



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

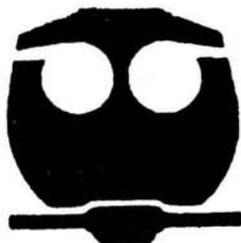
FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Saccharomyces*
cerevisiae EN AGUAMIEL BAJO PROCESO
CONTROLADOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

VILLALPANDO BLAS ALBERTO IVÁN



MÉXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MAYO DE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALL
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA

Jurado asignado:

Presidente RAUL AGUILAR CABALLERO

Vocal AURORA IRMA ORTEGON AVILA.

Secretario ABEL BLANCAS CABRERA

1er suplente RUTH EDITH MARTIN FUENTES

2do suplente ISMAEL BUSTOS JAIMES

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio 324 conjunto E, departamento de alimentos y planta piloto Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

Asesor del tema
Blancas Cabrera Abel



Supervisor técnico
Wacher Rodarte Ma. del Carmen

Ma. del Carmen Wacher

Sustentante
Villalpando Blas Alberto Iván



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Villalpando Blas

Alberto Iván

FECHA: 17/05/04

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

Con cariño, para las personas que siempre me brindaron su apoyo para seguir adelante.

*A mi director de tesis
Ing. Abel Blancas Cabrera
A usted que fue un pilar importante durante el desarrollo del trabajo y que con gran profesionalismo lo dirigió para poder alcanzar mi anhelo de ser un profesionista.*

*A la Dra. Carmen Wachter
Por ser parte fundamental de este trabajo, por sus consejos, por su apoyo.*

- ¡ los miembros del jurado*
- Raúl Aguilar Caballero
Presidente*
 - Aurora Irma Ortegón Ávila
Vocal*
 - Abel Blancas Cabrera
Secretario*
 - Ruth Edith Martín Fuentes
Primer Suplente*
 - Ismael Bustos Jaimes
Segundo Suplente*

A mis padres

*Por ser un ejemplo y por no dejarme
caer nunca a pesar de la adversidad.*

A mis hermanos

*Uriel por su apoyo incondicional y a
Erick por su fortaleza para seguir
adelante.*

A mis familiares

*Por que sus triunfos han sido para mí el
ejemplo a seguir en el camino de una
vida exitosa.*

A todos mis compañeros de la planta piloto Mónica, Teresa, Jesús, Sr. Luis, Toño, Rosalba, por siempre estar conmigo en las buenas, y en las malas y por el apoyo brindado a la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de la Facultad de Química: Fátima, Silvia, Carmen, Sonia, Genaro, Roberto, Isela, Norma Ethel,; por todo lo bueno que pasamos juntos.

INDICE.	Pág.
1. Resumen	1
2 . Introducción	3
3. Antecedentes	4
3.1 Aguamiel	4
3.1.1 Definición	4
3.2 Maguey	4
3.3 Estudios sobre aguamiel y composición química	7
3.4 Pulque	10
3.5 Estudios sobre pulque	13
3.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Clasificación	17
Composición	18
3.8 Requerimientos nutricionales de las levaduras	19
3.9 Fuente de carbono	20
3.10 Fuente de nitrógeno	20
3.12 Metabolismo de las levaduras	21
3.13 Metabolismo de compuestos de carbono	21
3.14 Metabolismo anaeróbico	22
3.16 Metabolismo aeróbico	25
3.20 Factores que influyen sobre el crecimiento de las levaduras.	30
3.20.1 Temperatura	30
3.20.2 pH	30
3.20.3 Oxígeno	30
3.20.5 Etanol	30
4. Objetivos	32
5. Materiales y métodos	33
5.1. Microorganismo empleado	33
5.2. Reactivación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
5.3. Sustrato	33
5.4. Preparación del inóculo	33

5.5. Influencia del pH en el crecimiento	34
5.6. Efecto de la concentración de azúcar sobre la producción de etanol	34
5.6.1. Adición de fuente de carbono	34
5.7. Producción de etanol por cultivo en lote	35
5.8. Fermentación por lotes de aguamiel ajustado a 10% de sólidos	35
5.9. Fermentación por lotes de aguamiel ajustado a 15% de sólidos	36
5.10. Producción de etanol por cultivo en lote alimentado	36
5.11. Análisis: pH, % sólidos totales, densidad óptica, determinación de etanol, acidez titulable, cuantificación de azúcares reductores y azúcares totales, peso seco, cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.	37
6. Resultados	43
7. Conclusiones	69
8. Apéndices	71
9. Bibliografía	74

1. RESUMEN.

Las bebidas alcohólicas son uno de los productos de mayor demanda en el mercado mundial, por lo que resulta de gran interés e importancia el desarrollar métodos de obtención de etanol que resulten ser económicos y con rendimientos que puedan ser favorables para el desarrollo de dichas bebidas.

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se obtiene mediante la fermentación de aguamiel. Se ha desarrollado un proceso para la obtención de una bebida alcohólica a partir de la fermentación de aguamiel pasteurizado e inoculado con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislado del pulque, las cuales participan en la producción de etanol para la elaboración de dicha bebida.

Debido a la variabilidad en la concentración de la fuente de carbono (sacarosa principalmente) en el aguamiel, la concentración de alcohol en la bebida fermentada es también variable y baja. Considerando esta problemática se pretende incrementar la concentración de etanol en la bebida durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* mediante la adición de varias fuentes de carbono (sacarosa, azúcar invertido, jarabe fructosado, fructosa, dextrosa, azúcar estándar y refinada) y con el uso de un sistema de cultivo alimentado.

Mediante el empleo de un cultivo en lote alimentado a las 22 h, se logro un aumento en la productividad así como en la concentración de etanol de 60 g/l a 96 g/l con respecto a la fermentación de aguamiel por cultivo en lote.

Con el presente trabajo se pretende generar una opción e interés en la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.

2. INTRODUCCION.

Las bebidas y alimentos fermentados son aquéllos cuyo procedimiento involucra el crecimiento de microorganismos, en el mundo existe una gran variedad de este tipo de bebidas como por ejemplo: la cerveza, el vino, los quesos, etc.; los cuales han sido extensamente estudiados.

Dentro de estas bebidas fermentadas se encuentra al pulque, el cual es una de las bebidas mexicanas fermentadas de mayor tradición y popularidad, pues no solo representaba una fuente económica importante, sino también forma parte de la dieta de muchas personas. El pulque es obtenido mediante la fermentación del aguamiel, secreción azucarada de varias especies de magueyes pulqueros.

Saccharomyces cerevisiae participa con la producción de etanol. Debido a que la concentración de etanol durante la fermentación es variable y baja, el principal objetivo de este trabajo es aumentar la concentración de etanol por medio de un cultivo en lote alimentado y/o aumentando la concentración de la fuente de carbono (sacarosa y/o azúcar invertido), utilizando como materia prima aguamiel.

3.- ANTECEDENTES.

3.1.- El aguamiel:

3.1.1. Definición

El aguamiel es un líquido que en condiciones óptimas es azucarado, translúcido, de color ambarino, de olor y sabor característico que se aprecian mediante prueba de catado. Este líquido es producido por los magueyes después de que han sido castrados y picados (Goncalves de Lima, 1978).

3.2.- Descripción de maguey y aguamiel.

3.2.1 El maguey.

Esta planta llamada "metl" entre los náhuatl-mixtecas, es típica de las zonas áridas y semiáridas de la altiplanicie mexicana (Río de la Loza, 1846).

Planta xerófila del género *Agave*, su nombre científico: *Agave atrovirens* y *Agave americana*, conocido comúnmente como maguey manso, que se clasifica dentro de la familia amarillidáceas y que posee cualidades muy peculiares, como son las de tolerar grandes sequías resistiendo hasta un año sin recibir nada de lluvias (Río de la Loza, 1846).

El maguey del que nos ocupamos crece en las zonas áridas, valles y faldas de los cerros que rodean el valle de Anáhuac; es decir, en los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla aunque en menor proporción crece en parte de Oaxaca, Morelos, San, Luis Potosí, Querétaro y Guanajuato.

El agave crece lentamente, y está constituido por una raíz fibrosa, un tallo grueso y corto (metltzontlitel); aparte de este tallo, salen las hojas, llamadas pencas que son gruesas y carnosas, provistas de púas en los

extremos y puntas, cubiertas por una cutícula cética que impide la evaporación del agua, almacenando así gran cantidad de ésta. Cuando un maguey alcanza su desarrollo vegetativo óptimo, momento en que se abren las puntas de las pencas centrales (maguey al hilo), se encuentra en condiciones de ser sometido a la práctica de "capado". Esto sucede aproximadamente entre los 6 y 9 años; y en algunos casos puede llegar a los 10 años.

Antes de realizar el capado, primero se le busca la cara al maguey, que es la parte más accesible de la planta para su explotación, y con un machete se cortan las pencas centrales para llegar al "meyolote"(meyolotli; metl, maguey y yolotli, corazón) o "corazón del maguey", el cual se debe arrancar desde la base para evitar que brote el estípote floral o "quiote" (sólo florece una vez en su vida), y llega a medir asta siete metros; de este brotan las semillas, las cuales en su gran mayoría son estériles. Si antes de que brote este "quiote" se corta (capado del maguey), de cada una de las pencas radiales fluye un líquido azucarado que se concentra en forma centrípeta hacia la zona o lugar donde brotará el "quiote". Si se hace una serie de cortes en la base de cada penca, de tal manera que se forme una quedad (picado del maguey), ésta se llenará de la savia o néctar dulce, llamado antiguamente "neutli" entre los mexicas, el cual se colecta una o dos veces al día.

La planta se defiende de este tratamiento y tiende a cicatrizar vasos y canalículos rotos en el corte inicial o "capado" y por ello hay que "raspar" diariamente después de la recolección del aguamiel, las paredes y el fondo de la cavidad con cucharas o uñas (iztetl) que manejan expertamente los tlachiqueros o recolectores de este mosto natural. La recolección se lleva a cabo con los "acocotes", que son calabazos largos y huecos, los cuales funcionan como pipetas rudimentarias.

Desde la remoción de la yema floral o "meyolote", hasta el tiempo en que se "raspa", se dejan transcurrir 3 ó 4 meses (añejado del maguey).

El maguey se ha considerado como un regalo divino, por los diversos usos a los que se ha sometido. Una mujer azteca ascendió a la categoría de diosa Mayáhual, por que supo agujerar los magueyes y extraer el aguamiel, según la historia de Sahún.

La palabra Mayáhuel designa a la diosa del maguey, y deriva, según Lehmann de me-yaualli (agave agujerado).

Sobre todo este procedimiento existen diversas leyenda o versiones, pero parece ser que el fundamento derivó de la observación de que ciertos roedores agujeran el "meyolote" diariamente, succionando el dulce jugo que brota (Goncalves de Lima, 1987).

El maguey no se reproduce por semillas, ya que como se dijo anteriormente, la mayoría son estériles; de cada 100 semillas que se siembran, sólo crecen de 3 a 4, lo que representa del 3-4% , y el resto que corresponde al 96-97% se pierde. Por lo tanto su propagación se lleva acabó por "hijos" (mecuates), que nacen alrededor de las plantas adultas.

El maguey es una planta hermafrodita. Cuando los mecuates brotan de la planta hembra, las pencas de ésta crecen hacia abajo, es decir, cubre a los "hijos" que nacen a su alrededor .

Los "mecuates" brotan de las raíces de la planta madre, constituyendo plantas nuevas, las cuales pueden separarse aproximadamente a los 5 meses. Estos "mecuates" se siembran posteriormente en hileras, resultando así nuevos magueyes.

Los magueyes juegan un papel muy importante en las regiones donde se encuentran, ya que no solo contribuyen en la producción de aguamiel sino también es un valioso agente contra la erosión, ya que sus raíces mantienen firme el suelo. Además siempre han representado una fuente muy importante de ingresos económicos para muchas familias por lo que sería una lastima el que se perdiera su cultivo.

3.2.2. El aguamiel

El aguamiel se obtiene mediante el raspado previo del "cajete" o cavidad central del maguey pulquero. No todo el aguamiel que se obtiene de los magueyes es igual; su composición varía de acuerdo a las características del maguey, a las propiedades del suelo donde se cultivan, el momento en que se "capa" y al tiempo después del "capado" cuando se empieza a extraer el aguamiel (Sánchez Marroquín, 1979).

