7.0000	20.2500	49.0000	1.0000
1.0000	4.0000	7.0000	0.5000	28.0000	2.0000	3.5000	16.0000	49.0000	0.2500
1.0000	5.0000	7.0000	1.5000	35.0000	7.5000	10.5000	25.0000	49.0000	2.2500
1.0000	4.0000	5.0000	1.0000	20.0000	4.0000	5.0000	16.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.0000	7.0000	1.5000	28.0000	6.0000	10.5000	16.0000	49.0000	2.2500
1.0000	4.0000	9.0000	1.0000	36.0000	4.0000	9.0000	16.0000	81.0000	1.0000
1.0000	4.5000	5.0000	0.5000	22.5000	2.2500	2.5000	20.2500	25.0000	0.2500
1.0000	4.5000	9.0000	1.5000	40.5000	6.7500	13.5000	20.2500	81.0000	2.2500
1.0000	5.0000	5.0000	1.0000	25.0000	5.0000	5.0000	25.0000	25.0000	1.0000
1.0000	4.5000	7.0000	1.0000	31.5000	4.5000	7.0000	20.2500	49.0000	1.0000
1.0000	5.0000	7.0000	0.5000	35.0000	2.5000	3.5000	25.0000	49.0000	0.2500
1.0000	5.0000	9.0000	1.0000	45.0000	5.0000	9.0000	25.0000	81.0000	1.0000
1.0000	4.5000	7.0000	1.0000	31.5000	4.5000	7.0000	20.2500	49.0000	1.0000
1.0000	4.5000	9.0000	0.5000	40.5000	2.2500	4.5000	20.2500	81.0000	0.2500
1.0000	4.5000	5.0000	1.5000	22.5000	6.7500	7.5000	20.2500	25.0000	2.2500
1.0000	4.5000	7.0000	1.0000	31.5000	4.5000	7.0000	20.2500	49.0000	1.0000
1.0000	4.0000	7.0000	0.5000	28.0000	2.0000	3.5000	16.0000	49.0000	0.2500
1.0000	5.0000	7.0000	1.5000	35.0000	7.5000	10.5000	25.0000	49.0000	2.2500

La ecuación que representa la superficie de respuesta es:

$$B=0.5594+2.36*pH-1.0266*S+2.4413*A+0.2481*pHS-0.175*pHA+0.4206*SA-0.3825*pH^2+0.0256*S^2-1.7575*A^2$$

4.4

Podemos establecer que la biomasa es función débil del pH y a la vez tiene mayor dependencia de las variables  $S$  y  $A$  (cantidad inicial de azúcares y nitrógeno amoniacal), tras haber comparando los valores de  $r^2$  obtenidos en cada caso. Sin embargo no es posible ser concluyentes en cuanto a la dependencia real con respecto a cada variable.

Partiendo del análisis previo, es posible determinar los valores de los parámetros  $A$ ,  $B$  y  $C$  que maximizan el valor de la variable de respuesta, mediante el programa Statgraphics 5.0®. Haciendo uso de este programa es posible analizar el diseño experimental planteado, obtener el análisis de Varianza y diagramas de interacción para conocer el efecto que tienen en el valor de la Biomasa. Para el conjunto de datos analizado, se obtuvo lo siguiente:

**Tabla 4.2-5.** Análisis de Varianza ANOVA

Factor	SC	Gl	MC	F	Valor $p$
A:pH	1.41135	1	1.41135	4.28	0.0526
B:Azucar, °Brix	17.1294	1	17.1294	51.89	0.0000
C:Nitrógeno	6.03004	1	6.03004	18.27	0.0004
AA	0.067526	1	0.067526	0.20	0.6562
AB	0.492528	1	0.492528	1.49	0.2368
AC	0.0153125	1	0.0153125	0.05	0.8318
BB	0.0775846	1	0.0775846	0.24	0.6334
BC	1.4154	1	1.4154	4.29	0.0523
CC	1.4256	1	1.4256	4.32	0.0515
Blocks	0.512213	1	0.512213	1.55	0.2280
Total Error	6.27182	19	0.330096		
Total Corr	64.293	19			

$R^2 = 90.2449 \%$ , Error Estándar = 0.57454.

El análisis realizado considera el efecto de cada uno de los parámetros en la variable de respuesta. Al hacer una prueba de significancia estadística comparando el valor cuadrático medio con la estimación del error experimental, se puede establecer que dos factores tienen un valor de  $p$  menor a 0.05, esto quiere decir que su efecto en la variable de respuesta es significativo, ello establecido con un 95% de confianza. Dichos parámetros son la cantidad de azúcar inicial y la cantidad de Nitrógeno añadida. Sin importar el pH con que se trabaje, el sistema de reacción tiende a amortiguar este efecto inicial del pH, además, es bien sabido que durante la fermentación alcohólica, el pH se verá disminuido por efecto de los productos de la reacción. Una práctica común en la industria es acidificar la mezcla de fermentación antes de proceder a inocular, para acelerar el efecto amortiguador propio de las levaduras. (Ingledey y Kunkee, 1985); (CIATEJ, 2004).

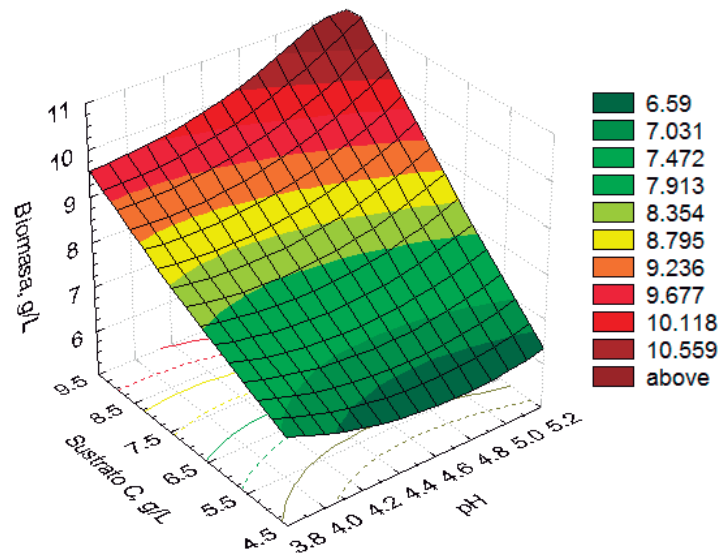
El valor de  $R^2$  indica que el modelo hallado que relaciona pH, azúcar y nitrógeno, explica el 90.2449% de la variabilidad de la Biomasa, el valor ajustado es de 85.8552% y toma en cuenta los grados de libertad, además de ser más representativo. El error estándar estimado muestra que los residuos son del orden de 0.57454. Por haberse tratado de un experimento por duplicado, los grados de libertad aumentan.

Los resultados de este diseño experimental permitieron construir un modelo de regresión de segundo orden por mínimos cuadrados para conseguir una mejor aproximación. El modelo obtenido mediante el programa es:

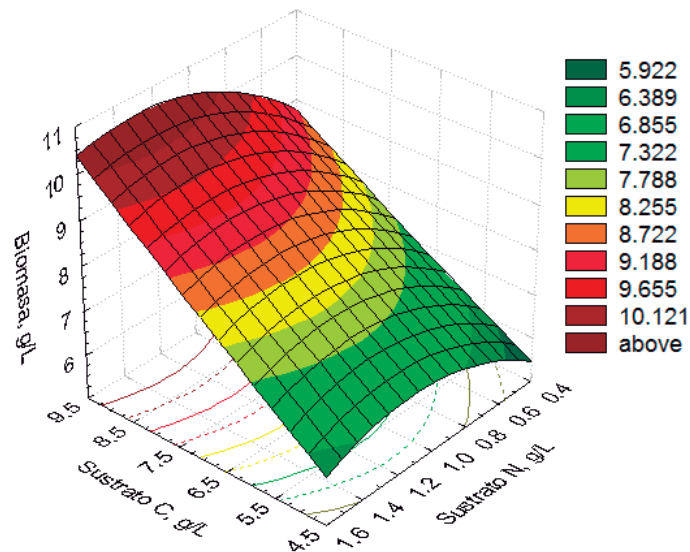
$$B = 0.559375 + 2.36 * pH - 1.02656 * S + 2.44125 * A - 0.3825 * pH^2 + 4.5 \\ 0.248125 * pH * S - 0.175 * pH * A + 0.025625 * S^2 + 0.420625 * S * A - 1.7575 * A^2$$

Donde  $pH$  es el Potencial de Hidrógeno,  $S$  es la concentración de azúcares totales (° Brix) y  $A$  es la concentración de Nitrógeno Amoniacal (g de  $(NH_4)_2SO_4$  / l).

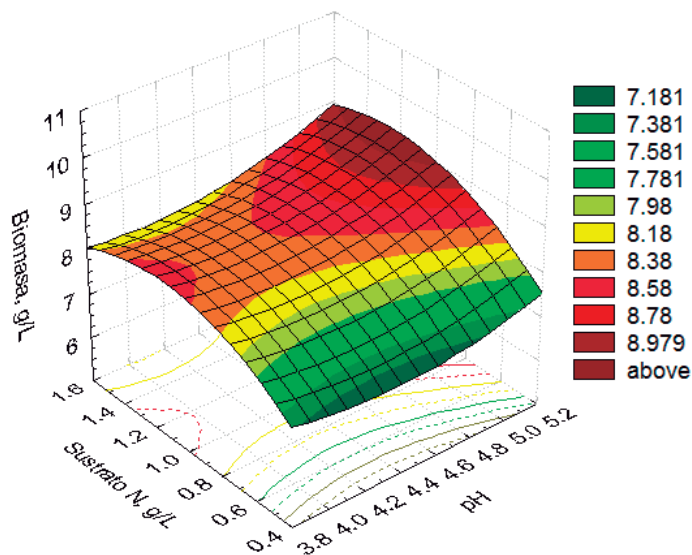
Las gráficas de superficie de respuesta, que representan el comportamiento de la Biomasa con respecto a los parámetros estudiados, son:



**Figura 4.2-5a.** Superficie de Respuesta y contorno para la producción de Biomasa en función del Sustrato (azúcar) y el pH.



**Figura 4.2-5b.** Superficie de Respuesta y contorno para la producción de Biomasa en función del Sustrato C (azúcar) y el Sustrato N (nitrógeno amoniacal).



**Figura 4.2-5b.** Superficie de Respuesta y contorno para la producción de Biomasa en función del pH y el Sustrato N (nitrógeno amoniacal).

Tras resolver el modelo, se encontraron los valores que optimizan la producción de Biomasa siendo el valor de pH de 4.5, para S de 9° Brix y para A de 1.33 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  / l.

Con los parámetros obtenidos, se llevaron a cabo pruebas confirmatorias para posteriormente ajustar a los modelos de crecimiento celular mencionados. El nitrógeno amoniacal añadido es promotor del crecimiento celular y se encontró que se agota durante la fase de crecimiento exponencial, el monitoreo de la cantidad presente se realizó cada hora a diferencia del resto de los parámetros. Los resultados de estas pruebas se presentan en la Tabla 4.2-6.

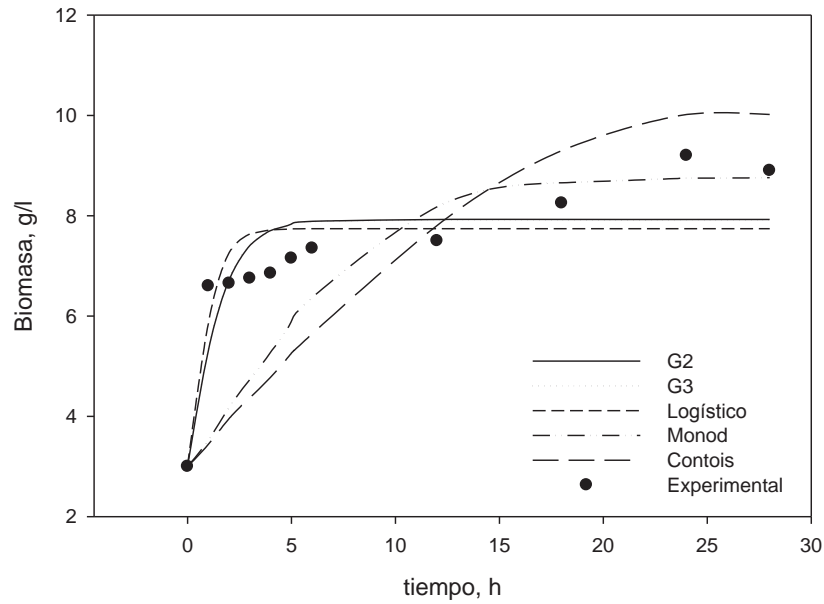


**Tabla 4.2-6.** Ensayo confirmatorio.

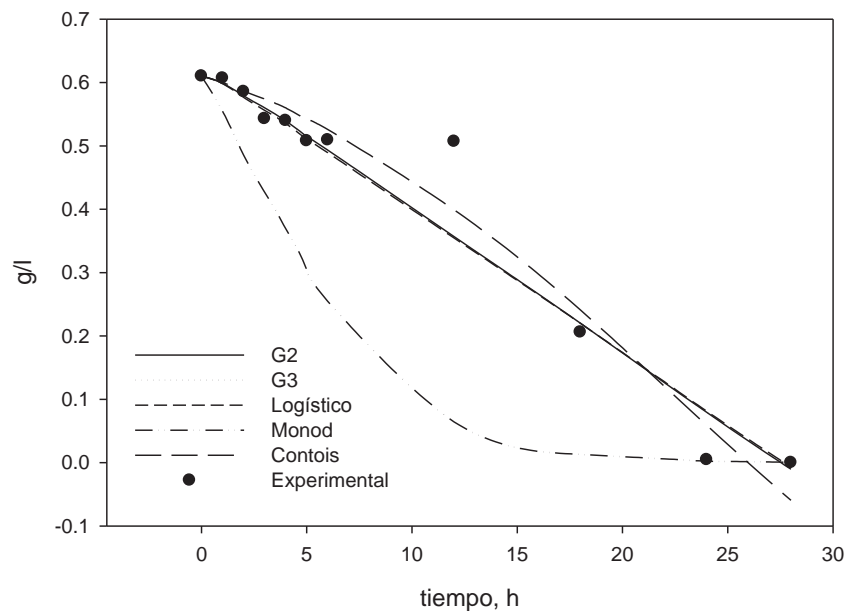
Tiempo (h)	Biomasa (g/l)	Azúcares (g/l)	°Brix	pH	g(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /l
0	3	0.61	9	4.5	1.24804
1	6.6	0.60695	8.9	4.5	1.29484
2	6.65	0.5856	8.2	4.47	1.05616
3	6.75	0.5429	8.5	4.46	1.1989
4	6.85	0.53985	8.2	4.44	0.9298
5	7.15	0.507825	8	4.39	0.94852
6	7.35	0.50935	7.8	4.26	0.89236
12	7.5	0.5070625	7	3.73	0
18	8.25	0.205875	5	3.44	0
24	9.2	0.004575	3.5	3.49	0
28	8.9	0	3.2	3.52	0