Actualmente, cifras no oficiales estiman que se cuenta con entre 7 – 8,000,000 de magueyes plantados en las diferentes zonas magueyeras, de las cuales no se sabe con precisión cuantos están produciendo. Se estima que la producción total anual de aguamiel es de 2,200,000 litros diarios, y considerando una pérdida de aproximadamente 10% en la fermentación, se calcula que la producción total nacional de pulque es de 2,000,000 de litros diarios, los cuales son envasados en barriles de 250 litros de capacidad. Posteriormente estos son transportados a las diferentes pulquerías existentes, entre ellas las que se encuentran en la ciudad de México (Gayman, 1984).

Actualmente, el 99 % de la producción total nacional de aguamiel de agave, se emplea para elaborar pulque, mientras que el 1% se utiliza para la elaboración de miel.

3.3. Algunas investigaciones realizadas sobre el aguamiel

En 1858, Pontones y Chousal señalan que el glúcido predominante del aguamiel es la sacarosa.

El análisis publicado por Boussingault (1864-67) señala como ácido predominante el málico; aparentemente correspondiendo al ácido agáxico de los estudios de Lobato.

En 1884, Lobato demuestra que el aguamiel contiene 9% de azúcares, aunque ésta es una cifra muy variable, dependiendo principalmente de la edad de la planta y la humedad el suelo.

En 1892, Michaud y Tristan consideraron que el glúcido del aguamiel era la agavosa, identificado más tarde como sacarosa por Madinaveitia y Orozco.

En 1895, Stone y Lotz demostraron que se trataba de sacarosa; a la cual se refiere Cordero en 1917 al hablar del análisis de la planta, que además contiene azúcares reductores en pequeña proporción, sales minerales incluyendo fosfatos, proteína y ésteres propios del maguey y sobre todo, factores de crecimiento que hacen de este líquido un medio adecuado para el desarrollo de microorganismos.

En 1947, el Dr. Carlos Del Río Estrada, realizó un análisis acerca de la microbiología del aguamiel y del pulque, señalando que predominan dos tipos de microorganismos: los que se encuentran normalmente en el aguamiel y contribuyen a la fermentación del mismo y los que aparecen por contaminación. Enumeró los microorganismos que se encuentran normalmente en el aguamiel, los cuales corresponden a cerca de 30 especies incluidas dentro de los siguientes géneros:

- *Bacillus
- *Bacterium
- *Diplobacter
- *Hansenia
- *Lactobacillus (*L. patonni*)
- *Leuconostoc (*L. viscosum*, *L. mesenteroides*)
- *Mycoderma
- *Pichia (*P. barragani*)
- *Saccharomyces (*S. carbajali*)
- *Sarcina
- *Streptococcus
- *Termobacterium (*T. mobile*).

En 1951 Cravioto, Massieu, Guzmán y Calvo de la Torre, realizaron un análisis de la composición química del aguamiel de diferentes localidades, los resultados que obtuvieron se presentan en la tabla 1.

Más tarde, en 1956, Loyola Montemayor también estudia la composición química del aguamiel; los resultados de su estudio pueden observarse en la tabla 2.

TABLA 1
ANÁLISIS DEL AGUAMIEL DE DIFERENTES LOCALIDADES.
 (Contenido en 100g de aguamiel). Cravioto y Massieu (1951).

COMPONENTES	AGUAMIEL HIDALGO	AGUAMIEL EDO. DE MÉXICO.
Humedad	87.8	94.0
Cenizas (g).	-	0.4
Extracto etéreo(g).	-	-
Proteína (g).	-	0.30
Fibra cruda (g).	-	-
Extracto no nitrogenado (g).	-	5.30
Calcio (mg).	10.0	20.0
Fósforo (mg).	20.0	9.0
Hierro (mg).	0.40	-
Caroteno (mg).	0.00	-
Tiamina (mg).	0.10	0.02
Riboflavina (mg).	0.01	0.03
Niacina (mg).	0.50	0.40
Acido ascórbico (mg).	11.3	6.7

TABLA 2

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUAMIEL. Cravioto y Massieu (1951).

COMPONENTES	A	B	C	D
Densidad	1.049	1.043	1.049	1.049
Acidez %	0.068	0.069	0.069	0.068
Glucosa %	0.012	0.605	0.012	0.012
Sacarosa %	9.45	9.180	11.150	9.450
Gomas %	0.600	1.430	0.580	1.450
Proteínas %	0.806	0.456	0.810	0.456
Extracto %	18.990	12.180	18.950	18.990
Cenizas %	0.430	0.250	0.450	0.450

A, B, C y D son aguamieles de diferentes regiones.

A, B, C, y D representan aguamieles de diferentes regiones, como puede observarse la composición entre ellos es muy similar, además la fuente de carbono más importante es la sacarosa; pero la cantidad de azúcares reductores presentes (glucosa) es mínima.

Una vez que se lleva a cabo la fermentación del aguamiel, se da lugar a una de las bebidas fermentadas más importantes en la cultura mexicana el pulque.

3.4. El pulque.

El pulque es una bebida que sólo consume la clase popular y que no tiene acceso a cierto grupo de la población mexicana, por su aspecto y la mala fama de que ha sido objeto, derivada de los métodos poco higiénicos que se utilizan durante su elaboración. Además de las adulteraciones a que está expuesta dicha bebida durante su elaboración y venta. A continuación se hace una descripción detallada del pulque, el cual puede ser considerado como la bebida fermentada más importante de México.

El pulque del náhuatl "polihuqui", podrido, descompuesto (Robelo 1984), es una bebida alcohólica, blanca y viscosa que se obtiene por fermentación del aguamiel, que es la savia azucarada de varias especies de magueyes pulqueros del género agave. Los aztecas denominaban a esta bebida "metoctli", o vino de magueyes, o "iztacoctli", o vino blanco, y pronunciaban la palabra "polihuqui" al observar la frecuente descomposición de la bebida (Goncalves de Lima, 1978; Godoy, 1987). Es una bebida bastante antigua cuyo origen se remonta a varios años de la era Cristiana, y algunos historiadores consideran que fueron los antiguos otomíes los primeros en elaborarla (Martín del Campo, 1983; Guerrero Guerrero, 1985). Existen varias leyendas acerca del origen de esta bebida, como la leyenda mexicana que relaciona el descubrimiento del maguey y del pulque con una mujer de nombre Mayáhuel, posteriormente divinizada, que llegó a constituir un símbolo del maguey.

En el México antiguo, el pulque fue conocido desde la Huasteca hasta el norte de Yucatán, tuvo una influencia decisiva en la vida cotidiana, religiosa y bélica de varios pueblos indígenas de la Meseta Central. Para los aztecas fue una bebida-alimento divino, medicina y un intoxicante ritual relacionado con su cosmología. Sin embargo, con la caída del imperio azteca el pulque perdió su importancia dentro de los rituales religiosos y en la actualidad permanece sólo como una bebida popular, que algunos consideran la bebida nacional de México. Es consumida por diversos grupos étnicos, como los nahuas del Edo. de México, Tlaxcala, Morelos, Guerrero, Michoacán, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca y Puebla; los otomíes del D.F., Edo. de México, Morelos, Guerrero, Michoacán, Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Veracruz; los mazahuas del Edo. de México; los matlazincas pirindas de Morelos y Edo. de México y los mestizos de estas regiones del país.

El consumo de pulque se ha reducido notablemente en las últimas décadas, pues de 202 litros consumidos cada año por habitantes de la ciudad de México a finales del siglo pasado actualmente sólo se ingieren 26 (Gayman, 1984).

Los consumidores habituales de esta bebida son generalmente personas de escasos recursos económicos, para los que el pulque tiene una gran importancia nutricional, pues no sólo lo toman como una bebida alcohólica, si no que les sirve como un complemento alimenticio por su contenido de vitaminas del complejo B, de ácido ascórbico y de aminoácidos. Los adultos consumen de ¼ de litro a varios litros al día, cantidad que ingieren durante las comidas, el trabajo o los ratos de ocio (Roca y Llamas, 1940; Cravioto et al., 1951; Massieu et al., 1959; Ulloa et al., 1987).

Tradicionalmente se le han asignado al pulque algunas cualidades medicinales por lo que se ha utilizado desde épocas prehispánicas para combatir algunos trastornos gastrointestinales, anorexia, infecciones renales y astenia. Recientemente, Sánchez-Posada obtuvo, a partir del aguamiel fermentado con especies de lactobacilos y *Leuconostoc*, un producto ácido que denominó Naturacid AB, capaz de curar algunos padecimientos del aparato digestivo, como úlceras gastrointestinales, gastritis y esofagitis (Ulloa et al., 1987).

El proceso de elaboración del pulque, que en forma tradicional ha persistido hasta la época actual, presenta algunas variaciones según el grupo étnico involucrado en su preparación. Sin embargo, comúnmente se prepara según se indica a continuación: Primero se castra o capa el maguey, lo cual consiste en cortar el brote floral o qurote antes de que florezca. Después se deja añejar de 4 meses a un año con el fin de que se incremente el contenido de azúcar del aguamiel que se va acumulando en la cavidad que se hace en la cabeza del maguey (picazón). Los tejidos blandos de la cavidad se raspan periódicamente para abrir los vasos y aumentar así el flujo de aguamiel hacia dicha cavidad, el cual se extrae por succión utilizando el acocote fruto hueco y seco de calabazo. El aguamiel se transfiere a un recipiente hechos de diversos materiales, generalmente de piel de becerro o de madera (castañas), se vacía en las tinas de fermentación donde se añade el inóculo o semilla (pulque especial elaborado con aguamiel de la mejor calidad) y se deja fermentar de 8

a 30 días para obtener el pulque. De esta manera se obtiene el denominado pulque puro, de mejor calidad, aunque pueden realizarse adulteraciones, tanto de materia prima, como es diluir el aguamiel con agua y adicionarlo con azúcar, alcohol, diversos productos químicos (gomas de tragacanto o arábigo, almidones, fécula o genciana) o diversas plantas (nopalillo, raíz de pitaya y corteza y raíz de *Acacia spp.*), como en la forma de preparar la semilla, lo que se refleja en una merma en la calidad del producto, de aquí el denominado pulque sintético (Loyola-Montemayor, 1956; Sánchez Marroquín, 1979). Hoy en día, la mayoría del pulque que se produce es de este tipo, ya que es más barato elaborarlo, además, rara vez hay diferencia de precios entre el pulque puro y el sintético.

En 1977 Sánchez Marroquín desarrolló un proceso controlado para la elaboración de pulque en una planta de Santa María Tecajete, Hgo., dependiente del Patronato del Maguey y el Nopal. Se empleó en el proceso aguamiel pasteurizado, inoculado con cultivos mixtos de bacterias (*Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc sp* y *Lactobacillus sp.*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Se obtuvo así un producto uniforme con características parecidas al pulque tradicional, que se pasteurizó y enlató pero no fue aceptado por los consumidores habituales de la bebida.

Además del pulque natural, existen los llamados curados, que se elaboran en la forma descrita pero adicionando diversos vegetales principalmente frutas.

3.5. Estudios microbianos realizados sobre el pulque.

Los primeros estudios realizados en México sobre esta bebida fueron de carácter histórico, social, étnico y médico, y no fue sino hasta finales del siglo XIX que se iniciaron las investigaciones microbiológicas y químicas. En 1864, Río de la Loza realizó la primera observación del pulque al microscopio. Creyó ver cúmulos de sustancias albuminoides pero no microorganismos. En 1870, José Barragán describió las primeras levaduras aisladas del pulque, a las que

identificó como especies del género *Cryptococcus*. Este estudio fue notable, pues en aquella época estaban realizándose estudios similares en otros países con mayor tradición científica. En 1892, Fernando Altamirano señaló que el aspecto opalino del pulque se debía a la presencia de multitud de bacterias suspendidas en el mucílago. Este trabajo es importante ya que es el primero que reconoce las bacterias, microorganismos que después serían objeto de estudios más detallados.

En 1886, Angel Gaviño logró aislar una levadura rosa, probablemente una especie de *Rhodotorula*, y varias especies de bacterias, cocos, diplococos y bacilos. En 1901, este mismo autor presentó un estudio sobre microorganismos del pulque y describió a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En ese mismo año Antonio Carvajal aisló las bacterias *Mirococcus luteus* y *M. translucidus*, y la levadura *S. cerevisiae agavica silvestre*, a la que consideró el agente principal de la fermentación alcohólica del pulque. Posteriormente describió la bacteria *Bacterium aceti*.

Durante 15 años el estudio microbiano del pulque quedó en completo olvido y no fue sino hasta 1916 cuando el profesor Miguel Cordero se ocupó de nuevo de este tema. A partir del aguamiel aisló varias levaduras, que fueron identificadas por el investigador francés Guilliermond en los géneros *Pichia* y *Saccaromyces*, sin indicar especies.

Siete años más tarde, Paul Lindner, del Instituto de Fermentaciones de Berlín, realizó en México un estudio sobre los problemas relativos a la fabricación científica del pulque. Como resultado de dichos estudios, en 1926 se publicaron los trabajos: Importancia práctica y científica del estudio del pulque y mejoras para el empleo del aguamiel; además se identificaron las bacterias *Bacterium iridescens* y *vermiforme*. De 1928 a 1932, el mismo investigador, realizó importantes estudios bacterianos y describió las especies *Diplobacter viscosus*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus major*, *P. minor*, *S. corrorus*, *Sarcina corrosa* y *Termobacterium mobile*. En 1931, Fernández de Tagle presentó el estudio de las vitaminas y de la fermentación viscosa en el

pulque y señaló a *Leuconostos mesenteroides* como el microorganismo responsable de la fermentación viscosa.

De 1936 a 1942 Ruiz Oronoz estudió las levaduras del pulque y describió las especies *S. carbajali*, *Pichia barragani*, *Torulopsis hydromelitis*, *T. aguamellis* y *Rhodotorula incarnata* como nuevas (Ruiz Oronoz, 1953). A partir de 1942 el grupo de trabajo de Alfredo Sánchez Marroquín realizó estudios sobre la microbiología del pulque y la actividad metabólica de las diversas especies de microorganismos. Dicho grupo reconoció las especies *L. dextranicum* y *L. mesenteroides* como parte de la microbiota normal del pulque,.

En 1948 Pedro Brechtel presentó un estudio bacteriológico del aguamiel y del pulque, describió las especies *Micrococcus candidus*, *M. ruizii*, *Sarcina flava*.

Continuando con sus estudios sobre la microbiología del pulque, en 1962 Sánchez Marroquín presentó un análisis de los estudios realizados durante muchos años en ese tema. Este trabajo incluyó estudios sobre el metabolismo de cinco nuevas especies de levaduras, registradas por Luis Oronoz, tres de las cuales consideró sinónimos de otras especies: *S. carbajali*= *S. cerevisiae*, *Pichia barragani* = *Pichia mambranaefaciens* y *Torulopsis hydromelitis* = *Candida parapsilosis*. En 1977 este mismo autor señaló que los microorganismos esenciales en el proceso de la fermentación del pulque eran diversas especies de *Leuconostoc*, principalmente *L. dextranicum* y *L. mesenteroides*. Lactobacilos homolácticos y heterolácticos, *Zymomonas mobilis* y *S. cerevisiae*. A las especies de *Leuconostoc*, las consideró responsables de la viscosidad de la bebida, debido a la producción de dextranas. A los lactobacilos homofermentativos y heterofermentativos les adjudicó la mayor producción de ácido láctico y acético, y a *Zymomonas mobilis* y *S. cerevisiae* los consideró como los organismos productores de alcohol.

En 1989, y con el objeto de contribuir al conocimiento más detallado de las levaduras del pulque y determinar las especies más constantes en el producto fermentado, Lappe y colaboradores estudiaron 21 aislamientos de levaduras obtenidas del pulque de diversas localidades. Determinaron como especies constantes a *S. cerevisiae* y *P. membranaefaciens* y a *Kluyveromyces marxianus*.

Aunque a la fecha se conoce una variada microbiota del pulque y se han determinado algunos microorganismos esenciales para la elaboración de la bebida, se desconoce si existe una sucesión en la microbiota a lo largo del proceso de elaboración y fermentación. Por lo que resultaría muy importante el desarrollar una investigación para conocer de que manera se modifican las poblaciones microbianas desde la materia prima hasta el producto final, para poder así determinar cuales son las que predominan en las diversas fases de elaboración de la bebida.

Además, el conocimiento de las características de los microorganismos de la bebida puede determinar su posible aplicación de diferentes procesos para la obtención de diversos productos de relevancia económica y médica (aminoácidos, dextranas, ácidos orgánicos, alcohol, proteínas). Un ejemplo de lo anterior lo constituyen los trabajos de Lemoine y Mendoza (1976), Cruz y Ochoa (1978) y Enrique Freire et al. (1985), sobre la utilización de levaduras aisladas del pulque para obtener proteína unicelular a partir de la industria azucarera, misma que puede ser incorporada a nuevos alimentos para animales (Lappe et al., 1989).

3.6. *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son, sin duda, cuantitativa y económicamente los más importantes grupos de microorganismos comercialmente explotado por la humanidad. *Saccharomyces cerevisiae* es una especie de muy amplia distribución, que no sólo ha sido registrada para el pulque, si no además de otras bebidas fermentadas indígenas de México, como tuba, tesgüino,

colonche, pozol y tepache, así como los tibicos, con los que frecuentemente se prepara el tepache y el vinagre de tibicos (Ulloa et al., 1987). A nivel mundial ha sido aislada de muchas otras fuentes como vinos, cervezas de cebada, diversos mostos, sidras, quesos, exudado de encino, jugos de frutas, mieles, diversos frutos y hojas, insectos y otras salmueras, refrescos gaseosos, piel humana sana y ulcerada y otros muchos sustratos, incluyendo alimentos y bebidas fermentados indígenas de África y Asia, como cerveza kaffir o Bantú.

Las levaduras son organismos unicelulares, eucariontes, que se reproducen vegetativamente por gemación y sexualmente por ascosporas. La célula individual de *Saccharomyces cerevisiae* es clara, sin color, normalmente de forma esférica u ovoide, pero pueden ser elipsoidales, notoriamente alargadas o también cilíndricas dependiendo de las condiciones en que fueron desarrolladas. Su tamaño se estima de entre 8-10 micrones; pudiendo presentarse solas, en racimos o en masas. Cuando son teñidas con yodo tienen un color amarillo-café, en cambio, al teñirse con cristal violeta y safranina, su coloración va de violeta hasta rojo.

Saccharomyces cerevisiae tiene la siguiente clasificación:

- División: Ascomycota
- Clase: Ascomycetes
- Subclase: Hemiascomycetidae
- Orden: Endomycetales
- Familia: Saccharomycetaceae
- Subfamilia: Saccharomycoideae
- Género: Saccharomyces

Dependiendo de las condiciones en que haya sido cultivada *Saccharomyces cerevisiae*, puede alcanzar de 42 a 69 % de proteína cruda altamente digestible. Posee una buena cantidad de aminoácidos (lisina, fenilalanina, treonina, valina, ácido glutámico, leucina, isoleucina, arginina,

histidina, tirosina y cistina, a excepción de metionina y trptofano); entre otros compuestos contiene carbohidratos, grasas y vitaminas del complejo B; cuenta además con nucleína, lecitina, 5-fosfato de guanosina y diastasas principalmente. Finalmente entre algunos de los elementos que contiene en altas proporciones están el potasio y el fósforo; aunque también contienen en menor concentración magnesio, fierro, cobre, zinc y cobalto. En la tabla 3 se muestran algunos datos de la composición de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 3 Composición de *Saccharomyces cerevisiae* (Ulloa et al., 1987).

VITAMINA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mg/g
Tiamina	136.0
Riboflavina	28.0
Ácido nicotínico	525.0
Piridoxina	40.0
Ácido pantoténico	695
Ácido fólico	3.5
Biotina	1.0
Ácido p-aminobenzoico	5.0
Colina	3800.0
Inositol	3900.0

3.7. Para definir la estructura de una célula de levadura y para determinar su función y organización, actualmente se han expandido un gran número de técnicas entre las que se encuentran: microscopía electrónica, microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia, cromatografía, lisis de paredes celulares, entre otras.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las aplicaciones de estas técnicas, se ha determinado que, la capacidad biológica de una célula de levadura, reside en un singular cuerpo vegetativo en donde, una pared celular o anillo semirrígido encierra el contenido protoplásmico que a su vez, se encuentra

protegido por una membrana plasmática. Existe además, un fluido, la matriz citoplásmica, en donde se encuentra incluidos un núcleo, mitocondrias, vacuolas cuerpos refráctiles, gránulos de polifosfatos, gránulos de lípidos, ribosomas, otras estructuras menores y biopartículas.

3.8. Requerimientos nutricionales de las levaduras. Las levaduras, como otros muchos seres vivos, son consideradas como organismos heterótrofos; este tipo de organismos no pueden utilizar directamente el CO₂ atmosférico para sus funciones metabólicas y por lo tanto, requieren de una fuente de carbono reducida como la glucosa. A las levaduras también se les considera organismos quimiótrofos, es decir, son organismos capaces de obtener su energía solamente a través de reacciones de oxidación-reducción.

La unión de estas dos características las hace llamarse organismos quimiorganótrofos que son los que requieren una fuente de carbono orgánico y una fuente de energía producida por reacciones de óxido-reducción.

De acuerdo a las características nutricionales de las levaduras, para lograr su óptimo desarrollo, es necesario, cuando se les cultiva bajo condiciones de laboratorio, suplirle los compuestos químicos básicos para su desarrollo. Los requerimientos usuales para el desarrollo de las levaduras incluyen: 1.- Compuestos de carbono orgánico; 2.- Compuestos de nitrógeno orgánico o inorgánicos o ambos; 3.- Compuestos minerales y elementos trazas y 4.- Compuestos vitamínicos.

Estos compuestos pueden ser suplementados a través de la utilización de dos tipos de medios de cultivo: los complejos y los sintéticos.

Medios de cultivo complejos: Para las levaduras, son dos los medios de cultivo complejos más utilizados:

A.- Extracto de malta: conocido también como mosto de cerveza; se elabora a base de malta diastásica, por conversión enzimática del almidón y las proteínas a azúcares fermentables y péptidos y aminoácidos respectivamente.

B.- Extracto de levadura: Este medio complejo es un autolisado de estos organismos que se obtiene por calentamiento a 55°C durante 3 días, este medio no contiene fuente de carbono fermentable y por lo tanto, es necesario agregarla.

Medios de cultivo sintéticos: Son los más utilizados debido a su relativa facilidad de preparación. Para la preparación de estos medios se adicionan los componentes básicos: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales minerales, aminoácidos y vitaminas.

La concentración utilizada , para cada componente, puede variar según la especie que se utilice dependiendo de sus propias necesidades de desarrollo.

3.9. Fuentes de carbono. La fuente de carbono que se emplea comúnmente es la glucosa; sin embargo, existen otros compuestos de carbono que pueden ser utilizados, entre los que se encuentran: a.- otras hexosas diferentes de la glucosa; b.- di, tri y polisacáridos; c.- pentosas; d.- alcoholes alifáticos; e.- alcoholes de azúcares; f.- ácidos orgánicos y g.- compuestos aromáticos.

3.10. Fuentes de nitrógeno: La fuente de nitrógeno más utilizada por las levaduras es el sulfato de amonio, en pruebas de asimilación, pueden utilizarse otros compuestos nitrogenados tales como: a.- aminoácidos simples; b.- purinas y pirimidinas; c.- aminas; d.- urea y e.- nitratos y nitritos.

3.11. Requerimientos nutricionales especiales: Algunas especies de levaduras, además de los elementos nutricionales mencionados, necesitan de compuestos químicos especiales para su desarrollo, como éstos no son comunes en todas

las especies, se refieren para cada especie en particular. Algunos ejemplos de estos requerimientos no usuales son: S. cerevisiae presenta mutantes que requieren de adenina; S. pombe presenta mutantes naturales para adenina; S. cerevisiae en condiciones anaeróbicas requiere de ergosterol y ácido oleico; S. rouxii y S. bisporus requieren de altas concentraciones de azúcares.