#### **4. 3 Ajuste de las cinéticas de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato**

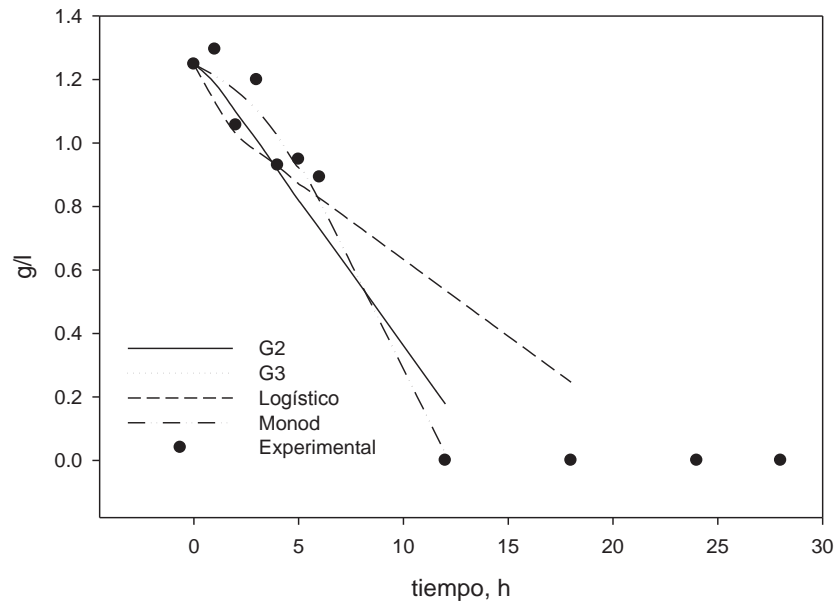
A partir de los datos obtenidos en la prueba confirmatoria, es posible ajustar los datos a los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros, Logístico, Monod y de Contois, haciendo uso de los programas reportados Castañeda y Mateo (2006).



**Figura 4.3-1.** Ajuste de Datos experimentales de Biomasa para la prueba confirmatoria, con los modelos de Monod, Logístico, Contois y de Gompertz de dos y tres parámetros.



**Figura 4.3-2.** Ajuste del consumo de Azúcar para la prueba confirmatoria, con los modelos de Monod, Logístico, Contois y de Gompertz de dos y tres parámetros.



**Figura 4.3-3.** Ajuste del consumo de Nitrógeno Amoniacal para la prueba confirmatoria, con los modelos de Monod, Logístico, y Gompertz de dos y tres parámetros.

Como se puede apreciar en las figuras 4.3-2, los modelos que ajustan mejor los datos, son el de Contois y el de Monod, para los que se puede observar una tendencia más favorable. De la figura 4.3-3 se puede concluir que el nitrógeno no es un sustrato que limite el crecimiento celular, por el contrario, lo promueve de manera satisfactoria. Ninguno de los modelos establece una tendencia definida cuando se considera que el nitrógeno es el sustrato que limita el crecimiento.

En la figura 4.3-1 se aprecia que el modelo de Monod refleja la tendencia de crecimiento celular de un cultivo por lotes (el resto de los modelos predicen el comportamiento del sistema como si se tratase de un cultivo en estado estacionario). De acuerdo a los resultados obtenidos por el programa utilizado, es posible reportar un valor medio para la velocidad específica de crecimiento de  $0.56 \text{ h}^{-1}$ .

A continuación se muestran los valores de los coeficientes de rendimiento y mantenimiento para el azúcar y el nitrógeno como sustratos.

**Tabla 4.3-1.** Coeficiente de Rendimiento  $Y_{xs}$  gr de biomasa \* gr de azúcar<sup>-1</sup> para los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3).

Matraz	G3	G2	Logístico
1	14.06709	14.82552	158.707
2	6.15264	25.19104	30.90147
3	65.98662	46.50209	368.9635
4	19.93597	128.381	71.50688
5	13.6863	19.22187	60.33081
6	5.130347	6.73841	6.109881
7	7.194671	23.26485	42.83799
8	2165.479	263.3451	1776.531
9	29.80397	165.6766	206.4577
10	23.7615	24.7413	118.4722
11	20	75.91362	6.34E+09
12	8.745757	53.21327	40.95205
13	3.689261	6.513305	13.31846
14	5.79E+09	49.42628	8.31E+09
15	8.722625	14.91941	43.6891
16	68.0945	28.78295	9.29E+09
17	8.279227	18.37112	33.38724

**Tabla 4.3-2.** Coeficiente de mantenimiento, m para el azúcar obtenido con los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3).

Matraz	G3	G2	Logístico
1	0.000641079	0.000421	0.011312
2	0.001300817	1E-10	0.015421
3	0.002816075	0.000482	0.004956
4	0.00190877	1E-10	0.012303
5	0.002449435	1E-10	0.011642
6	1E-10	1E-10	0.013681
7	0.001716291	1E-10	0.011307
8	0.001850907	0.000468	0.002669
9	0.002439065	1E-10	0.010213
10	0.002374005	6.06E-05	0.007082
11	0.0019	1E-10	0.001981
12	0.001445846	1E-10	0.01335
13	1E-10	1E-10	0.010935
14	0.002789903	0.000985	0.002791
15	0.0011243	1E-10	0.008507
16	0.003198688	1E-10	0.003363
17	0.000652571	1E-10	0.007412

**Tabla 4.3-3.** Coeficiente de Rendimiento  $Y_{xn}$  gr de biomasa \* gr de nitrógeno<sup>-1</sup> para los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3).

Matraz	G3	G2	Logístico
1	5.243966	5.911009	11.93805
2	1.531381	9.982221	5.111441
3	4.97695	21.62962	24.00551
4	3.519151	75.44949	11.531
5	2.99372	10.65656	11.09842
6	2.124226	2.794924	1.710505
7	2.136246	15.15797	5.855513
8	15.97775	263.3451	69.44625
9	3.797353	51.07513	27.95968
10	4.497024	13.7748	17.95617
11	4.537839	69.07637	19.2612
12	2.533098	18.39252	11.61284
13	2.22723	3.955517	3.013573
14	2.685853	23.04222	6.391163
15	2.288871	5.986118	6.854631
16	1.955992	13.82107	13.96051
17	3.368506	10.2041	4.786659

Los valores del coeficiente de rendimiento obtenidos con respecto al nitrógeno son sustancialmente menores comparados con los valores reportados para el azúcar.

Interpretando este cociente podemos concluir que es mayor la cantidad de sulfato de amonio teórica necesaria para producir la misma cantidad de levaduras, sin embargo, aumentar la cantidad de nitrógeno suministrada no producirá el efecto esperado, pues no se trata de un sustrato que limite el crecimiento, sino más bien un sustrato que favorece el crecimiento bacteriano en las etapas tempranas de la fermentación.

**Tabla 4.3-4.** Coeficiente de mantenimiento, m para el nitrógeno obtenido con los modelos Logístico y Gompertz de dos (G2) y tres parámetros (G3).

	G3	G2	Logístico
1	1E-10	1E-10	0.113461
2	1E-10	1E-10	0.321464
3	1E-10	1E-10	0.127846
4	0.000947	1E-10	0.256832
5	1E-10	1E-10	0.193187
6	1E-10	1E-10	0.181464
7	1E-10	1E-10	0.253455
8	0.004424	0.000468	0.093639
9	1E-10	0.00431	0.230544
10	0.000455	1E-10	0.118502
11	1E-10	1E-10	0.12162
12	0.01297	1E-10	0.180196
13	1E-10	1E-10	0.155617
14	1E-10	1E-10	0.167039
15	1E-10	1E-10	0.165237
16	0.000781	1E-10	0.162241
17	1E-10	1E-10	0.151611

## **CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 Conclusiones**

Es posible apreciar que si bien un elevado pH inhibe la producción de alcohol, no evita que las levaduras se reproduzcan a una tasa aceptable, garantizando que la producción máxima de levaduras, se lleva a cabo con una cantidad de sustrato suficiente (en este caso, se encuentra en exceso) y una cantidad también razonable de entre 1 y 1.2 g/l de sulfato de amonio en la etapa de retraso, para promover el crecimiento y acelerar el metabolismo y reproducción celular.

De acuerdo al análisis estadístico efectuado, se puede establecer que el nitrógeno amoniacal promueve en efecto el crecimiento celular especialmente durante la fase exponencial y se agota en promedio durante las primeras ocho horas de fermentación cuando la presencia del metabolito principal es casi nula o muy baja. Lo que se interpreta como un agotamiento súbito de la fuente de Nitrógeno en la etapa previa al crecimiento exponencial.

Tras haber analizado estadísticamente los resultados obtenidos en la etapa experimental, se puede concluir que los parámetros que afectan más significativamente la variable de respuesta, son la cantidad de azúcar inicial y el nitrógeno amoniacal adicionado.

Considerando los valores obtenidos para el coeficiente de rendimiento y teniendo en cuenta el nitrógeno como sustrato limitante, se puede concluir que la presencia del nitrógeno no limita el crecimiento, pero sí promueve el acoplamiento del organismo en el medio y su crecimiento inicial. Al compararlos con los valores obtenidos para el azúcar es apreciable que son significativamente menores debido a que el sustrato que en efecto limita el crecimiento de las levaduras, es el azúcar.

A pesar de reconocer que la producción alcohólica puede ser representada mejor mediante otros modelos, son los modelos de Contois y Monod los que describen mejor el crecimiento celular en la etapa de inoculación.



## 5.2 Recomendaciones para trabajos futuros

- Puede estudiarse el efecto de la fuente de nitrógeno suministrada probándose otras sales de amonio o aminoácidos.
- Es también cuantificable el requerimiento de nitrógeno, pues varía de una cepa a otra y se hallan pocos valores reportados en la literatura. Se puede determinar la cantidad de nitrógeno necesaria para maximizar la producción de alcohol o de levaduras según sea el caso, entre una cepa y otra, previa caracterización de las mismas.
- La temperatura es una variable que no se estudió a profundidad, pues se trabajó el valor más bajo con el cual las levaduras pueden operar. Es sabido que el efecto de la temperatura puede influenciar la formación de otro tipo de compuestos, además del etanol, favoreciendo la producción de unos por encima de la de otros, sería conveniente cuantificar el efecto de la formación de estos subproductos en la variable de respuesta, así como la intoxicación del medio de cultivo y su efecto en las propiedades organolépticas finales del trago.

## REFERENCIAS

- Arrizón, J., Gschaedler, A. (2009). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. Published on the NRC Research Press.
- Atkinson, A. C., Donev, A. N., Tobias, R. D. (2007). Optimum Experimental Designs, with SAS. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-929660-6.
- Bairoch A. (2000). The ENZYME database in 2000. Nucleic Acids Res. PMID 10592255.
- Bafrnacová, P., Smogrovicova, D., Slavikova, I., Patkova, J., and Domeny, Z. (1999). Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Lett. 21: 337–341.
- Barnett J.A., (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. Microbiology (Reading, Engl.) 149 (Pt 3): 557–67.
- Bely, M., Salmon, J.M., and Barre, P. (1990). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentations. J. Inst. Brew. 100: 279–282.
- Berry, D.R., and Watson, D.C. (1991). Production of Organoleptic Compounds. In: *Yeast Biotechnology*. Berry, D.R. Russell, I. and Stewart, G.G. eds. Allen & Unwin. London.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 50(1): 107–119.
- Bisson, L.F., Neigeborn, L., Carlson, M., and Fraenkel, D.G. (1987). The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 169: 1656–1662.