3.12. Características metabólicas de las levaduras. Metabólicamente, las levaduras son organismos predominantemente anaerobios facultativos, es decir, son organismos capaces de desarrollar tanto en ausencia (fermentación) como en presencia (respiración) de oxígeno. El metabolismo de las levaduras al igual que para todos los seres vivos, consiste de dos tipos de mecanismos: 1.- generadores de energía o degradativos (catabolismo) y 2.- consumidores de energía o rutas biosintéticas (anabolismo). El desarrollo es el resultado del equilibrio entre los dos tipos de mecanismos, ya que parte de la energía obtenida por el catabolismo, se utiliza en la biosíntesis de los componentes celulares.

3.13. Metabolismo de compuestos de carbono: Las levaduras pueden metabolizar muchos mono y oligosacáridos, ya sea que sean suplementados en el medio de cultivo o que se encuentren como reservas en el interior de las células (glucógeno y tetralosa).

Los azúcares que se utilizan comúnmente son: glucosa, manosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa, melobiosa, tetralosa y rafinosa.

Algunos de estos azúcares pueden ser utilizados directamente, pasando intactos al interior de la célula, otros, tienen que ser hidrolizados en el exterior para después entrar a la célula y ser utilizados una vez que se encuentra dentro de la célula, ésta los utilizará ya sea por la vía de la respiración o fermentación o ambas cosas. Cualquiera que sea la forma en que estos azúcares sean absorbidos, al final darán lugar, por transformaciones enzimáticas, a intermediarios que entrarán a las vías degradativas centrales para la obtención de energía necesaria para la célula; la glucosa es la molécula

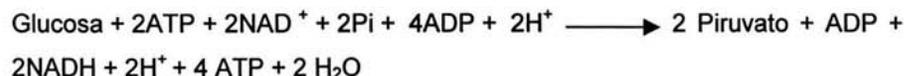
principal de las vías metabólicas centrales de las levaduras y ésta puede ser utilizada a través de dos mecanismos o vías principales, que dependen de las condiciones de aereación en las que las levaduras estén desarrollándose.

De esta forma, la glucosa puede ser utilizada anaeróbicamente cuando la concentración de oxígeno en el medio sea de 0 a 50 mmol O₂/ l-h o bien, aeróbicamente, cuando la concentración de oxígeno sea superior a 50 mmol O₂/ l-h.

3.14. Metabolismo anaeróbico: Conocido comúnmente como fermentación, el metabolismo anaeróbico es uno de los mecanismos mediante los cuales las levaduras obtienen su energía a través de la degradación del componente energético.

La fermentación se inicia con la entrada de la glucosa a la célula, bajo el control de enzimas y coenzimas libres, dispuestas en la matriz citoplásmica; una vez dentro, la hexosa, inicia la vía central de degradación anaeróbica conocida como "Ruta de Embder-Meyerhof".

La reacción global de este proceso se representa como sigue:



A través de esta serie de reacciones, la ganancia neta de energía es de 2 moléculas de ATP/ molécula de glucosa y además se obtienen 2 moléculas de NADH que serán utilizadas posteriormente.

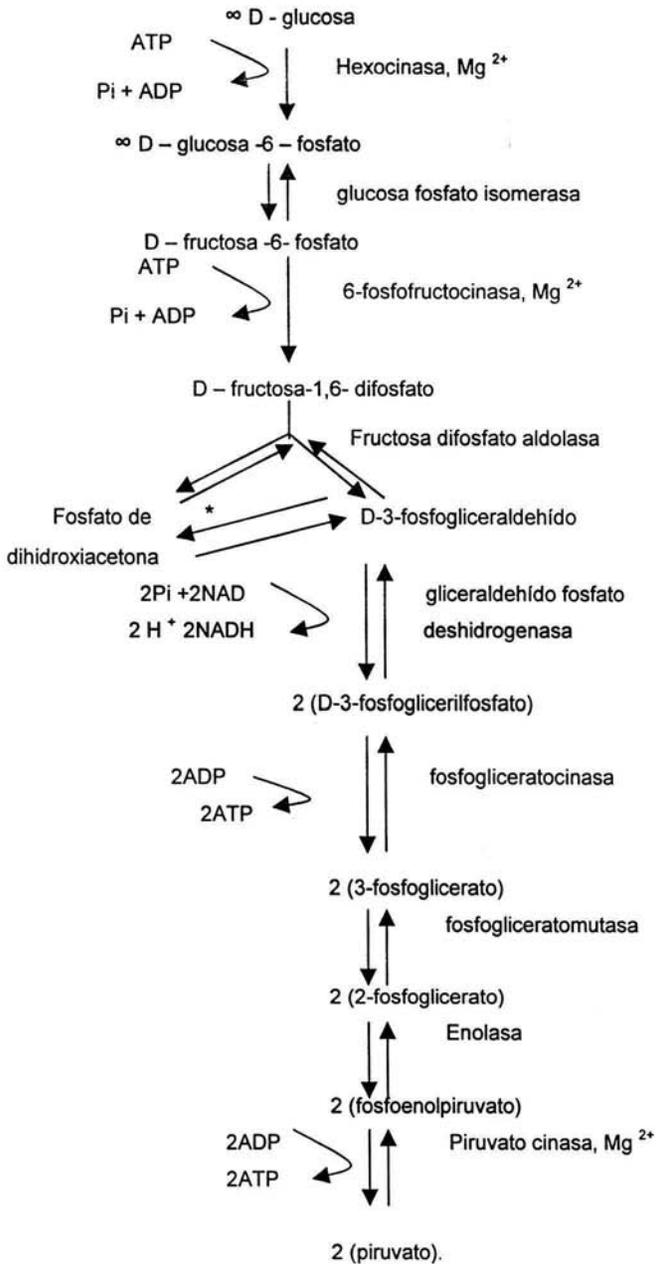


Fig. 1. Diagrama de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof. *La reacción se lleva a cabo mediante la enzima triosa fosfato isomerasa.

El punto de control más importante de esta vía es la reacción catalizada por la enzima alostérica fosfofructocinasa que interviene en la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, en presencia de iones magnesio y ATP. La reacción es inhibida por citrato, altas concentraciones de ATP y por ácidos grasos de cadena larga y por lo tanto, es la reacción limitante de la velocidad de la glucólisis.

Otro punto de control del proceso es la reacción catalizada por la enzima hexocinasa que es inhibida por la retroalimentación.

Para las levaduras fermentadoras, el producto final de la vía de Embden-Meyerhof, el ácido pirúvico sufre dos conversiones más: la primera de ellas es la descarboxilación del piruvato para obtener acetaldehído y CO₂ y la segunda, que es la etapa final de la fermentación, involucra la reducción del acetaldehído a etanol en presencia de NADH (obtenido de la vía anterior).

La ecuación general que representa a la fermentación alcohólica es:

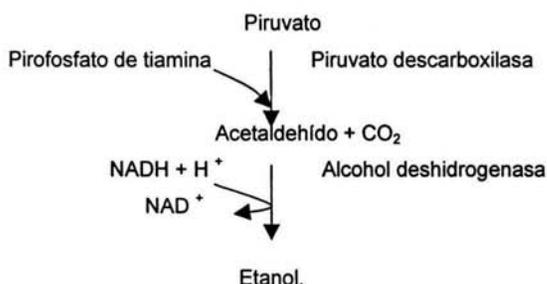


Fig. 2. Conversión del piruvato a etanol en la fermentación alcohólica.

3.15. Incorporación de otros compuestos a la vía de Embden-Meyerhof.- Cuando al medio de cultivo de las levaduras se agregan otras fuentes de carbono, diferentes de la glucosa o bien, cuando éstas se ven precisadas a utilizar sus reservas energéticas, existen mecanismos mediante los cuales pueden convertir un compuesto dado a moléculas de glucosa o a

intermediarios que podrán entrar a la vía glucolítica normal. Algunas de estas vías se esquematizan en la figura 3.

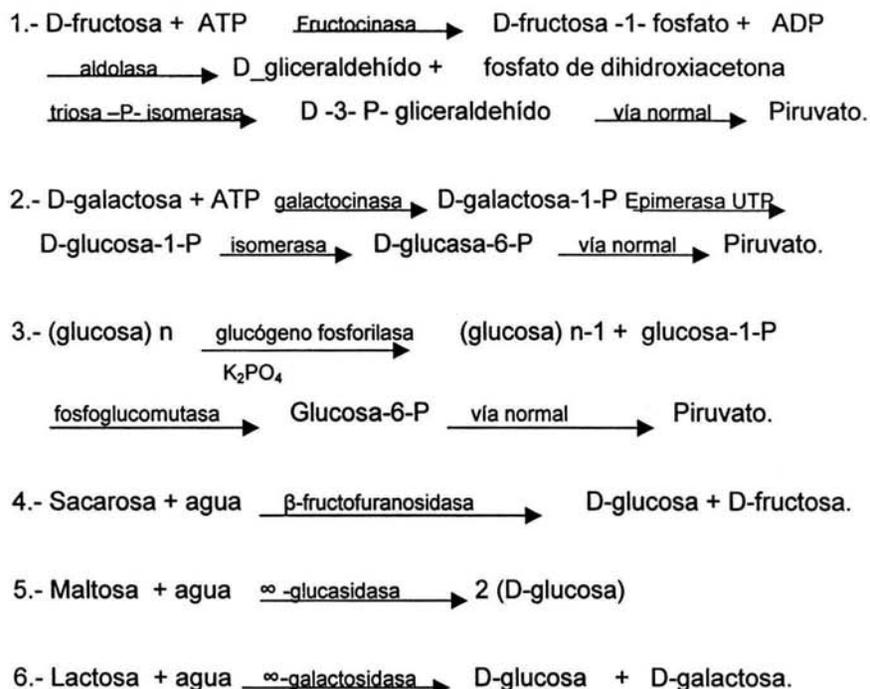
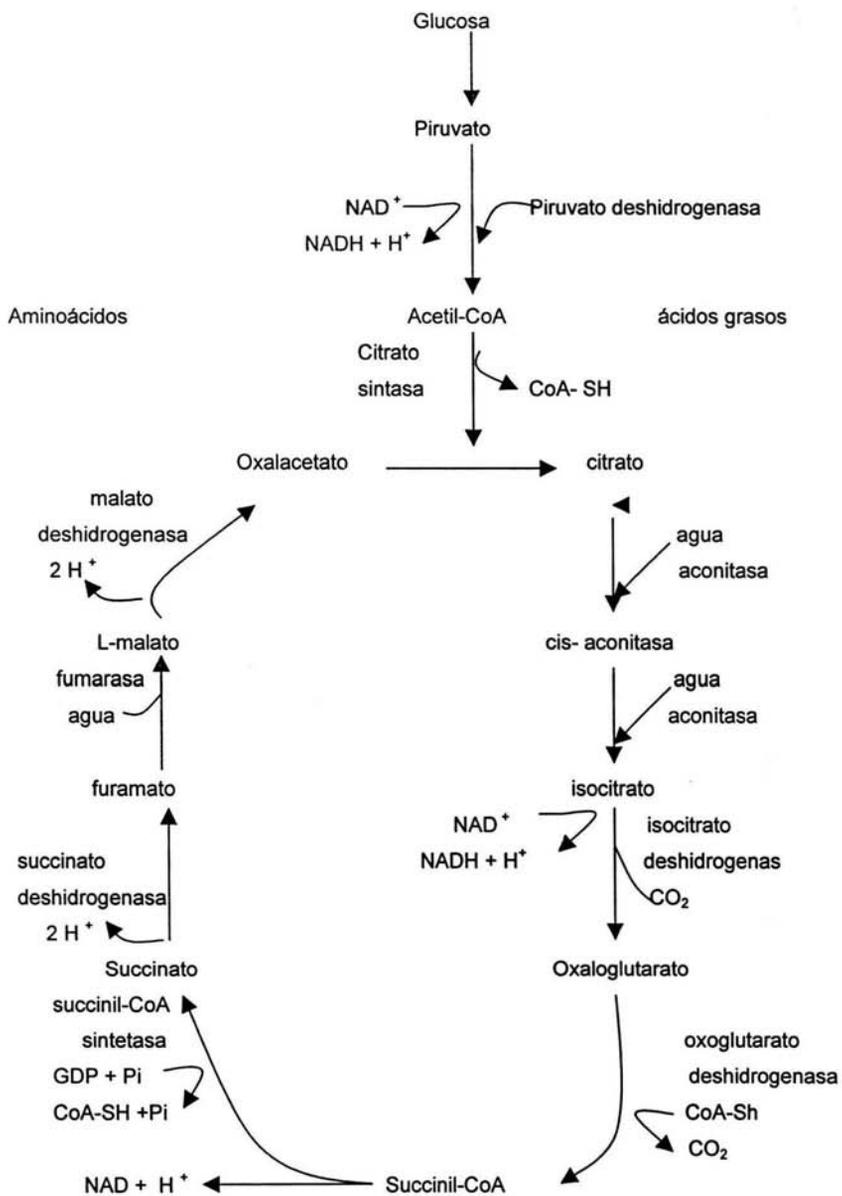


Fig. 3. Reacciones de incorporación de compuestos de carbono, diferentes de la glucosa, a la vía de Embder-Meyerhof.

3.16. Metabolismo aeróbico.- Para la mayoría de las levaduras, el metabolismo aeróbico o respiración, es el mecanismo predominante de rendimiento energético de la célula. En la serie de reacciones que ocurren se observan múltiples estados en la mitocondria, organelo de la célula responsable de la respiración de las levaduras. La principal vía si no es que la única, por la que la glucosa es utilizada aeróbicamente, es el llamado "Ciclo de los ácidos tricarbóxicos", descrito por Krebs.



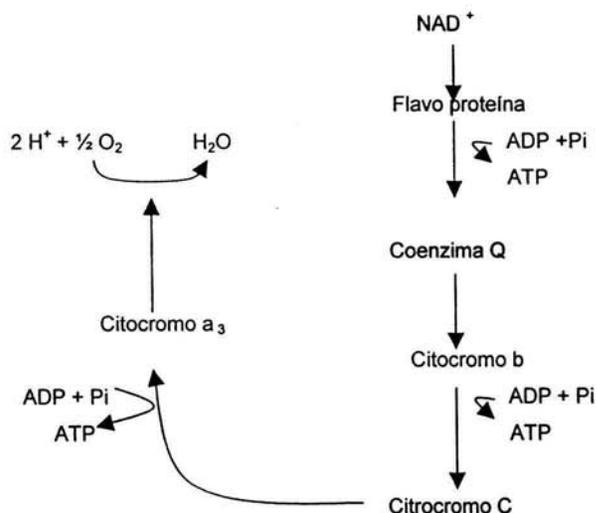


Fig. 4. Ciclo de Krebs, transporte de electrones y fosforilación oxidativa.

La serie de reacciones enzimáticas implicadas en este proceso, se inicia con la activación del piruvato (producto de la glucólisis) por pirofosfato de tiamina y la transformación a acetilcoenzima A; ésta última, actúa como acarreador de unidades acetilo al ciclo de Krebs. La figura esquematiza la serie de reacciones que ocurren a través del ciclo; las unidades de acetilo, no solamente se obtienen a partir de la glucosa sino que pueden haber otras fuentes de este compuesto.

El ciclo de Krebs se completa con 4 deshidrogenaciones y 2 descarboxilaciones y al final, la molécula aceptora, el oxalacetato, es regenerada. Los 4 pares de hidrógeno aceptado en el proceso entran al sistema de transporte electrónico y a la fosforilación oxidativa en la que se producen un total de 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa y además, el aceptor de electrones, el oxígeno, forma 4 moléculas de agua. La reacción global de la respiración es la siguiente:



3.17. Desviaciones del ciclo de Krebs. Para oxidar compuestos de dos átomos de carbono (acetato, etanol), algunas etapas del ciclo de los ácidos

tricarboxílicos son desviadas a través de una serie de reacciones llamadas "ciclo del ácido glioxílico". El objetivo principal de este ciclo, es permitir la utilización de los ácidos grasos o del acetato, en forma de acetil-CoA, como única fuente carbonada, para la biosíntesis de los carbohidratos o bien, para la obtención de energía a través de la conversión de los residuos acetilo a oxalacetato que puede ser utilizado en la ruta normal del ciclo de Krebs.

El ciclo elude, mediante un rodeo, las etapas de desprendimiento de CO₂ del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con la finalidad de aprovechar todos los átomos de carbono disponibles, en la producción de energía y de precursores metabólicos que serán utilizados principalmente, en la biosíntesis de componentes celulares. En cada ciclo se usan dos moléculas de acetil-CoA y se produce una de succinato, precursores de la biosíntesis de aminoácidos y de la glucosa. La reacción del ciclo es:



3.18.Comparación del metabolismo anaeróbico y aeróbico.- El metabolismo de los compuestos de carbono, tiene como objetivo principal, la producción de la energía necesaria para que las células lleven a cabo sus funciones metabólicas; de esta forma, podemos comparar el rendimiento energético tanto del proceso anaerobio como del aerobio. En la fermentación alcohólica, es decir, en el metabolismo anaeróbico, la energía producida es de 196.65 Kj/mol y en la respiración, metabolismo aeróbico, la energía liberada es de 2870.29 Kj/mol. De acuerdo a estos datos, se observa que el proceso aeróbico tiene un rendimiento energético mucho más alto que el anaeróbico y así, las células utilizan el primero con la finalidad de obtener un mayor rendimiento energético que con el último no lo lograrían.

Según datos obtenidos en algunos estudios, se establece que, bajo condiciones aeróbicas, la ruta predominante es la descarboxilación del piruvato, pero esta reacción está encaminada directamente al ciclo de los

ácidos tricarboxílicos; además, se observa que en estas condiciones, la derivación del monofosfato de hexosa es utilizada en mayor proporción y esto comprueba que esta vía es favorecida por las condiciones aeróbicas, por lo que el rendimiento de biomasa es más alto.

Bajo condiciones anaerobias la vía de Embder-Meyerhof, es la preponderante y su utilización va aumentando conforme la concentración de oxígeno disminuye; la ruta aeróbica, el ciclo de Krebs, prácticamente no es utilizada en estas condiciones y la derivación permanece constante, lo que comprueba que esta vía no está relacionada directamente con el rendimiento energético.

3.19. Metabolismo de compuestos de Nitrógeno.- Las levaduras, como otros seres vivos, no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico para sus funciones metabólicas; sin embargo pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados, inorgánicos y orgánicos. La mayoría pueden utilizar el amonio como fuente de nitrógeno y solo ciertas especies pueden utilizar otros compuestos como la urea, los aminoácidos, las bases púricas y pirimídicas, los nitratos y los nitritos.

Las sales de amonio, como sulfatos o fosfatos, son los compuestos nitrogenados que utilizan todas las levaduras como fuente de nitrógeno: Cuando estas sales son transportadas al interior de la célula, su principal función es la biosíntesis de los aminoácidos no esenciales para las levaduras, es decir, aquellos aminoácidos que la célula puede sintetizar y que no han sido agregados al medio de cultivo.

Algunas especies de levaduras requieren de la adición de bases púricas y pirimídicas en su medio de desarrollo por que carecen de los mecanismos enzimáticos adecuados para su biosíntesis.

3.20. Factores que influyen en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Algunos factores que influyen directamente en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* son la temperatura, concentración de azúcar, pH y la tolerancia al etanol.

3.20.1. La temperatura es uno de los parámetros físicos más importantes en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. En muchos laboratorios y en la industria, se desarrolla el crecimiento celular generalmente a una temperatura de entre 20-30 °C, además se considera que su temperatura máxima de crecimiento esta entre 35-43 °C.

3.20.2. El pH es otro parámetro físico importante en el crecimiento de la levadura, para *Saccharomyces cerevisiae* se considera que el valor óptimo para su desarrollo oscila entre 4.5 y 6.5. aunque este puede extenderse en ocasiones hacia 3 y 8.

3.20.3. El oxígeno representa otro parámetro muy importante en el desarrollo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es esencial para conferir mayor resistencia de la membrana ayudando a la biosíntesis de ácidos grasos y de los esteroides.

3.20.4. La concentración de azúcar también tiene un efecto muy importante para el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* ya que de acuerdo a la concentración que esté presente en el medio puede ejercer una presión osmótica tal que inhiba el crecimiento celular.

3.20.5. El etanol es el mayor producto metabólico de la fermentación por levaduras y es cuantitativamente el primer producto ATP o de biotecnología a escala global. Pero también el etanol puede resultar un factor de inhibición para el desarrollo celular, por ejemplo, Novojo y Ouchi (1962) determinaron la

tolerancia para cepas de levadura en un rango de entre 20-30 % (w/v) indicando que hay diferencias en cuanto a la tolerancia entre las distintas levaduras. Pero para el caso específico de *Saccharomyces cerevisiae* se ha determinado que una concentración de etanol de 13% (w/v) puede ejercer un efecto inhibitorio.

En reciente años un gran número de investigadores han realizado estudios sobre el efecto del etanol en el proceso de transporte a través de la membrana; además de la relación entre la composición lipídica y la función de la membrana plasmática de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, Rose 1980, 1982) ha reportado que, células con una membrana rica en residuos de linoleico (C_{18:2}) son más resistentes a los efectos letales del etanol que las células ricas en oleico (C_{18:1}).

4. OBJETIVOS.

- Obtener la máxima concentración y productividad de etanol a partir de la fermentación de aguamiel por *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Conocer Las mejores condiciones para la obtención de un inóculo con la máxima concentración de biomasa.
- Obtener la mayor productividad de etanol, ya sea utilizando un cultivo en lote o un cultivo en lote alimentado.
- Determinar las condiciones de oxigenación en el fermentador para obtener la mayor productividad de etanol.
- Seleccionar una fuente de carbono que al ser utilizada en un cultivo alimentado incremente la producción de etanol en la fermentación de aguamiel por *Saccharomyces cerevisiae*.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1.- Microorganismo empleado

Saccharomyces cerevisiae

Se utilizó una cepa previamente aislada de pulque por Patricia Lappe y García Garibay, conservada en tubos con agua estéril y almacenada en refrigeración.

5.2.- Reactivación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se sembró por estría en medio gelpa (apéndice 3), incubado a 30°C por 48 h. Posteriormente se inocularon 100 ml de aguamiel previamente pasteurizado con dos asadas de las colonias obtenidas y se incubó a 30 °C / 48 h.

5.3.- Sustrato

Se utilizó aguamiel obtenido de Nanacamilpa Tlaxcala y de la delegación Milpa alta, pasteurizado en equipo Elecrem a 75 °C durante 5 minutos y se almacenó a -10 °C.

5.4.- Condiciones óptimas para la preparación del inóculo

Con la cepa activa se inocularon al 6%(V/V): 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L, sin agitación; 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L con agitación (200 rpm) y 300 ml de aguamiel en matraz de 1 L con agitación (200 rpm). Todos incubados a 30 °C por 48 h. Se tomó una muestra de 10 ml cada 3 h.

5.5.- INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Debido a la variabilidad en el pH que presentaba en algunos casos los diferentes lotes de aguamiel que se utilizaron, fue necesario llevar a cabo un experimento en el que se utilizó aguamiel con un pH bajo (4.5) y otro con aguamiel con pH ajustado (7.0), para determinar el efecto durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizaron 2 matraces de 500 ml con 150 ml de aguamiel con 9.8% de sólidos previamente pasteurizado. Se inocularon con 6% (v/v) y se incubaron a 30 °C por 48 horas y 200 rpm, tomándose muestras a las 0, 24, y 48 h.

5.6.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCAR SOBRE LA PRODUCCION DE ETANOL.

5.61.- Adición de fuente de carbono

Se utilizaron 8 matraces de 1 L, cada uno con 300 ml de aguamiel (9.2% sólidos totales) pasteurizado y se adicionó a cada matraz un azúcar diferente: azúcar blanca (comercial), azúcar morena(comercial), sacarosa (Bioxon cat. 217000), dextrosa (grado alimentario, Arancia), fructosa (grado reactivo, Merck), jarabe de fructosa (55% fructosa y 45% glucosa, grado alimentario, Arancia) , azúcar invertido (79% de hidrólisis, grado aliemtario, Química Barsa), respectivamente y se utilizó un matraz como control, el cual contenía sólo 300 ml de aguamiel. Todos los matraces se ajustaron a un 10% de sólidos totales, inoculados al 6% (v/v) y se incubaron en a 30°C por 48 h y 200 rpm. Se tomaron muestras de 5 ml a los tiempos 0, 24 y 48 h.

5.7.- PRODUCCION DE ETANOL POR CULTIVO EN LOTE.