- Box, G., Behnken, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, Volume 2, pages 455–475.
- Box, G. E. P. and Draper, N (1987). *Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses*, Second Edition (of *Empirical Model-Building and Response Surfaces*). Wiley.
- Box, G. E. P. and Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society*.
- Busturia, A., and Lagunas, R. (1986). Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 379–385.
- Casey, G.P., and Ingledew, W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Microbiol.* 13: 219–280.
- Chichester, C. O. (1986). *Advances in Food Research (Advances in Food and Nutrition Research)*. Boston: Academic Press. ISBN 0-12-016430-2.
- Ciriacy, M., and Reifemberger, M. (1997). Hexose transport. *In Yeast sugar metabolism*. Edited by F.K. Zimmermann and K. Entian. Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania.
- Cornell, J. (2002). *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data (third Ed.)*. Wiley.
- Demain, A. L. (1980). *Microbial Production of Primary Metabolites*. MIT.
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. ISSN 1369-5274. PMID 18359269. 2008.
- Engan, S. (1981), Beer Composition. In: *Brewing Sciences*. Pollock, J.R.A. ed. vol. 2. pp. 94–104. Academic Press, London.

- Eykhoff, P. (1974). System Identification: Parameter and State Estimation, Wiley & Sons. ISBN 0471249807.
- Grisham, Charles M., Reginald H. Garrett. (1999). Biochemistry. Philadelphia: Saunders College Pub. pp. 426–7. ISBN 0-03-022318-0. 1999.
- Ingledeew, W.M., and Kunkee, R. (1985). Factors influencing sluggish fermentation in grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 65–76.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J., and Del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentation in wine yeast. A molecular study. *Biotechnol. Bioeng.* 64(6): 698–708.
- Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(1): 75–83.
- Klein D., Prescott L., Harley M. (2005). Microbiology. Mc Graw Hill New York. ISBN 0-07-255678-1.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (2006). Yeast Systematics and Phylogeny—Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, *The Yeast Handbook*, Springer.
- Kurtzman CP, Piskur J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in *Comparative Genomics: Using Fungi as Models*. Sunnerhagen P, Piskur J, eds.). Berlin: Springer. pp. 29–46. ISBN 978-3-540-31480-6.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.*

- Lawrence, E., Holmes, S. (1989). Henderson's dictionary of biological terms (10th ed.), University of Michigan: Wiley, ISBN 9780470214466.
- Madigan, M. T, Martinko, J. M. y Parker, J. B. (2003). Biología de los Microorganismos, 10ª edición. Ed. Prentice-Hall, Madrid. ISBN 978-84-205-3679-8.
- Manginot, C., Roustan, J.L., and Sablayrolles, J.M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 511–517.
- Manginot, C., Sablayrolles, J.M., Roustan, J.L., and Barre, P. (1997). Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 373–380.
- Mauricio, J.C., and Salmon, J.M. (1992). Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.* 14(7): 577–582.
- Montgomery D. C. (2004). Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa-Wiley ISBN: 968-18-6156-6.
- Muñoz, E., and Ingledew, W.M. (1990). Yeast hulls in wine fermentations. A review. *J. Wine Res.* 1(3):197–209.
- Nelson, David; Cox, Michael. (2004). Glycolysis, Gluconeogenesis and the Pentose Phosphate Pathway, *Lehninger's Principles of Biochemistry*, W.H.Freeman.
- Phillips T., (2009). Planets in a Bottle: More about yeast. [Science@NASA](#).
- Pinal L., Arellano M., Herrera E., Núñez I., Arrizón J., Gschaedler A. (2009). Effect of Agave tequilana age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation

process. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Society for Industrial Microbiology.

Pinal L., Cedeño M., Gutiérrez H., and Alvarez-Jacobs J. (1997). Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters*, Vol 19, No 1, pp. 45–47

Presley, B.J. (1971). Techniques for analyzing Interstitial Water Samples. Part I: Determination of selected Minor and Major constituents. In Winterer et al. Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project, Volume VII. Washington, U.S. Government Printing Office.

Ramsay, C. and Berry, D.R., (1981), Physiological Control of Higher Alcohol Formation in Scotch Whisky Fermentation. In: *Current Developments in Yeast Research*. Stewart, G.G. and Russell, I. Pergamon Press. London, Canada

Richens, D. T. (1997). The chemistry of aqua ions : synthesis, structure, and reactivity : a tour through the periodic table of the elements. Wiley. ISBN 0471970581.

Robinson, J. (2002). The Oxford Companion to Wine" Third Edition pg 664-665 Oxford University Press. 2006 ISBN 0198609906

Roberfroid M. (2005). Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* 93 Suppl 1: S13–25. PMID 15877886.

Romano, P. and Suzzi, G. (1993), *J. of Appl. Bacteriol.* 75, 541–45.

Salmon, J.M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(4): 953–958.

Salmon, J.M., and Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-

- assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. Appl. Environ. Microbiol. 64(10): 3831–3837.
- Salmon, J.M., and Mauricio, J.C. (1994). Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. Biotechnol. Lett. 16(1): 89–94.
- Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.M., Bely, M., and Barre, P. (1993). Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 44(1): 56–64.
- Sanghani PC, Robinson H, Bosron W. F, Hurley T. D. (2002). Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI- (1994). Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.
- Smidt O., du Preez J., Albertyn J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae* : a comprehensive review. University of the Free State. Journal compilation, Federation of European Microbiological Societies. Published by Blackwell Publishing Ltd.
- Smith E, Morowitz H. (2004). Universality in intermediary metabolism. Proc Natl Acad Sci USA. PMID 15340153. PMC 516543.
- Smith y col. (1997). Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. Oxford (Oxfordshire): Oxford University Press. ISBN 0-19-854768-4.
- Solórzano L. (1969). Determination of Ammonia in Natural Waters by the Phenolhypoclorite Method. Limnol Oceanograph., 14: 199-801

Stryer, Lubert. Biochemistry. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-0174-X. 1975

Thomas, K., Hynes, S.H., and Ingledew, W.M. 1996. Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. Biotechnol. Lett. 18(10): 1165–1168

Thomas, K., and Ingledew, W.M. 1990. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high gravity mashes. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2046–2050.

Voet V. Biochemistry. 2nd. Ed. John Willey & Sons Inc. New York, New York. 1995.

Xu, P., Thomas, A., and Gilson, C.D. 1996. Combined use of three methods for high concentration ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Lett. 18(12): 1439–1440.



## APÉNDICES

### A1. Determinación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico

Preparación del Reactivo DNS (1 L de solución).

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

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

#### Obtención de los estándares de calibración

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

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

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

## **A2. Determinación de nitrógeno amoniacal**

Se trata de una prueba colorimétrica propuesta por Solórzano (1969) y Presley (1971).

Se preparan las siguientes soluciones:

**Solución A:** Pesar 2 g de Fenol y aforar a 250 ml con etanol (Solución estable).

**Solución B:** Diluir 0.185 g de Ferrociamida aforando a 250 ml de agua destilada y conservar en un frasco ámbar y sin contacto con la luz solar (Estable por una semana)

**Solución C:** Diluir 3.75 g de Citrato de Sodio con 0.2 g de NaOH y aforar a 250 ml con agua destilada (Solución estable).

Tomar 100  $\mu$ l del filtrado de la biomasa y completar el volumen a 10 ml con agua destilada.

Colocar 1 ml de esta dilución en un tubo de ensayo. Agregar 1 ml de la solución A, 1 ml de la solución B y 2 ml de la solución C. Agregar 40  $\mu$ l de hipoclorito de sodio y agitar en un vórtex.

Permitir que desarrolle un color azulado (2 a 3 horas son suficientes para que se complete la reacción) y tomar su lectura en el refractómetro a 640 nm.

### **Preparación de los estándares de calibración**

Pesar 6.607 g de Sulfato de Amonio deshidratado y aforar a 1 l. Con esto se tendrá una solución 50 mM. Preparar con ella estándares de calibración dependiendo del intervalo de concentraciones con el que se vaya a trabajar.

Los blancos no deben exceder 0.020 unidades de absorbancia.

### A3. Regresión multilínea

Una extensión útil de la regresión lineal, es el caso en que “y” es función lineal de dos o más variables. Por ejemplo, “y” podría ser función lineal de dos variables independientes  $x_1$  y  $x_2$ , de tal forma que su dependencia se podría expresar como:

$$\hat{y} = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \delta$$

Donde  $\delta$ , es el residuo (o la distancia vertical del valor dato con el valor obtenido a partir de la función modelo:  $y - \hat{y}$ ).

Los mejores valores para los coeficientes se obtienen al realizar la suma de los residuos al cuadrado para todo el conjunto de datos.

$$s = \sum_{i=1}^m \delta_i^2 = \sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^m (y_i - a_0 - a_1x_{1i} - a_2x_{2i})^2$$

Y derivando con respecto a cada uno de los coeficientes desconocidos (manteniendo constantes las otras dos incógnitas), resulta el sistema siguiente:

$$\left[ \frac{\partial s}{\partial a_0} \right]_{a_1, a_2} = -2 \sum_{i=1}^m (y_i - a_0 - a_1x_{1i} - a_2x_{2i})$$

$$\left[ \frac{\partial s}{\partial a_1} \right]_{a_0, a_2} = -2 \sum_{i=1}^m [(y_i - a_0 - a_1x_{1i} - a_2x_{2i})x_{1i}]$$

$$\left[ \frac{\partial s}{\partial a_2} \right]_{a_0, a_1} = -2 \sum_{i=1}^m [(y_i - a_0 - a_1x_{1i} - a_2x_{2i})x_{2i}]$$

Igualando a cero cada una de estas expresiones:

$$0 = -2 \sum_{i=1}^m (y_i - a_0 - a_1x_{1i} - a_2x_{2i})$$

$$0 = -2 \sum_{i=1}^m [(x_{1i}y_i - a_0x_{1i} - a_1x_{1i}^2 - a_2x_{1i}x_{2i})]$$

$$0 = -2 \sum_{i=1}^m [(x_{2i}y_i - a_0x_{2i} - a_1x_{1i}x_{2i} - a_2x_{2i}^2)]$$

Y se introducen las sumatorias dentro de cada término, lo cual produce como resultado:

$$0 = \sum_{i=1}^m y_i - \sum_{i=1}^m a_0 - \sum_{i=1}^m a_1x_{1i} - \sum_{i=1}^m a_2x_{2i}$$

$$0 = \sum_{i=1}^m x_{1i}y_i - \sum_{i=1}^m a_0x_{1i} - \sum_{i=1}^m a_1x_{1i}^2 - \sum_{i=1}^m a_2x_{1i}x_{2i}$$

$$0 = \sum_{i=1}^m x_{2i}y_i - \sum_{i=1}^m a_0x_{2i} - \sum_{i=1}^m a_1x_{1i}x_{2i} - \sum_{i=1}^m a_2x_{2i}^2$$

Después de reacomodarlas, resulta el sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas:

$$ma_0 + \left(\sum_{i=1}^m x_{1i}\right)a_1 + \left(\sum_{i=1}^m x_{2i}\right)a_2 = \sum_{i=1}^m y_i$$

$$\left(\sum_{i=1}^m x_{1i}\right)a_0 + \left(\sum_{i=1}^m x_{1i}^2\right)a_1 + \left(\sum_{i=1}^m x_{1i}x_{2i}\right)a_2 = \sum_{i=1}^m x_{1i}y_i$$

$$\left(\sum_{i=1}^m x_{2i}\right)a_0 + \left(\sum_{i=1}^m x_{1i}x_{2i}\right)a_1 + \left(\sum_{i=1}^m x_{2i}^2\right)a_2 = \sum_{i=1}^m x_{2i}y_i$$

El término  $\sum_{i=1}^m a_0$ , resulta igual a  $(ma_0)$ , ya que  $\sum_{i=1}^m a_0 = a_0 + a_0 + \dots + a_0 = ma_0$

El sistema anterior de ecuaciones también se puede expresar de forma matricial como sigue:

$$\begin{bmatrix} m & \sum x_{1i} & \sum x_{2i} \\ \sum x_{1i} & \sum x_{1i}^2 & \sum x_{1i}x_{2i} \\ \sum x_{2i} & \sum x_{1i}x_{2i} & \sum x_{2i}^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum y_i \\ \sum x_{1i}y_i \\ \sum x_{2i}y_i \end{bmatrix}$$

Y en general para un sistema de una variable dependiente (y) en función de n-variables independientes (x1, x2, ..., xn), el sistema matricial quedará expresado como:

$$\begin{bmatrix} m & \sum x_{1i} & \sum x_{2i} & \dots & \sum x_{ni} \\ \sum x_{1i} & \sum x_{1i}^2 & \sum x_{1i}x_{2i} & \dots & \sum x_{1i}x_{ni} \\ \sum x_{2i} & \sum x_{1i}x_{2i} & \sum x_{2i}^2 & \dots & \sum x_{2i}x_{ni} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sum x_{ni} & \sum x_{1i}x_{ni} & \sum x_{2i}x_{ni} & \dots & \sum x_{ni}^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \\ \vdots \\ a_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum y_i \\ \sum x_{1i}y_i \\ \sum x_{2i}y_i \\ \vdots \\ \sum x_{ni}y_i \end{bmatrix}$$

#### A4. Pseudocódigo en MatLab

```
function [a, yajust, resid, SRC, ECM, r2, cad, D] = mincuadyxx (y, x,
gdo)

if nargin < 3
    gdo = 1;
end
if length(y) ~= size(x,1)
    error('Los vectores deben ser de la misma longitud')
end
if gdo > 2
    error ('El grado de ajuste sólo puede ser 1 ó 2')
end

n = size(x, 2);
m = length(y);
adic = 0;
if gdo == 2
    for i = 1:n-1
        adic = adic+1;
    end
end

cad = '[ones(size(y))]';

for i= 1:n
    cad = [cad, ', x(:,',int2str(i), ')'];
end
if gdo ==2
    if adic == 1
        cad = [cad, ', x(:,1).*x(:,2)'];
    else
        for i = 1:n-1
            for j = i+1:n
                cad = [cad, ', x(:,', int2str(i), ').*x(:,', int2str(j),
')'];
            end
        end
    end
end
```

```

        end
    end
end
for i = 1:n
    cad = [cad, ', x(:,', int2str(i), ').^2'];
end
end
cad = [cad, '];'];

D = eval (cad) ;
a = D \ y;

yajust = D * a;
resid = y - yajust;

p = length(a);

SSyy = y' * y - sum(y)^2 / m;

SRC = y' * y - a' * D' * y;  ECM = SRC / (m - p);
r2 = 1 - SRC / SSyy;

```

## **A5. Evaluación de azúcares con el refractómetro**

Los refractómetros son instrumentos ópticos de aceptable precisión y de un sencillo manejo, se basan en la refracción de la luz al pasar por un prisma; para determinar la magnitud a medir solamente hace falta una pequeña muestra, siendo así un instrumento útil y una prueba relativamente económica.