5.7.1.- Preparación del inóculo

Se sembró por estría en medio gelpa y se incubó a 30°C por 48 h. Posteriormente se inocularon 100 ml de aguamiel previamente pasteurizado con dos asadas de las colonias obtenidas y se incubó a 30°C durante 48 h.

Se colocaron 300 ml de aguamiel pasteurizado en un matraz de 1 L, inoculado con un 6% (V/V) de la cepa activa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se incubó a 30°C durante 22 h, con agitación y en condiciones microaerofilicas.

PRODUCCION DE ETANOL POR CULTIVO EN LOTE DE AGUAMIEL.

Se colocaron 3 L de aguamiel pasteurizada en un fermentador (New Brunswick Scientific) del mismo volumen. Se adicionó un 6%(V/V) de inóculo. Se mantuvo una temperatura de 30°C por 48 h, con agitación de 200 rpm y condiciones de aerobiosis, suministrando O₂ durante las primeras 2 h; después de este tiempo se continuó con la fermentación bajo condiciones de microaerobiosis. Se tomaron muestras de 20 ml cada 4 h.

5.8.- FERMENTACION POR LOTES DE AGUAMIEL AJUSTADO A 10 % DE SÓLIDOS:

Una vez que se conoce cual es la mejor fuente de carbono para enriquecer el medio de cultivo, se realizó un ajuste al 10% de sólidos a los 3 L de aguamiel con azúcar invertido desde el inicio de la fermentación; adicionando 6% (v/v) del inóculo, se incubó a 30°C por 48h, con agitación de 200 rpm y suministrando oxígeno las 2 primeras horas de la fermentación. Una vez que ha pasado este tiempo el suministro de aire se cortó.

Se tomaron muestras cada 4 horas y se realizaron las mismas determinaciones que para las fermentaciones anteriores.

5.9.- FERMENTACION POR LOTES DE AGUAMIEL AJUSTADO A 15% DE SÓLIDOS.

Se ajustaron 3 L de aguamiel a 15% de sólidos con azúcar invertido, se colocaron en un fermentador del mismo volumen y se inocularon con 6% v/v del inóculo; se incubó a 30°C por 48h, con agitación de 200 rpm y suministrando oxígeno las 2 primeras horas de la fermentación. Una vez pasado este tiempo el suministro de aire se cortó.

Se tomaron muestras cada 4 horas y se realizaron las mismas determinaciones que para las fermentaciones anteriores.

5.10.- PRODUCCION DE ETANOL POR CULTIVO EN LOTE ALIMENTADO.

Se colocaron 3 L de aguamiel pasteurizada (9.2% sólidos totales) en un fermentador del mismo volumen, inoculado al 6% (v/v). Se incubó a 30 °C por 48 h, agitando a 200 rpm. y en condiciones de aerobiosis, para lo cual se suministró aire durante las primeras 2 h. Después de este tiempo se cortó el suministro de oxígeno y el resto de la fermentación se llevó a cabo en condiciones de microaerobiosis. Se realizó un seguimiento del consumo de azúcares reductores y totales durante la fermentación para determinar el momento en que se consumirían los azúcares. En ese momento se adicionó el azúcar invertido. La cantidad de azúcar invertido que se adicionó fue proporcional a la cantidad máxima de hidrólisis de la sacarosa registrada en las primeras horas de la fermentación. La alimentación se llevó a cabo a las

22 h. Se adicionaron 223 ml de azúcar invertido previamente pasteurizado por 5 minutos a 75°C. Las condiciones de inóculo y de incubación fueron las mismas que en la fermentación anterior.

Se realizaron dos fermentaciones más de este tipo con aguamiel de otra localidad perteneciente a la delegación Milpa alta, la cual contenía 13% sólidos totales. Para partir de las mismas condiciones de sustrato que el aguamiel de Tlaxcala, este aguamiel se diluyó a un 9% de sólidos totales con agua estéril. Posteriormente se siguió la misma metodología que en el primer experimento. Esto con el fin de corroborar que aun utilizando un sustrato procedente de otra localidad que presenta características un tanto diferentes en cuanto a la concentración de azúcar, los resultados obtenidos fueran reproducibles.

5.11.- Análisis

5.11.1.- pH

Se tomaron 5 ml de muestra y se midió el pH con un potenciómetro Corning pH 430 (cat. 477965).

5.11.2.- Porcentaje de sólidos totales

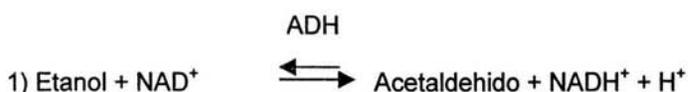
Se tomó una gota de la muestra y se colocó en un refractómetro Fisher 0-32%.

5.11.3.- Densidad óptica

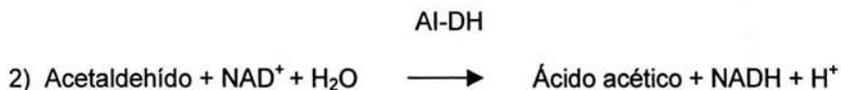
Se tomó un 1 ml de la muestra y se realizó una dilución 1:10, determinando densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5.

5.11.4.- Determinación de etanol

La determinación de etanol presente en el medio se realizó con un kit enzimático (kit de Boehringer No. cat. 176290). El principio de éste es oxidar el etanol a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y el dinucleótido adenin-nicotinamida(NAD^+).



El equilibrio de esta reacción tiende a desplazarse hacia reactivos (etanol y NAD^+). Sin embargo ésta puede ser desplazada completamente hacia la formación del acetaldehído en condiciones alcalinas. Posteriormente el acetaldehído es oxidado cuantitativamente hacia ácido acético en presencia de la enzima aldehído-deshidrogenasa (AI-DH).



El NADH es determinado espectofotométricamente a una longitud de 340 nm.

Preparación de la muestra:

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min. (para eliminar la biomasa) y se les dio un tratamiento térmico en baño María a 80°C durante 15 min.(Para detener la reacción enzimática). Se realizaron diluciones 1/1000.

Se siguió el procedimiento indicado en el apéndice 1.

5.11.5.- Acidez titulable

Se tomaron 5 ml de la muestra, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se añadieron dos gotas de fenoftaleína como indicador (solución al 0.1% en etanol). Se tituló con una solución valorada de NaOH 0.1 N, hasta la aparición de un color rosado que permaneciera durante 30 segundos. Se calculó el contenido de acidez y se expresó como ácido láctico por 100 ml de muestra, utilizando el valor de 0.09 que representa los miliequivalentes de ácido láctico.

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{\text{ml gastados} \times n (\text{NaOH}) \times 0.09 \text{ meq de ácido láctico} \times 100}{\text{ml de muestra}}$$

5.11.6.- Cuantificación de azúcares reductores

Se utilizó la técnica de DNS (Miller, G. L., 1959) para lo cual se colocó 1 ml de la muestra previamente diluida (1/100) en un tubo de ensayo. Se adicionó 1ml del reactivo DNS se tapó y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se dejó enfriar y se agregaron 10 ml de agua destilada, determinándose la absorbancia a 540 nm con un blanco de agua más reactivos en espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5). Se realizó una curva estándar con soluciones de 0.4 a 2.0 mg/ml de glucosa tratadas de la misma forma que la muestra problema.

5.11.7.- Cuantificación de azúcares totales

Se utilizó la técnica del fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956) para lo cual se colocó 1 ml de la muestra previamente diluida (1/ 1000) en tubo de ensayo y se adicionaron 0.6 ml de una solución acuosa de fenol al 5%, mezclando perfectamente después de la adición. Posteriormente se adicionaron

cuidadosamente 3.6 ml de ácido sulfúrico concentrado, mezclando perfectamente. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 15 min.) Se determinó la absorbancia a 480 nm con un blanco de agua más reactivos en espectrofotómetro (Spectronic Genesis). Se realizó una curva estándar con soluciones de 20 a 100 µg de glucosa / ml tratadas de la misma forma que la muestra problema.

5.11.8.- Curva estándar de peso seco.

Se tomó 1 ml de muestra (del punto donde se tiene el máximo crecimiento) y se realizó una dilución 1:10. De esta dilución se tomaron de 0.1 a 1 ml llevándoles a un volumen total de 1 ml y se tomaron las lecturas de absorbancia a 540 nm.

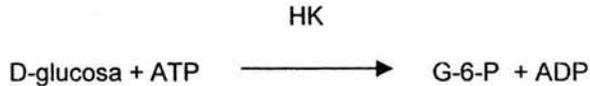
Posteriormente de la muestra sin diluir se colocaron de 0.1 a 1 ml en tubos eppendorff, llevándolos a un volumen total de 1 ml con agua. Se centrifugaron a 4°C con 12000 r.p.m. por 15 min, se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado adicionando con 1 ml de agua. Después de retirar el sobrenadante las muestras se colocaron en una estufa (THELCO GCA/PRECISION SCIENTIFIC) a 50°C por 24 h hasta peso constante. La curva se realizó por duplicado.

5.11.9.- Cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa

Para la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se utilizó un sistema enzimático comercial Sacarosa/D-glucosa/D-fructosa (Boehringer), el cual se basa en la determinación de D-glucosa antes y después de la hidrólisis enzimática de sacarosa; D-fructosa se determina subsecuentemente a la determinación de D-glucosa.

- Determinación de la D-glucosa antes de la inversión:

A pH 7.6, la enzima hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la D-glucosa por adenosin-5'-trifosfato (ATP) con la formación simultánea de adenosin-5'-difosfato (ADP).



En presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), la D-glucosa-6 fosfato (G-6-P) formada es especialmente oxidada por nicotinamida-adenín dinucleótido fosfato (NADP) a D-gluconato-6-fosfato con la formación de nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH)



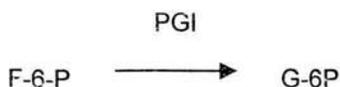
El NADPH formado en esta reacción es estequiométrica a la cantidad de D-glucosa y es medida por absorbancia a 340nm.

- Determinación de D-fructosa:

La hexoquinasa también cataliza la fosforilación de D-fructosa a D-fructosa-6-fosfato (F-6-P) con la ayuda de ATP.



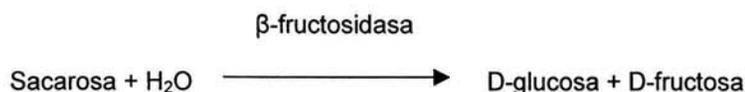
Al término de esta reacción F-6-P es convertida a G-6-P por la enzima fosfo-glucosa isomerasa (PGI).



G-6-P reacciona con NADP para la formación de D-gluconato-6-fosfato y NADPH. La cantidad de NADPH formada es estequiométrica a la cantidad de D-fructosa.

- Inversión enzimática:

A pH de 4.6, la sacarosa es hidrolizada por la enzima β -fructosidasa (invertasa) a D-glucosa y D-fructosa.



La determinación de D-glucosa después de la inversión (D-glucosa tota) es llevada acabo de acuerdo al principio arriba mencionado.

La sacarosa contenida es calculada por la diferencia de las concentraciones de D-glucosa antes y después de la inversión enzimática.

Preparación de la muestra

La muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min. (para eliminar la biomasa) y se les dio un tratamiento térmico en baño María a 80°C durante 15 min. (para detener la reacción enzimática). Se realizaron diluciones.

El procedimiento para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa se describe en el apéndice 2.

Se tomaron muestras cada 4 horas y se realizaron las mismas determinaciones que para las fermentaciones anteriores.

6.- Resultados y Discusión.

Preparación del Inóculo.

Durante esta primera etapa, se determino las mejores condiciones para obtener la mayor concentración de biomasa en el inóculo. Se probaron diferentes condiciones de volumen y agitación. Se utilizaron 3 matraces de 1 L, el primero con 300 ml de aguamiel y 200 rpm de agitación (M1), el segundo con 600 ml de aguamiel y agitación (M2) y el último con 600 ml de aguamiel pero sin agitación (M3).

En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos para el consumo de sólidos totales y la producción de biomasa (g/l) durante la fermentación por cultivo en lote de aguamiel por *S. cerevisiae*. Como podemos observar, en los matraces 1 y 2 la producción de biomasa es casi inmediata, sin embargo, para el matraz 3 la fase lag es mucho más larga ya que se prolonga hasta las 9 horas, provocando que durante la fase exponencial se genere menor concentración celular que con respecto a los otros 2 matraces. En los matraces 1 y 2 la fase exponencial es muy similar ya que se da de las 3 a las 27 horas. En el caso del matraz 3, la fase exponencial es menor. Durante esta fase exponencial, en el matraz 1 en el que se genera la mayor concentración de biomasa a pesar de que a las 24 horas es muy parecida a la del matraz 2. A partir de las 27 horas y hasta las 48 horas se presenta la fase estacionaria y la producción de biomasa durante esta etapa ya no es significativa. El consumo de sólidos se detiene a partir de las 27 horas coincidiendo con la fase exponencial.

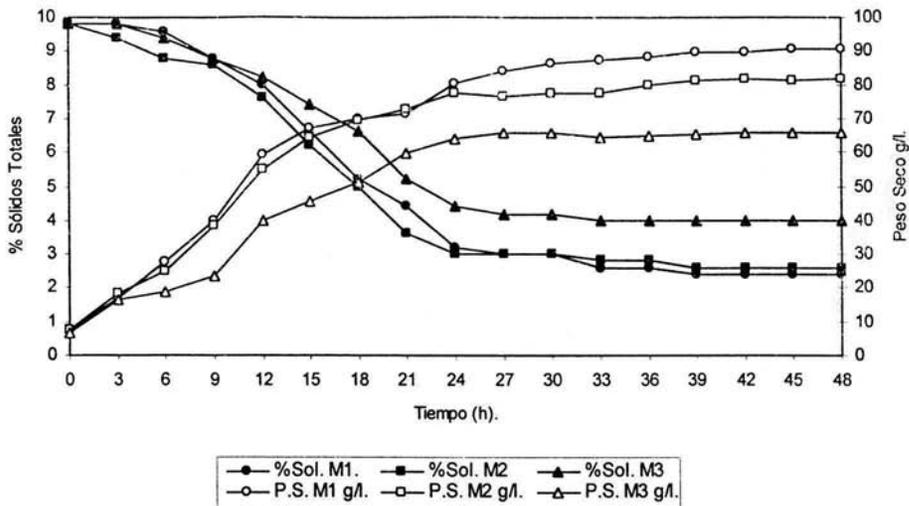


Fig 1. Valores de consumo de sólidos y del incremento de biomasa, durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel. M1 300 ml de aguamiel con agitación, M2 600 ml de aguamiel con agitación y M3 600 ml de aguamiel sin agitación; en matraces de 1000 ml.

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos para pH. Los 3 casos presentan un comportamiento similar. La fermentación se inicia con un pH de 7 y disminuye hasta alrededor de pH de 5 a las 48 horas. Este descenso de pH es atribuible a la producción de ácido láctico que se genera durante la fermentación, pero era algo que se esperaba, pues en estudios anteriores se reporta que una vez que se ha fermentado el aguamiel presenta valores de pH de alrededor de 4.0 – 4.5 (Enríquez, 1995).

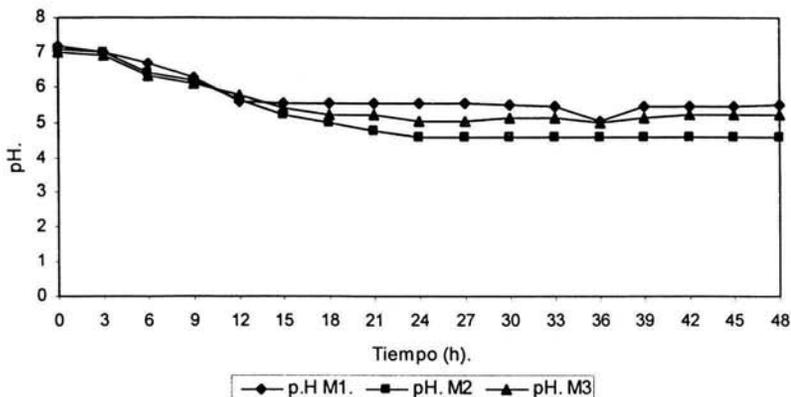


Fig. 2. Valores de pH durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel. M1 300 ml de aguamiel con agitación, M2 600 ml de aguamiel con agitación y M3 600 ml de aguamiel sin agitación.

Por lo anterior se consideró que las mejores condiciones para la preparación del inóculo son las que presenta el matraz 1 (300 ml de aguamiel con agitación en matraz de 1 L). Se comprobó que la agitación es favorable para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que esto permite que haya una mayor disponibilidad tanto de nutrientes como del oxígeno presente en el medio. Esto permitió obtener una buena producción de biomasa (90.5 g/l), valor que coincide con los reportados por Prince y Barford (1996), quienes obtienen una concentración celular de 70—90 g/l. El inóculo debe incubarse entre 21 y 24 horas, para garantizar que las células estén metabólicamente activas.

Influencia del pH en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Debido a la variación en el pH que presentan los lotes de aguamiel, se decidió determinar la influencia del pH sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Se llevaron a cabo 2 fermentaciones en matraces de 500 ml con 150 ml de aguamiel y con agitación; el primero presenta un pH de 4.8 (M1) y el otro se ajustó a un pH de 7 (M2). En este caso sólo se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos para pH y peso seco (g/l). Se observa que para ambos casos la concentración de biomasa obtenida es prácticamente la misma a las 24 y 48 h a pesar de que en el matraz 1 se parte de aguamiel con un pH más ácido que en el matraz 2. Aunque solo se tomaron los tiempos 0, 24 y 48 se puede observar que la concentración de biomasa después de las 24 h en ambos casos ya no aumenta. Se obtienen los mismos resultados que el matraz 1 de la fig. 1, el cual representa las condiciones óptimas de crecimiento. Se considera que al usar aguamiel con un pH que se encuentre en el intervalo de 4.5 – 7.0 no deberá representar ninguna dificultad para el crecimiento de *Saccharomyces*

cerevisiae. Este resultado obtenido coincide con lo reportado en la literatura (Anderson y Tatchel, 1996), se establece que el pH óptimo para el desarrollo de las levaduras se encuentra entre un pH de 4.5 – 6.5.

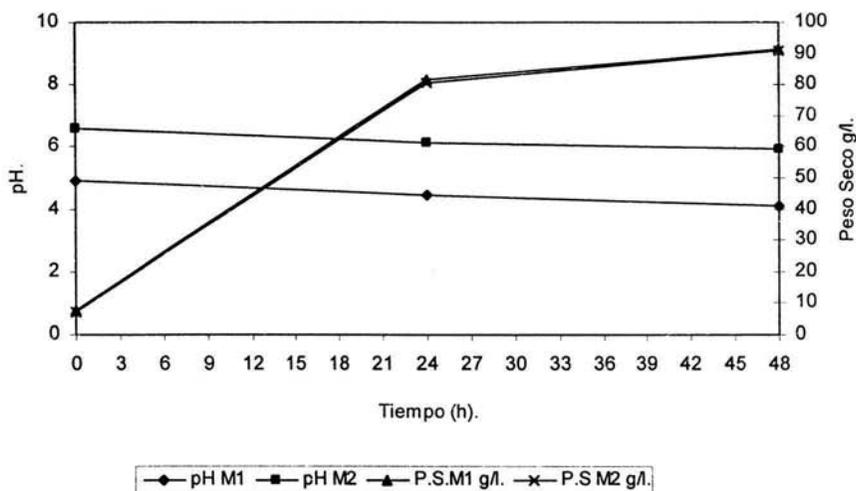


Fig. 3. Valores de pH obtenidos durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel. M1 aguamiel pH= 4.8, M2 aguamiel pH= 7.0.

En la figura 4, podemos observar que el consumo de sólidos a las 24 h es mayor en el matraz 2 que en el matraz 1. Esto nos indica que con un pH bajo se retrasa un poco el consumo de sólidos, pero después de 48 h de fermentación, la cantidad de sólidos consumidos y la biomasa generada es prácticamente la misma en ambos casos.

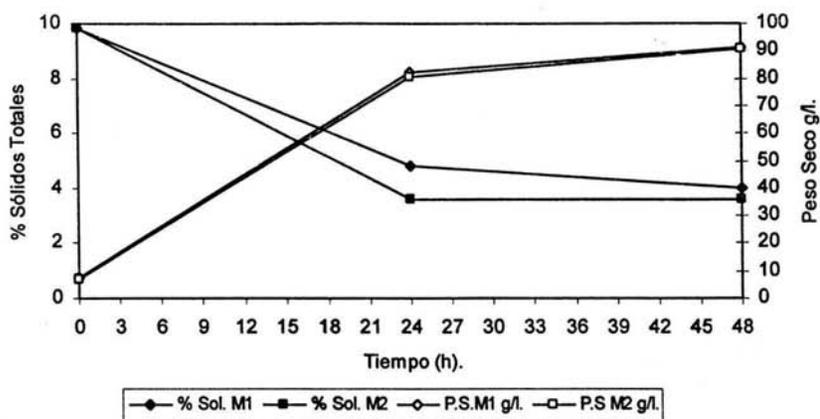


Fig. 4. Valores de consumo de sólidos y de incremento de biomasa obtenidos durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel. M1 aguamiel pH= 4.8, M2 aguamiel pH= 7.0.

Efecto de la concentración de azúcar en la producción de Etanol.

Adición de fuente de carbono.

Debido a la variabilidad en la concentración de azúcar presente en el aguamiel, la concentración de etanol que se obtiene durante la fermentación resulta ser variable y además baja; por lo que mediante la adición de diferentes fuentes de carbono al aguamiel se pretende aumentar la concentración de etanol.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos para el consumo de sólidos a las 0, 24 y 48 h; cuando se adicionaron diferentes tipos de azúcares comparado con un control, el cual solo contiene aguamiel (9.2 % de sólidos totales). Las figuras 6 y 7 muestran los resultados obtenidos para la producción de biomasa y de etanol durante los cultivos respectivos.

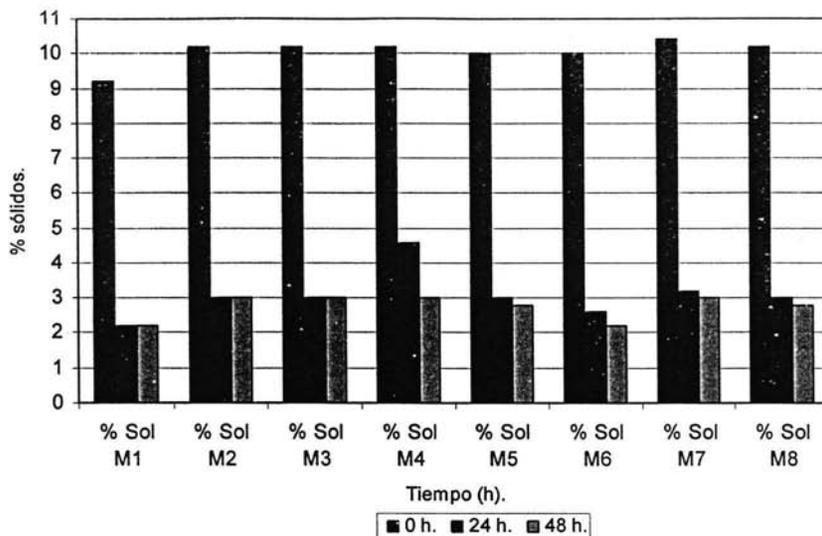


Fig. 5. Consumo de sólidos totales obtenidos durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel. M1 control, M2 azúcar blanca (comercial), M3 azúcar morena (comercial), M4 sacarosa, M5 dextrosa, M6 fructosa, M7 jarabe de fructosa, M8 azúcar invertido.