La desventaja de este tipo de mediciones, es que es indirecta. Cuantifica los azúcares totales, en tanto que los de particular interés para efectos de este trabajo, son los azúcares reductores.

Para los propósitos de este estudio, es un valor útil, pues de acuerdo a las prácticas más comunes en la industria (Pinal y col., 2009), la mezcla de fermentación debe contener la cantidad suficiente de azúcares reductores, que permitan la mayor conversión de alcohol.

El refractómetro utilizado es del tipo PCE-2862, y se emplea de la siguiente manera:

Se colocan de dos a tres gotas de muestra en el prisma.

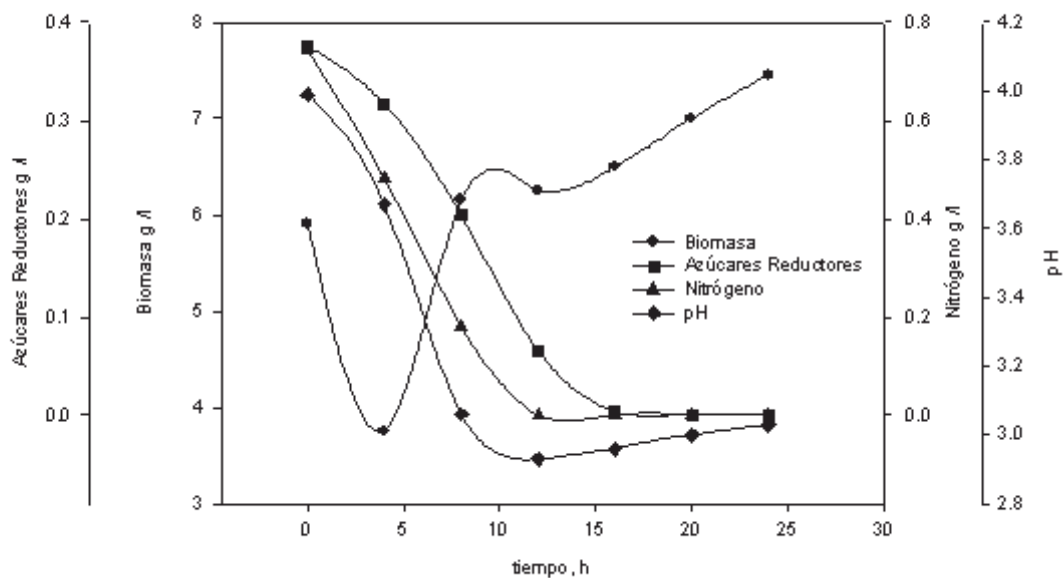
Se cierra con cuidado la cubierta del prisma.

A continuación, se da lectura al contenido de azúcar en grados brix (°Brix)

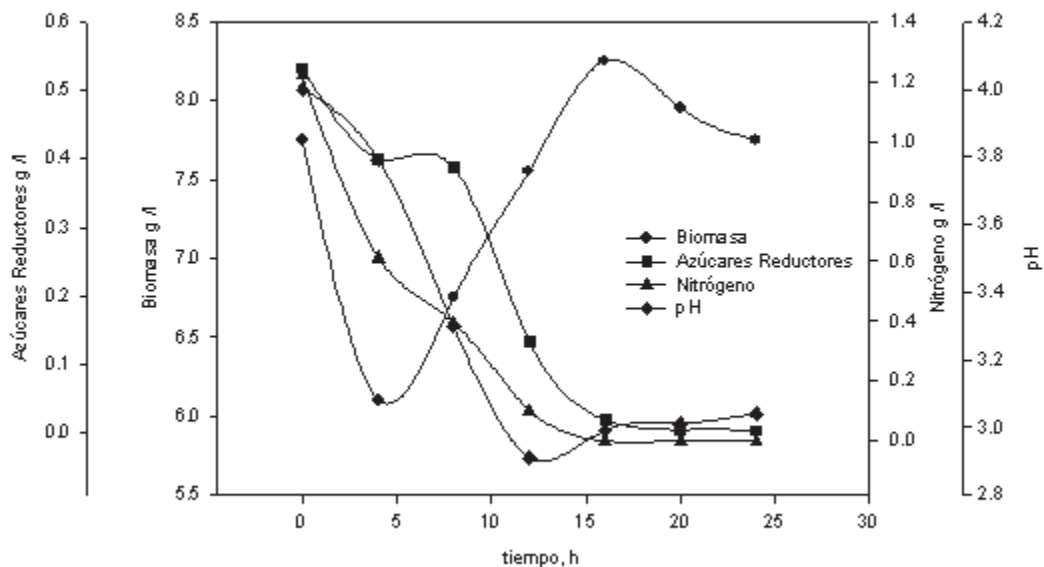
Un líquido tiene un grado Brix (=1 %, Brix) cuando posee la misma densidad que una solución de 1 g de sacarosa en 99 g de agua; tiene 10 Brix (=10 % Brix), cuando su densidad es equivalente a la de una solución de 10 g de sacarosa en 90 g de agua. La sacarosa sirve como referencia de indicación o contenido de azúcar. La medida para la sustancia seca soluble en un líquido (y así aproximándonos al contenido de azúcar) se indica normalmente en "grados Brix" (° Brix).



## A6. Cinéticas experimentales

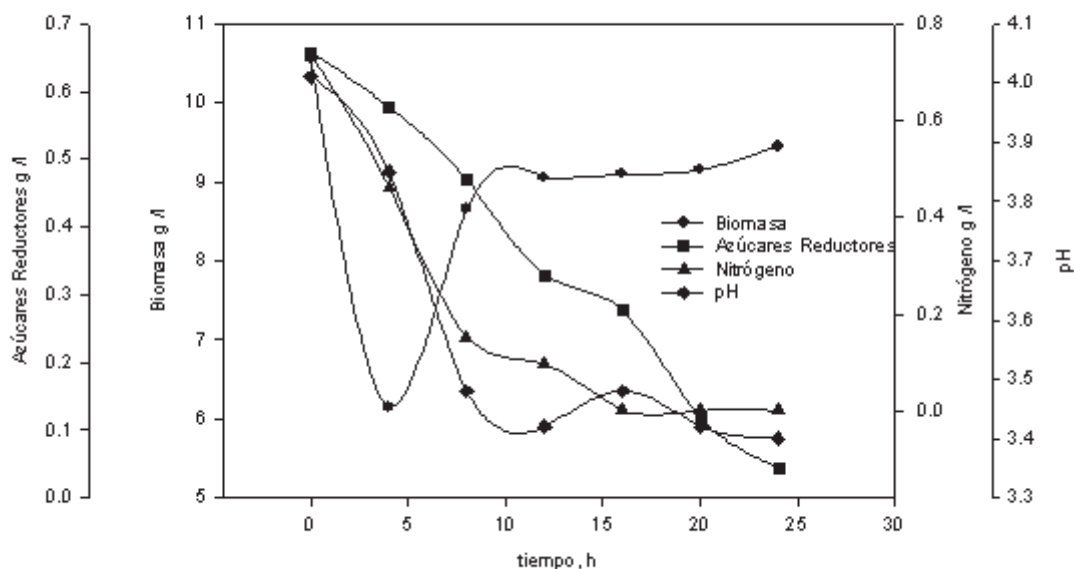


**Figura A6-1.** Datos Experimentales para el Matraz 1; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.

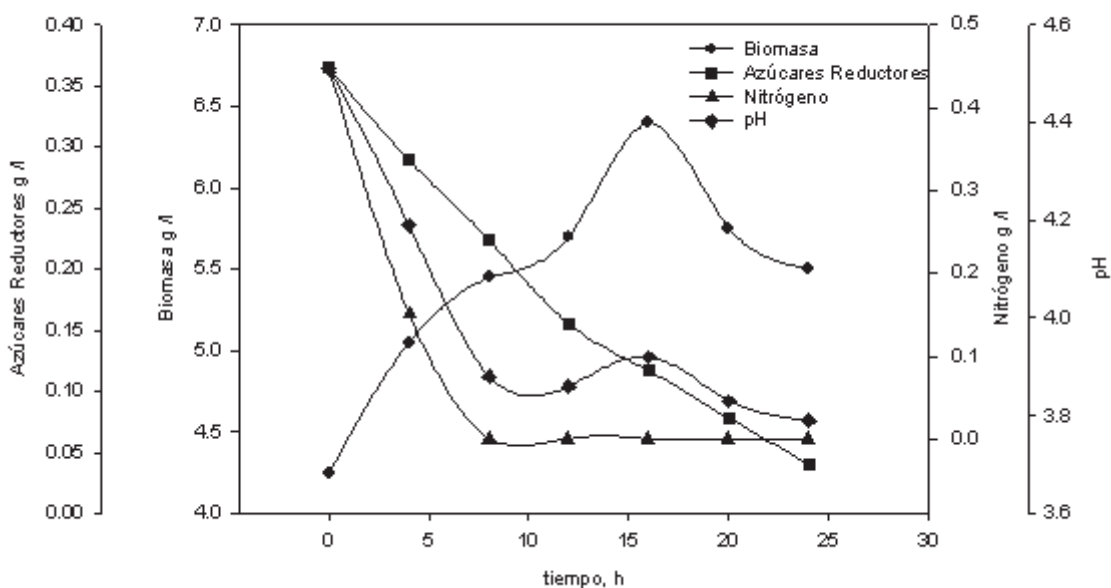


**Figura A6-2.** Datos Experimentales para el Matraz 2; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.

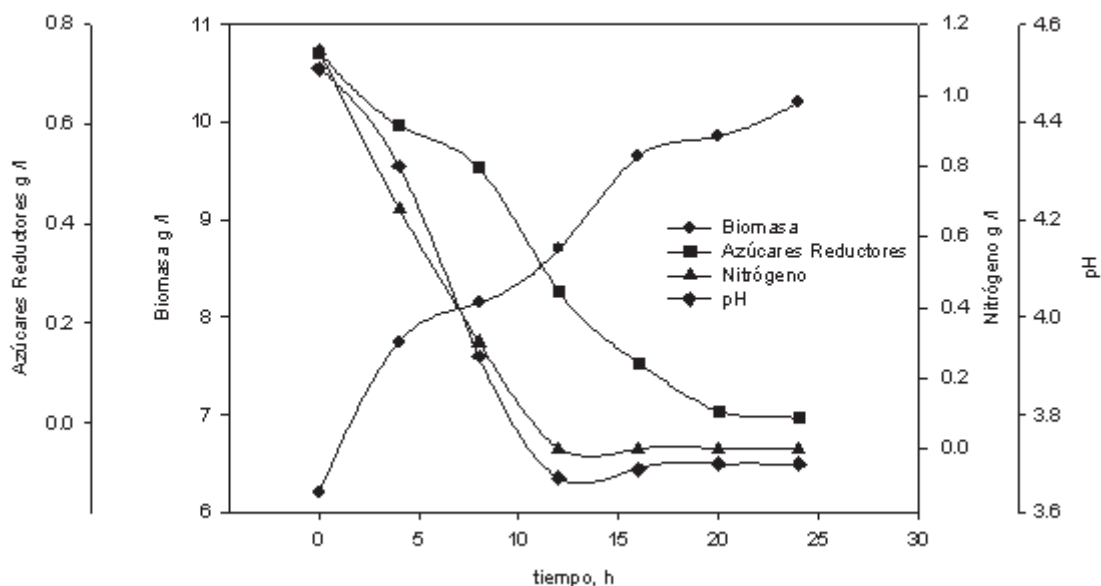
F



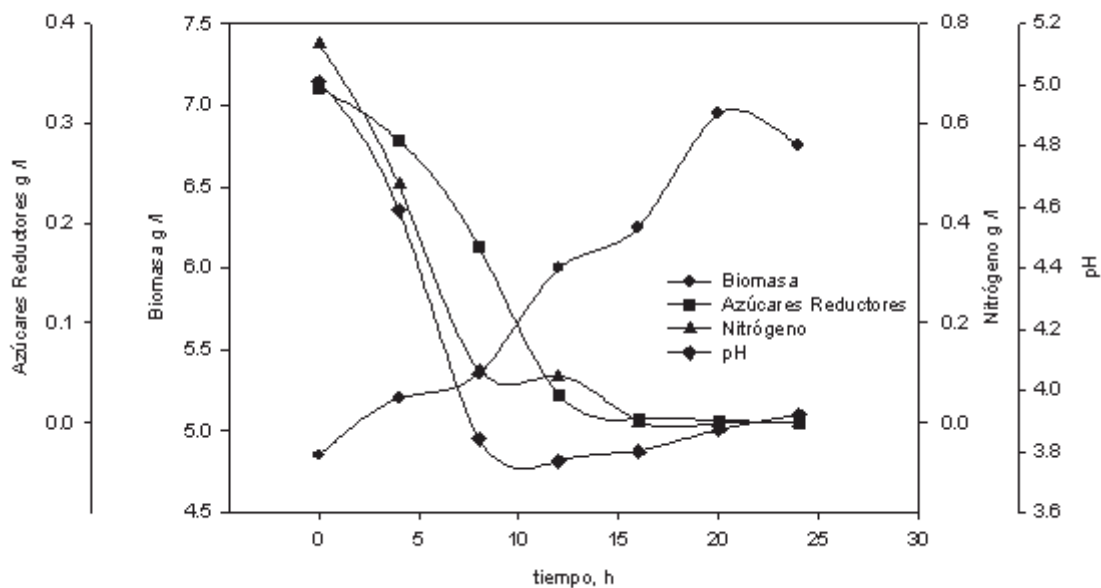
**Figura A6-3.** Datos Experimentales para el Matraz 3; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



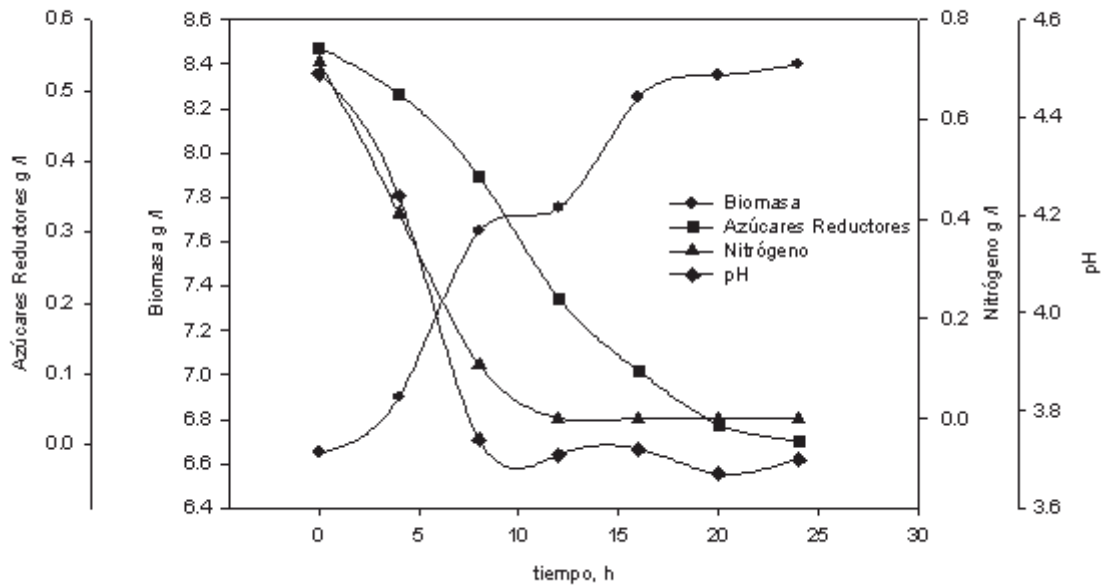
**Figura A6-4.** Datos Experimentales para el Matraz 4; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



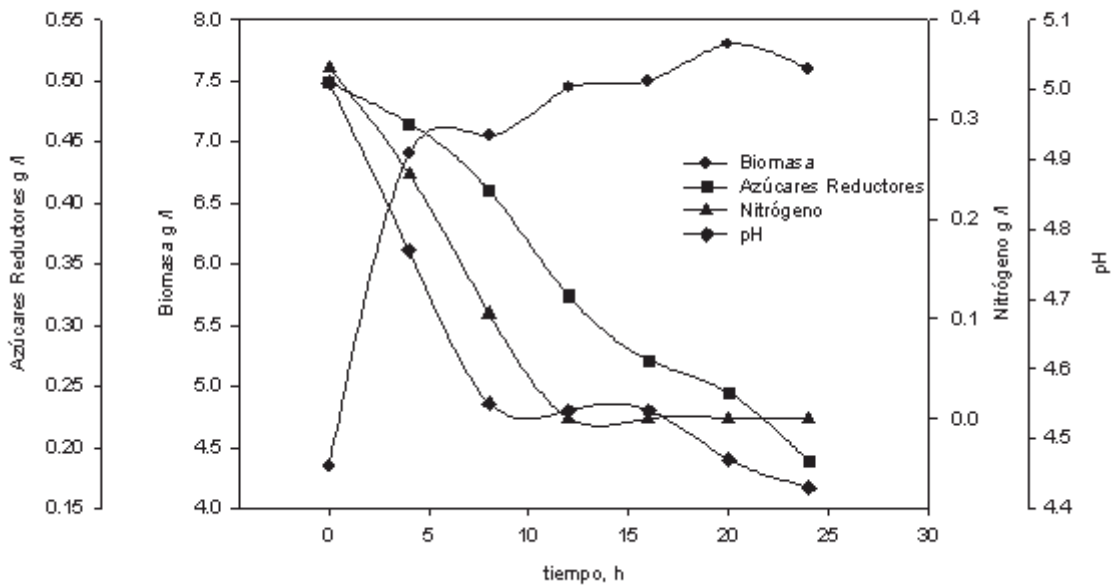
**Figura A6-5.** Datos Experimentales para el Matraz 5; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



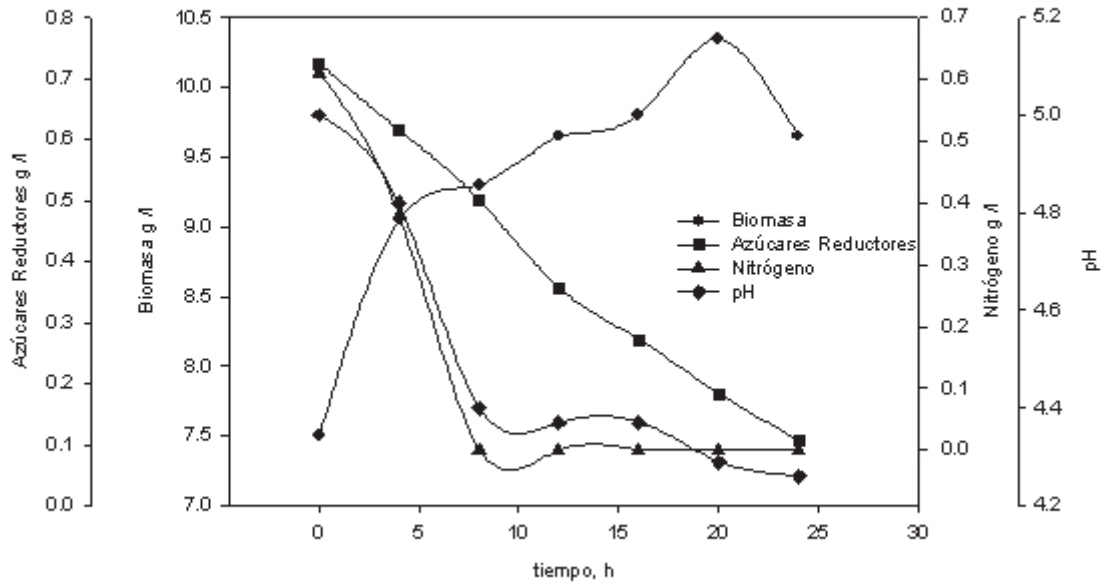
**Figura A6-6.** Datos Experimentales para el Matraz 6; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



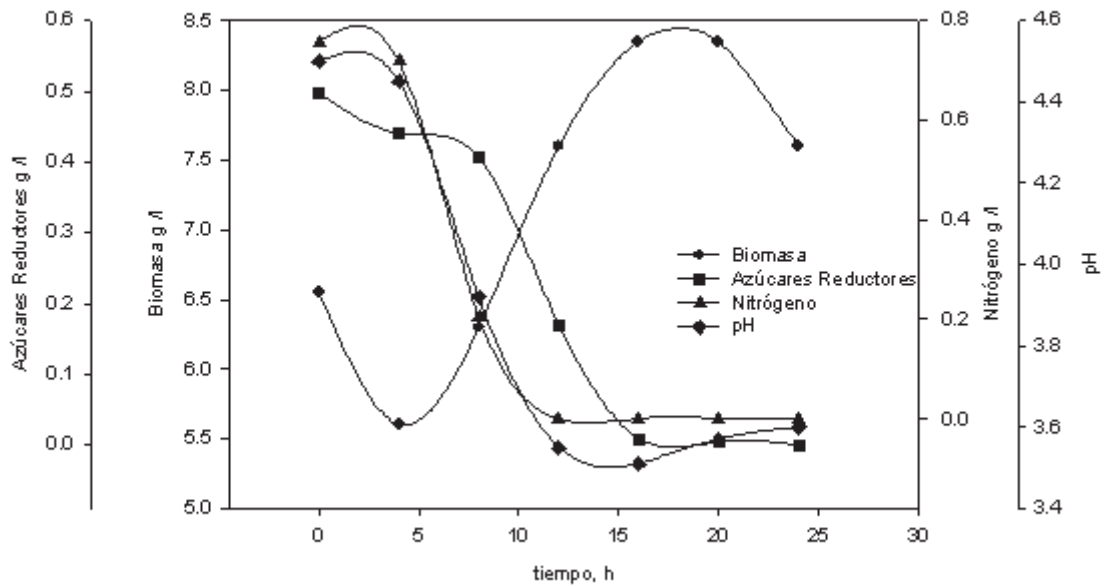
**Figura A6-7.** Datos Experimentales para el Matraz 7; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



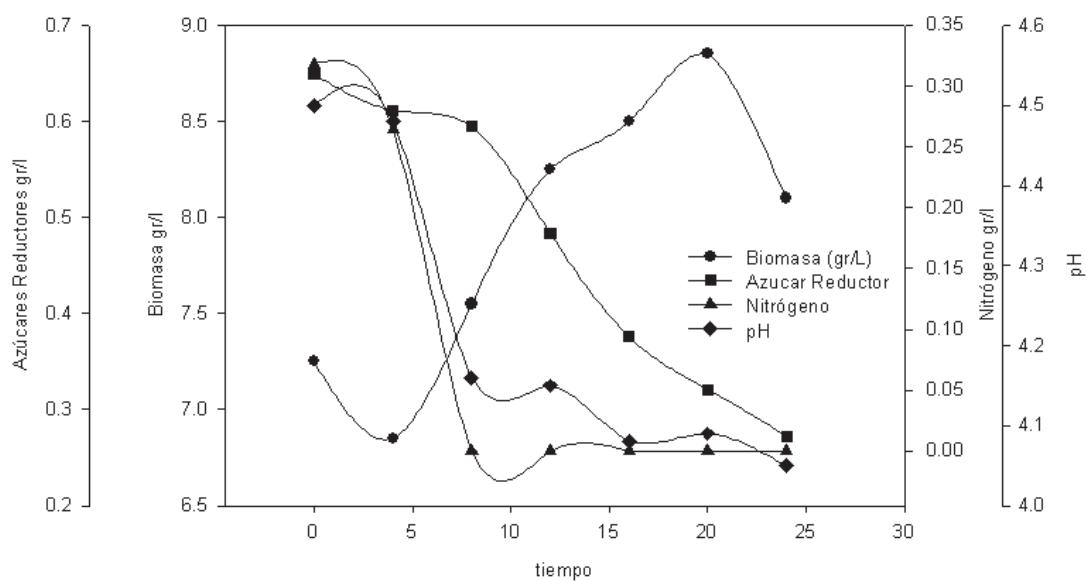
**Figura A6-8.** Datos Experimentales para el Matraz 8; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



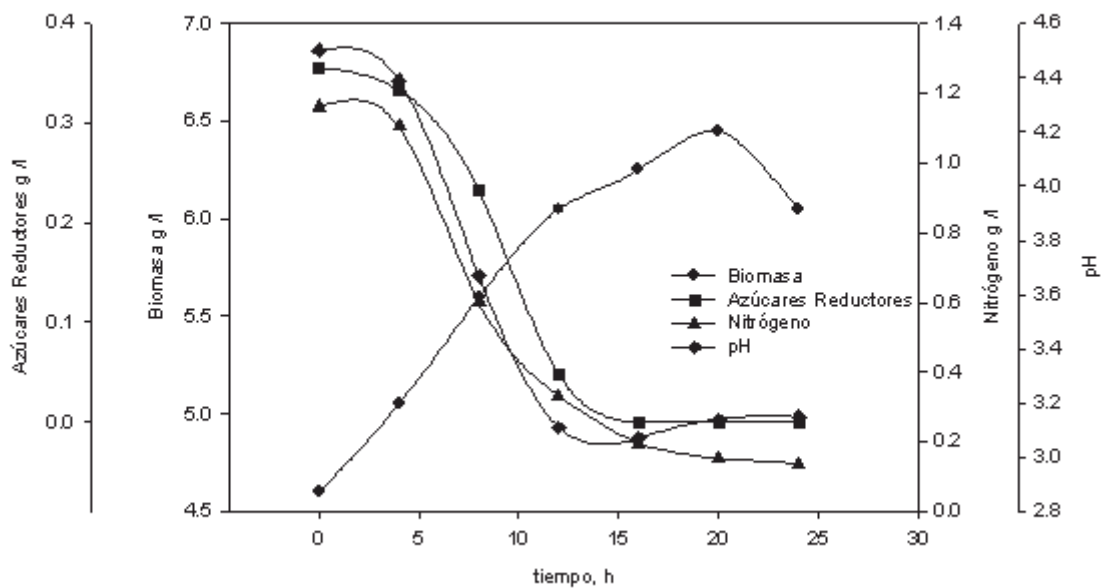
**Figura A6-9.** Datos Experimentales para el Matraz 9; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



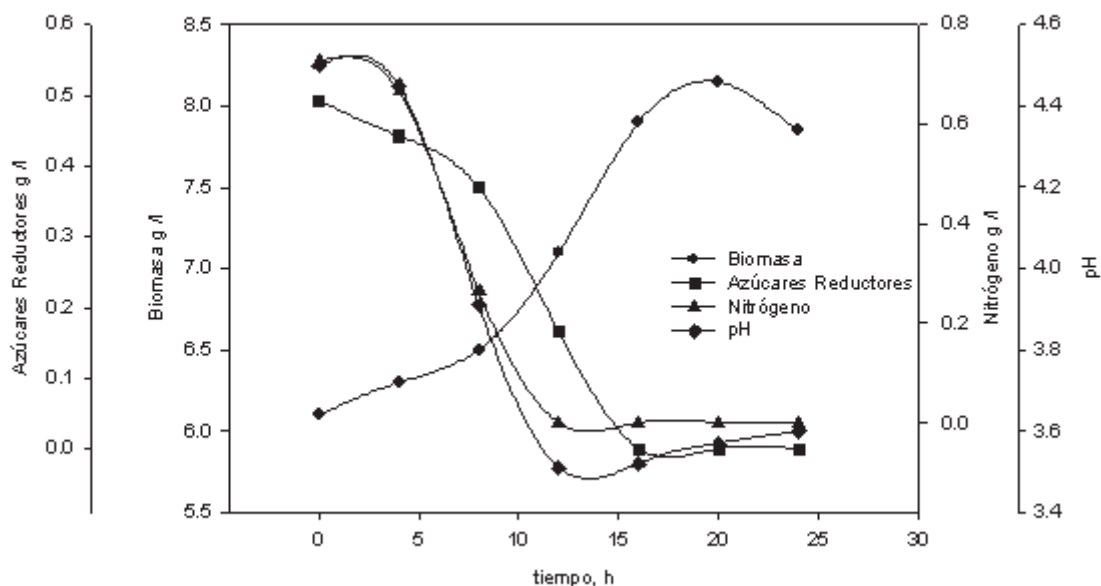
**Figura A6-10.** Datos Experimentales para el Matraz 10; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



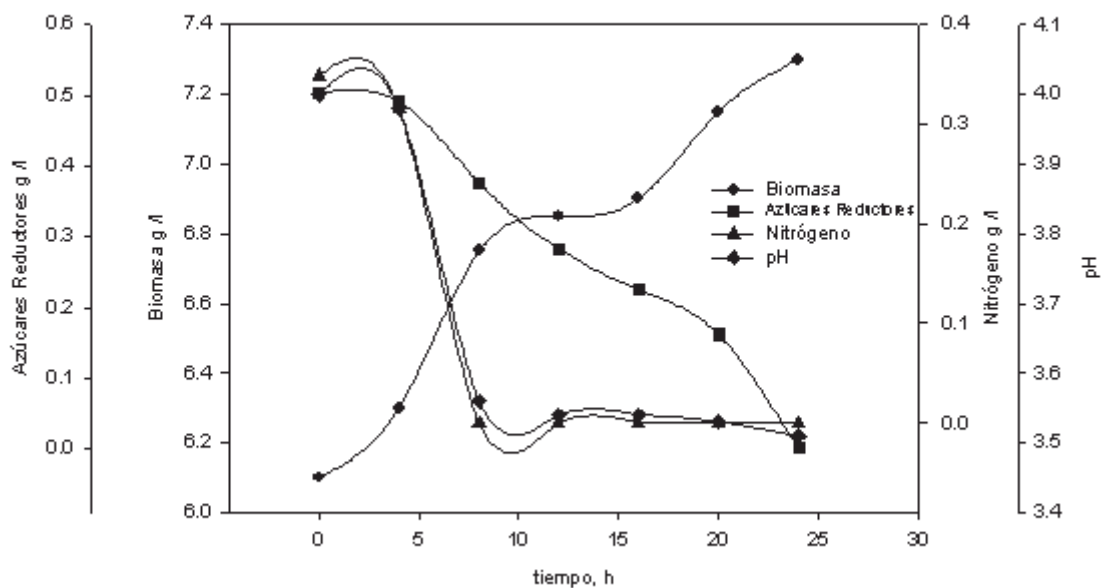
**Figura A6-11.** Datos Experimentales para el Matraz 11; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



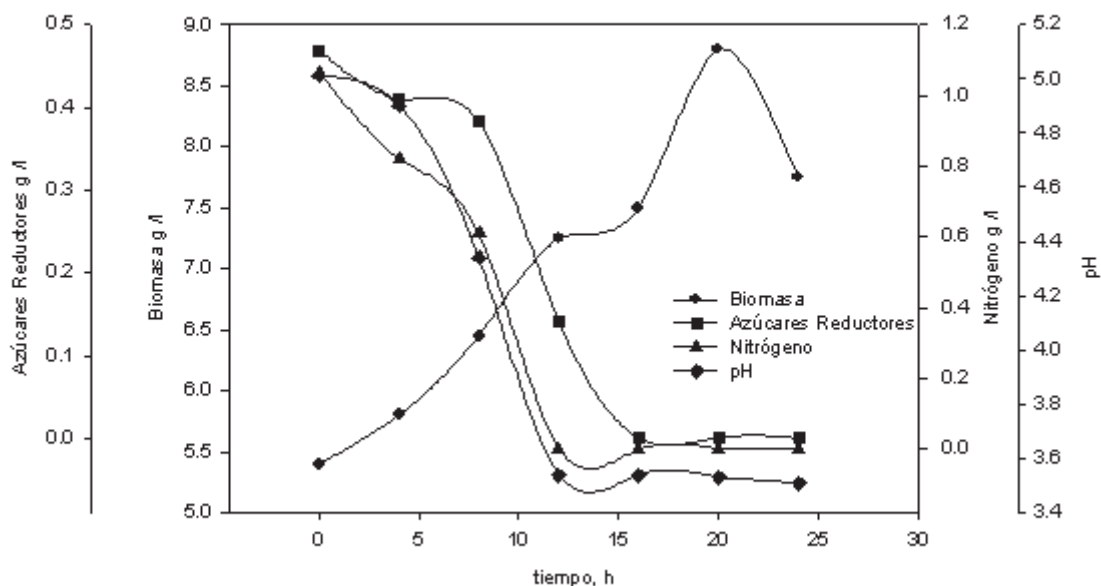
**Figura A6-12.** Datos Experimentales para el Matraz 12; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



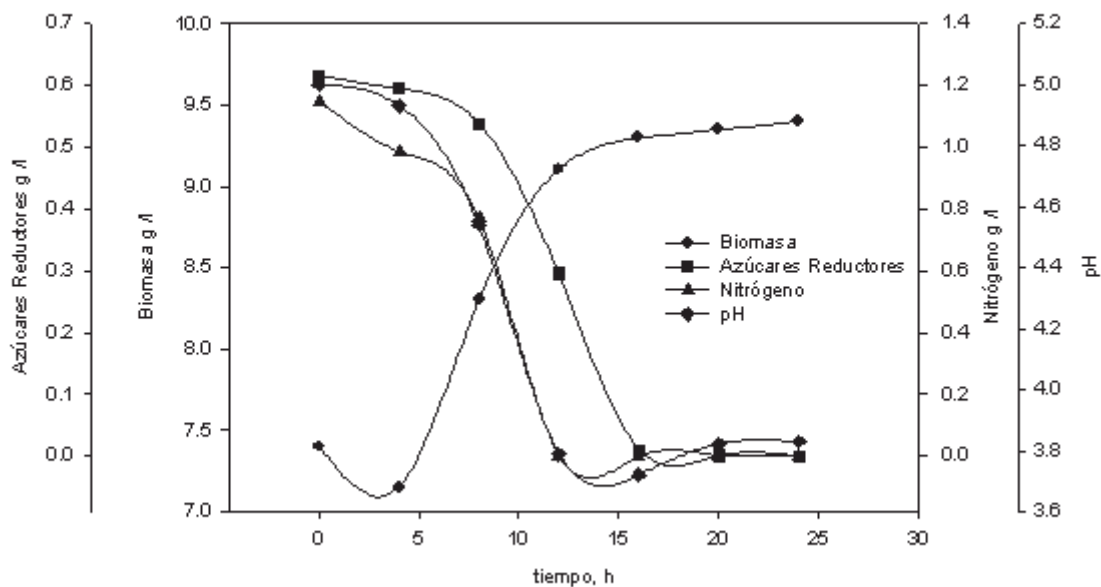
**Figura A6-13.** Datos Experimentales para el Matraz 13; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



**Figura A6-14.** Datos Experimentales para el Matraz 14; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.

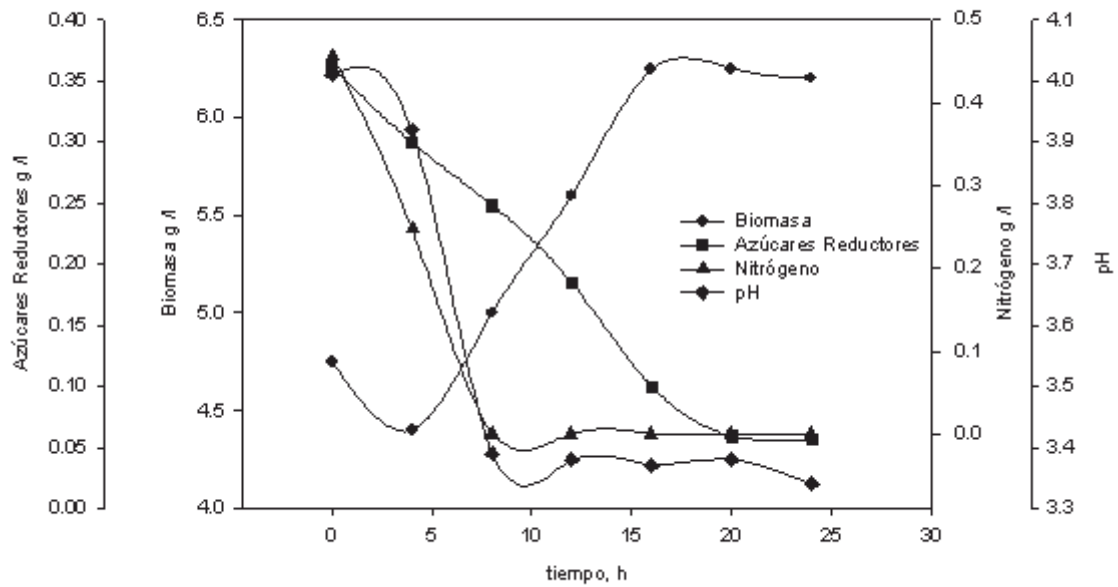


**Figura A6-15.** Datos Experimentales para el Matraz 15; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



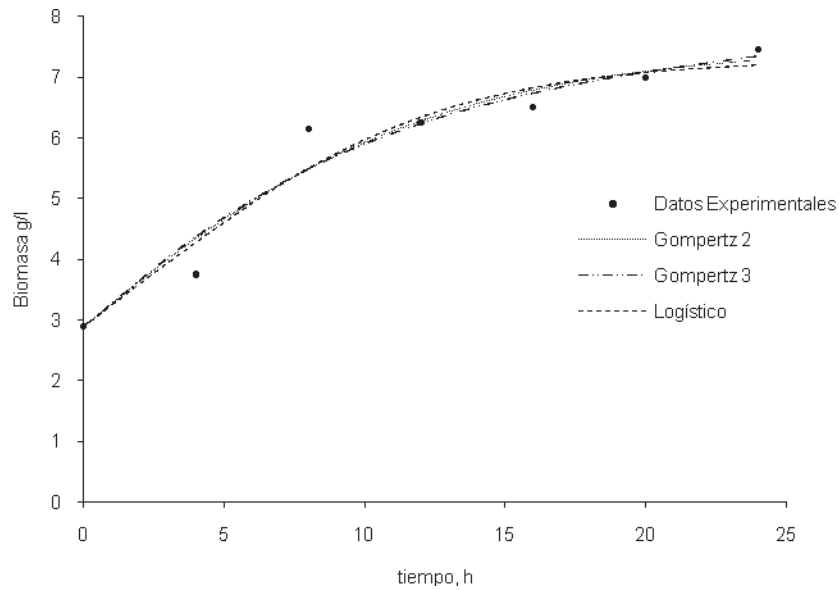
**Figura A6-16.** Datos Experimentales para el Matraz 17; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.



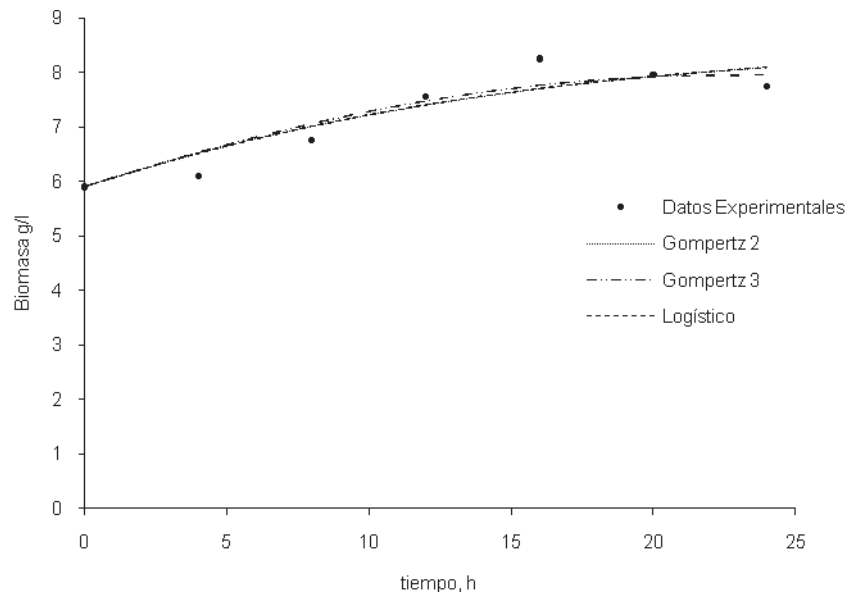


**Figura A6-17.** Datos Experimentales para el Matraz 17; Perfil de Concentración de Biomasa, Azúcares Reductores, Nitrógeno Amoniacal y pH.

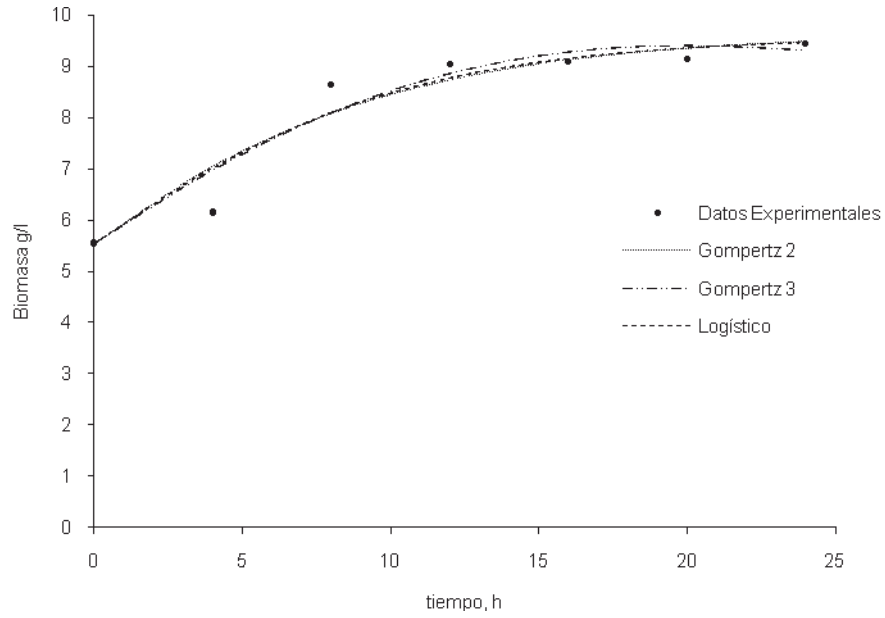
## A7. Ajuste de datos experimentales para la Biomasa



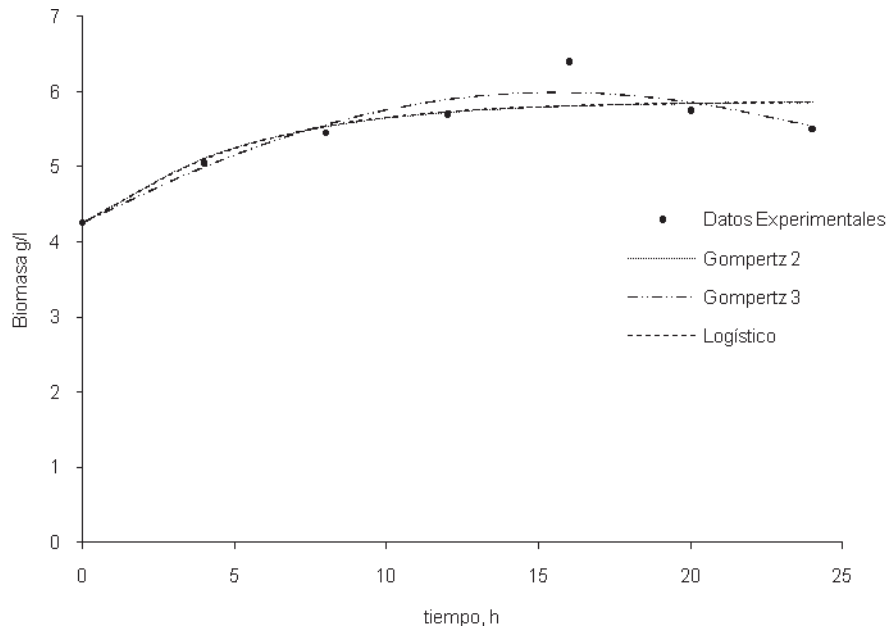
**Figura A7-1.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 1 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



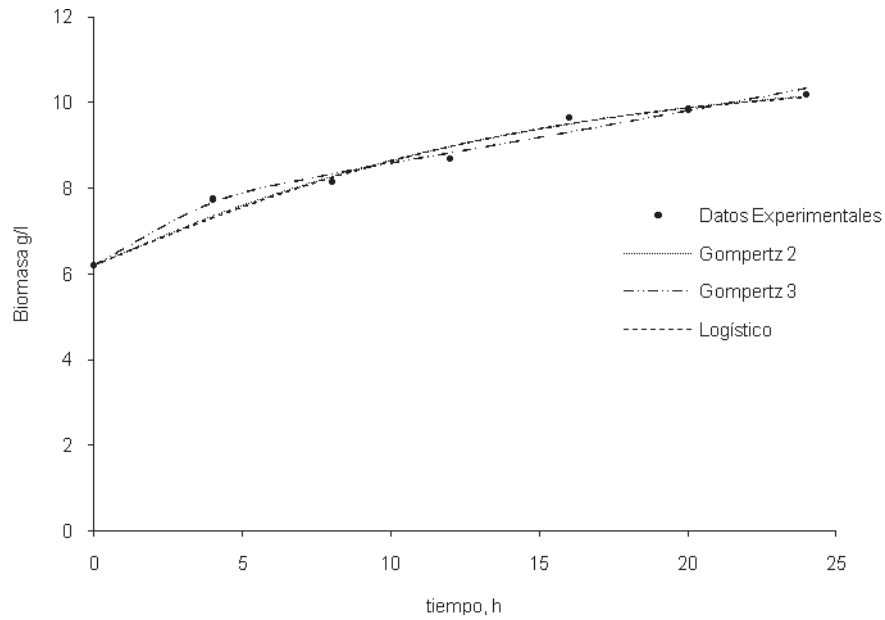
**Figura A7-2.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 2 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



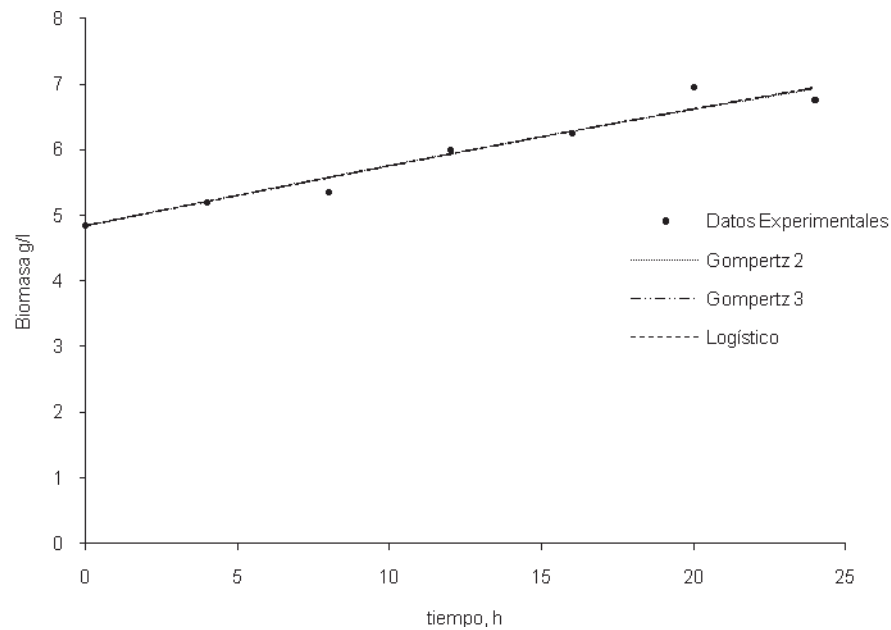
**Figura A7-3.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 3 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



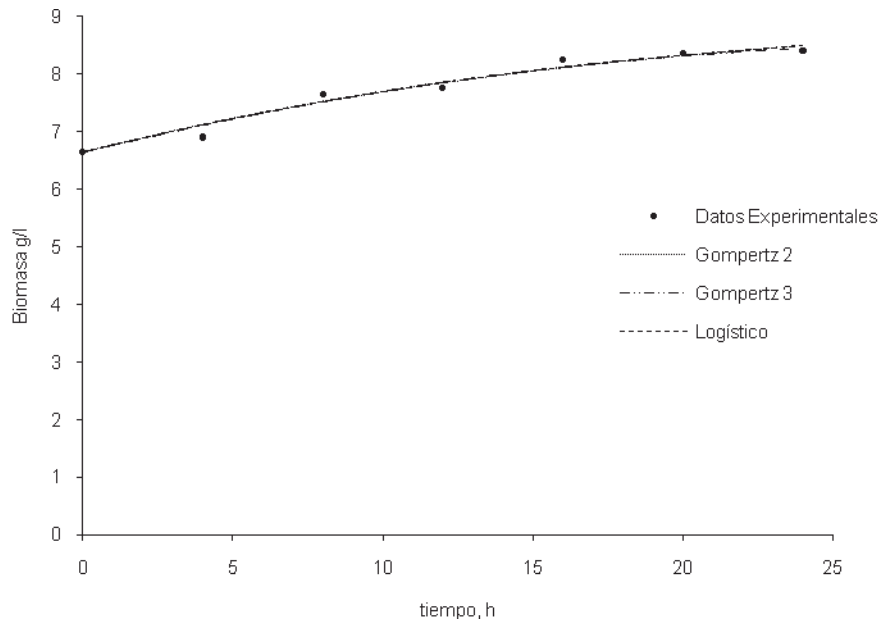
**Figura A7-4.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 4 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



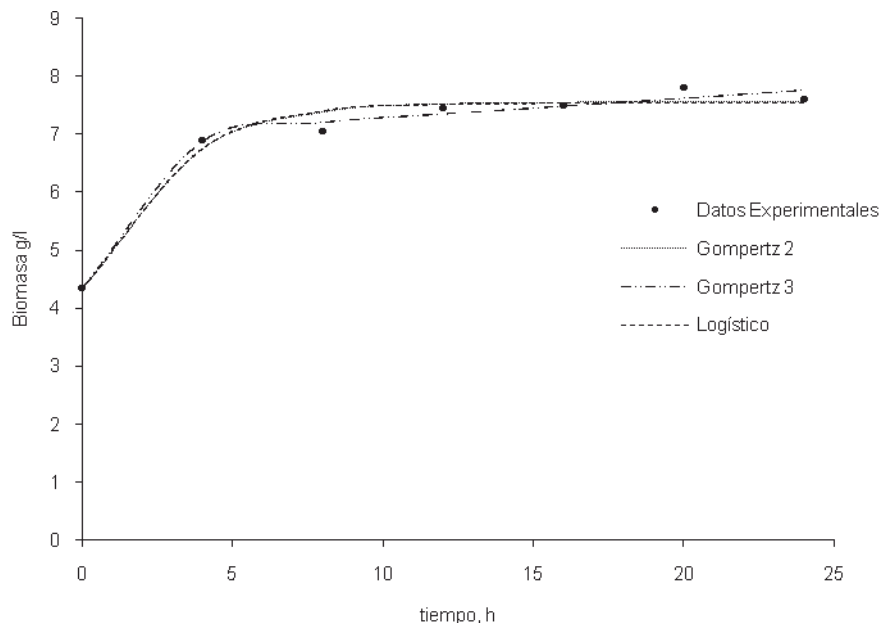
**Figura A7-5.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 5 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



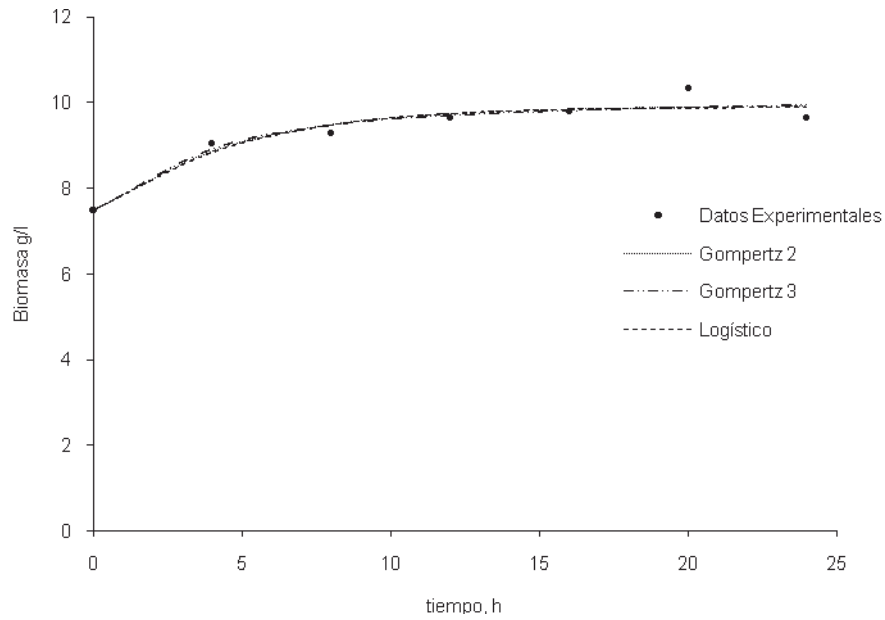
**Figura A7-6.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 6 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



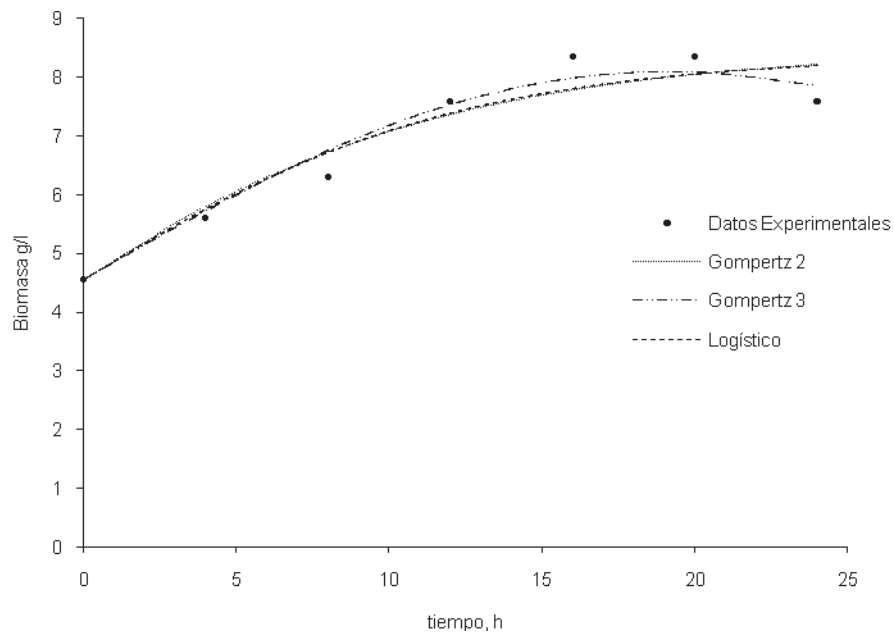
**Figura A7-7.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 7 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



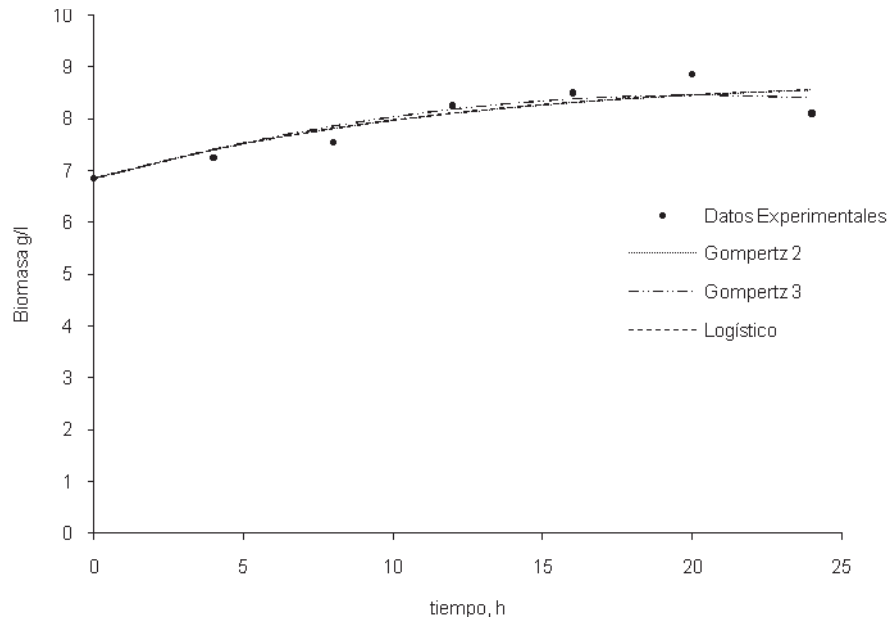
**Figura A7-8.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 8 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



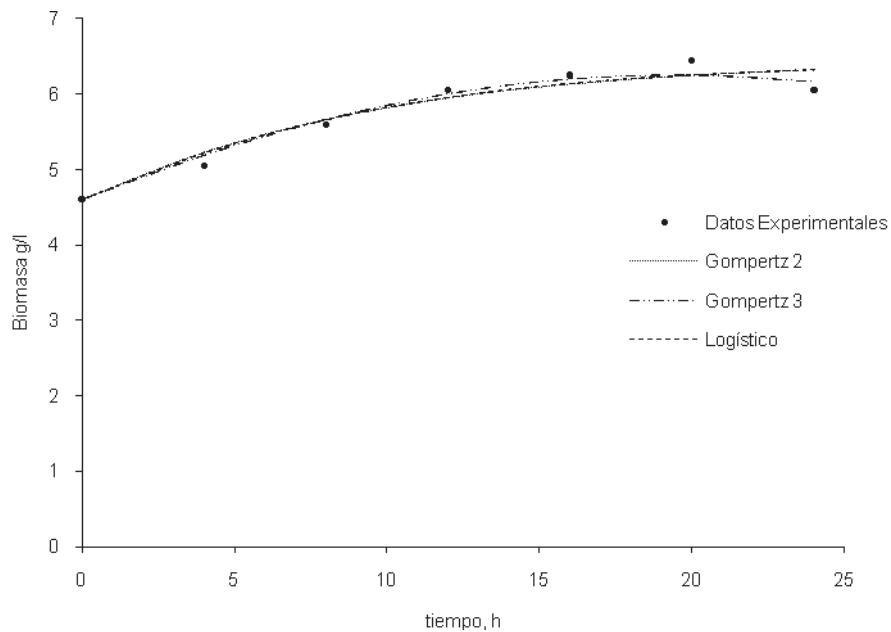
**Figura A7-9.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 9 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



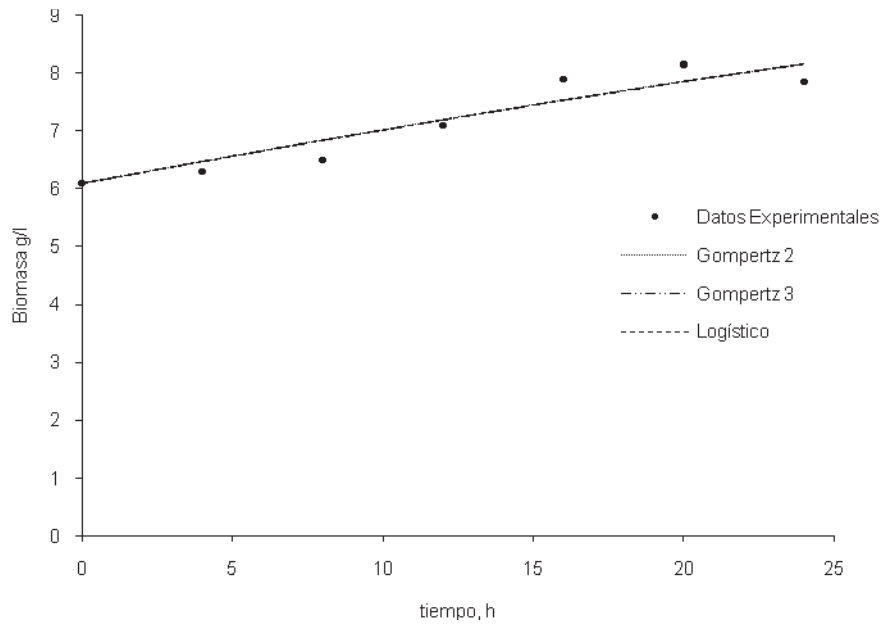
**Figura A7-10.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 10 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



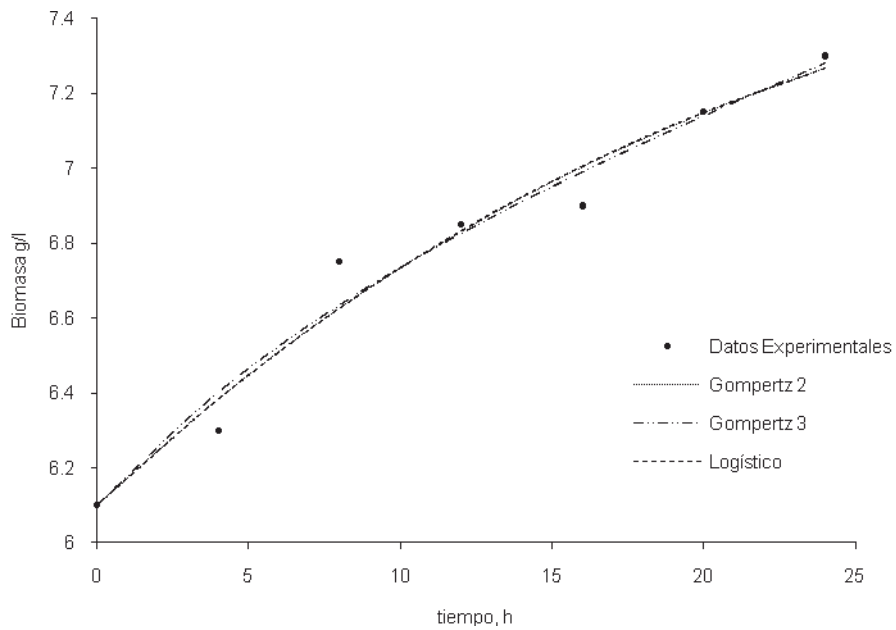
**Figura A7-11.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 11 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



**Figura A7-12.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 12 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.

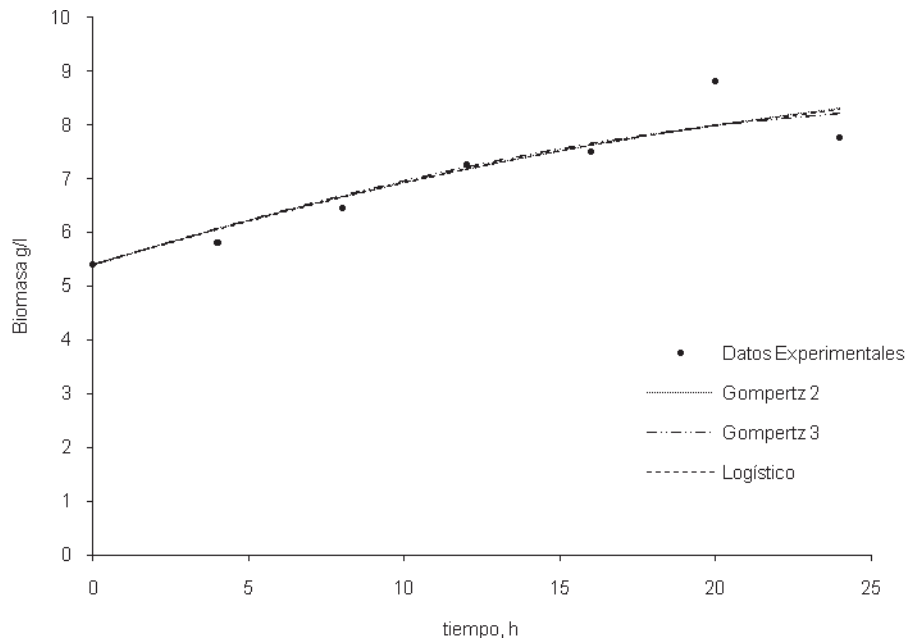


**Figura A7-13.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 13 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.



**Figura A7-14.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 14 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.





**Figura A7-15.** Ajuste de Datos Experimentales de biomasa para el Matraz 15 con los modelos de Gompertz de dos parámetros, Gompertz de tres parámetros y el modelo Logístico.