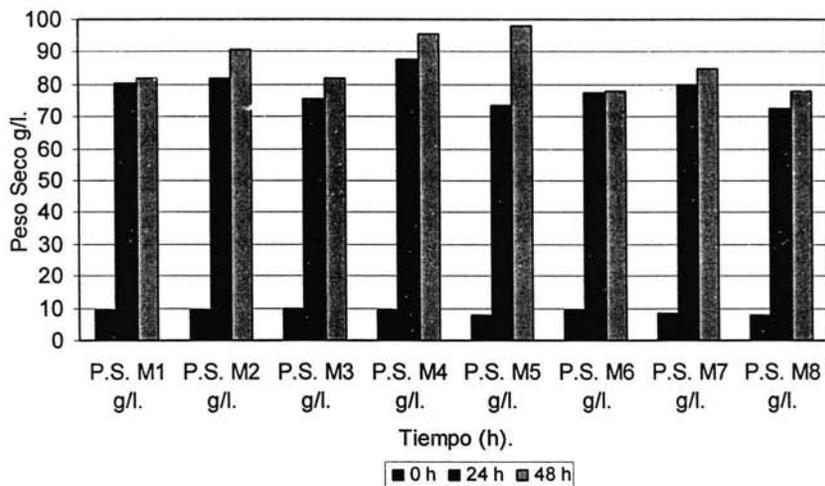


Fig. 6. Incremento de biomasa (medida por peso seco), durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel. M1 control, M2 azúcar blanca (comercial), M3 azúcar morena (comercial), M4 sacarosa, M5 dextrosa, M6 fructosa, M7 jarabe de fructosa, M8 azúcar invertido.

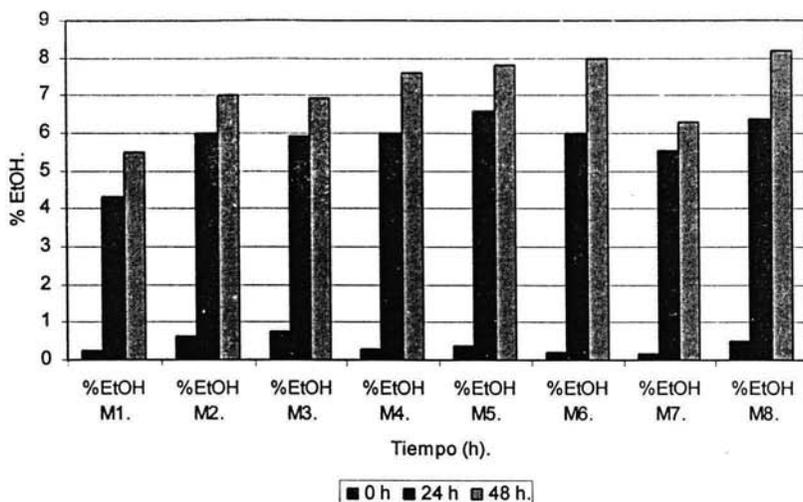


Fig. 7. Producción de etanol durante la fermentación de aguamiel por *Saccharomyces cerevisiae*. M1 control, M2 azúcar blanca (comercial), M3 azúcar morena (comercial), M4 sacarosa, M5 dextrosa, M6 fructosa, M7 jarabe de fructosa, M8 azúcar invertido.

Como se puede observar en la figura 5, cualquiera de los azúcares empleados puede ser metabolizado por *Saccharomyces cerevisiae*. En cuanto a la producción de biomasa, el mayor crecimiento se presenta cuando se adicionó glucosa. Esto podemos atribuirlo a que la glucosa es uno de los compuestos de carbono más fácilmente metabolizables por *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque también se puede observar que con la sacarosa el crecimiento fue muy bueno, aunque la diferencia es que *Saccharomyces cerevisiae* primero tiene que llevar a cabo la hidrólisis de la sacarosa para posteriormente poder utilizar la glucosa y fructosa. En cuanto al etanol (fig. 7) la mayor producción se da en el matraz donde se adicionó azúcar invertido, aunque también se obtuvo una buena producción de etanol en los matraces 6 y 7 donde se adicionó glucosa y fructosa respectivamente.

Con el azúcar invertido, aunque no se tiene la misma producción de biomasa como con otras fuentes de carbono, si es con el que se obtiene la mayor producción de etanol, que es el objetivo que se buscaba. Por esta razón

se decidió que es la mejor fuente de carbono a utilizar para llevar a cabo una fermentación por cultivo en lote alimentado.

Producción de Etanol por Cultivo en Lote.

Una vez que se conocen las mejores condiciones para el desarrollo de biomasa para el inóculo, es necesario conocer el comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cuanto a la producción de etanol, por lo que se llevó a cabo una fermentación con 3 L de aguamiel por cultivo en lote, inoculado con 6% (v/v) proveniente de un inóculo el cual se incubó durante 22 horas.

En la figura 8 se presentan los valores de peso seco obtenidos durante la fermentación, así como el consumo de sólidos totales.

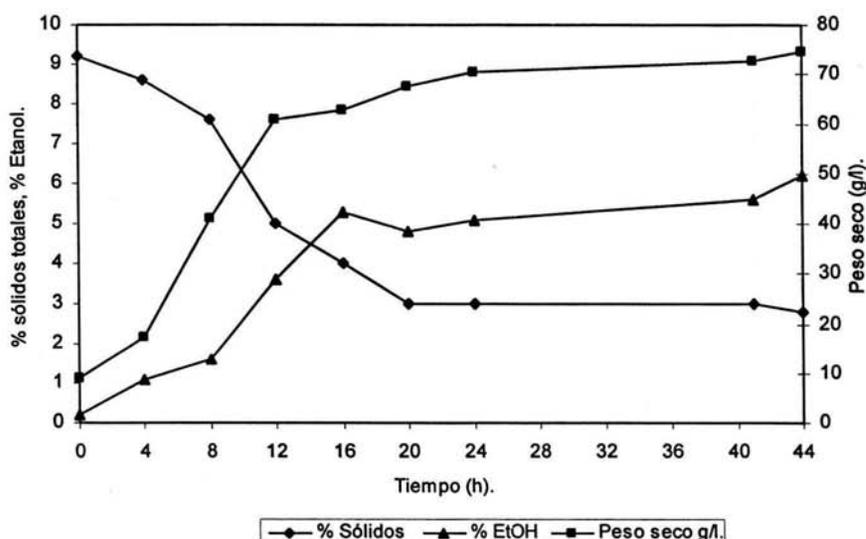


Fig. 8. Consumo de sólidos totales, producción de biomasa y producción de etanol durante la fermentación de 3L de aguamiel por cultivo en lote.

La producción de biomasa inició desde el principio de la fermentación. La fase lag fue muy pequeña, lo que nos indica que la propagación de

Saccharomyces cerevisiae fue adecuada bajo las condiciones empleadas para el inóculo.

La fase exponencial de crecimiento terminó alrededor de las 20 h. Esto coincidió con el tiempo en el cual dejaron de consumirse los sólidos totales presentes en el aguamiel.

El rendimiento obtenido fue de $Y_{X/S} = 0.604$ g de biomasa / g de sustrato (calculado a las 44 h). Dicho rendimiento puede ser considerado como bueno, ya que nos está indicando que una parte muy importante de la fuente de carbono se está destinando para la producción de biomasa.

En la figura 8 se presentan los valores obtenidos para la producción de etanol. En las primeras 20 h es donde ocurre la producción de etanol; la fase exponencial de crecimiento también terminó a las 20 h, lo que nos indica que la producción de etanol está asociada al crecimiento.

El rendimiento obtenido para la producción de etanol fue de $Y_{P/S} = 0.54$ g Etanol /g sustrato consumido, obteniéndose 6.2 % de etanol, calculado a la 44 h. Este resultado es muy parecido al reportado por Prince y Barford (1996), quienes reportan un resultado de 6.8 % de etanol pero para más de 48 h en un cultivo en lote.

En la figura 9 se presenta el consumo de azúcares totales conforme transcurre la fermentación.

Se realizó un seguimiento de los azúcares totales y reductores. Al principio de la fermentación la concentración de azúcares reductores es muy baja, durante las primeras 16 h aumenta la concentración de los azúcares reductores, debido a la hidrólisis de la sacarosa, pero después de este tiempo son consumidos muy rápidamente hasta las 24 h. Este tiempo en el cual se terminan los azúcares reductores coincide con el tiempo en el que deja de producirse el etanol.

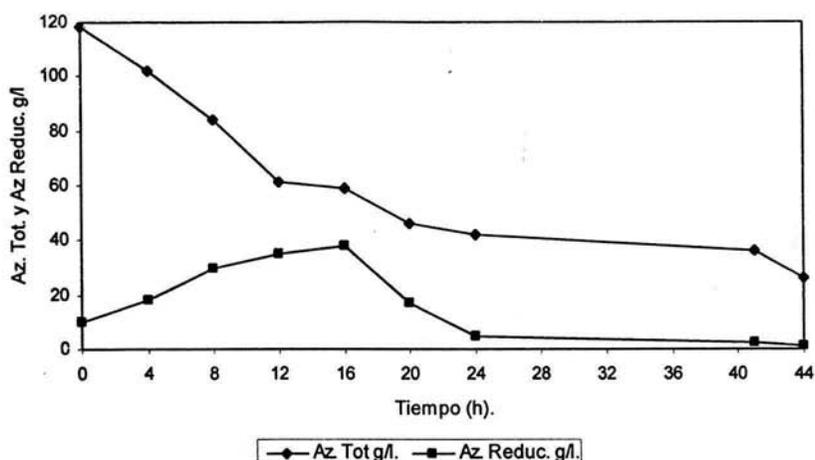


Fig. 9. Consumo de azúcares totales y azúcares reductores durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel por cultivo en lote.

También podemos observar que, la cantidad de azúcares reductores que se genera a las 16h, no logra ser igual a la concentración de azúcares totales que se tenían al inicio, esto debido a que conforme ocurre la hidrólisis también se están consumiendo los azúcares.

En la fig. 10 se observan los valores obtenidos para pH y porcentaje de acidez. En cuanto al pH, se sigue manteniendo el mismo comportamiento que en las fermentaciones anteriores, es decir, durante la fermentación el pH disminuye de 7 a 4.5. A partir de las 12 h el pH ya no baja, se mantienen hasta el final de la fermentación, en cuanto a la producción de acidez, deja de producirse al mismo tiempo en que el pH deja de disminuir y a partir de las 12 h permanece constante.

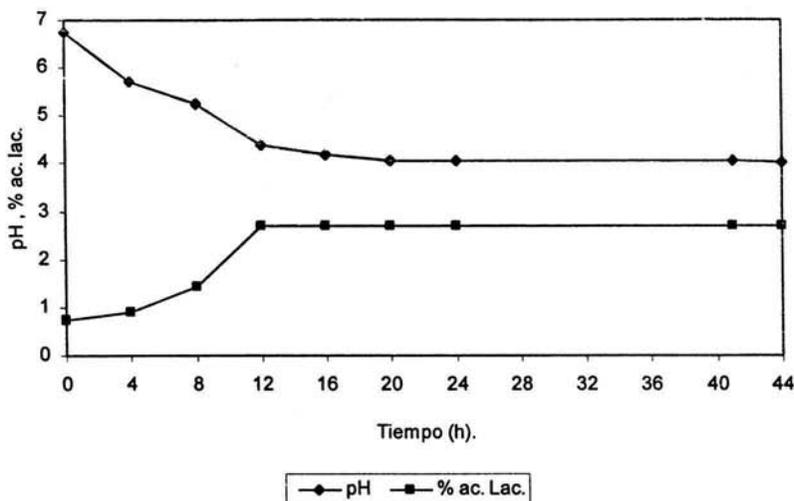


Fig. 10. Valores obtenidos para pH y de acidez producido durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel por cultivo en lote.

Producción de etanol por cultivo en lote enriquecido con una fuente de carbono a 10 °B y 15 °B.

Se ajustó el porcentaje de sólidos del aguamiel a 10 °B con azúcar invertido desde el inicio de la fermentación, con lo que la concentración de azúcares fue de 215 g/l. Esta concentración es prácticamente el doble de la que se tenía en el aguamiel (118.2 g/l) sin la adición de la fuente de carbono.

El objetivo principal por el cual se adiciona una fuente extra de carbono al inicio de la fermentación, es para lograr una mayor producción de etanol. Las condiciones para realizar la fermentación son las mismas que las anteriores.

También se llevó a cabo una fermentación en la que se ajustaron los sólidos a 15 °B (640 g/l). Debido a que la fuente de carbono empleada (azúcar invertido), contiene glucosa, fructosa, además de la sacarosa; la concentración de azúcares reductores también aumentó de manera considerable (fig. 12)

En ambas fermentaciones el consumo más importante de azúcares se llevó a cabo a las 20 h (fig. 11), pero no se terminaron los azúcares al final de ésta, quedando una mayor concentración en 15 °B (100 g/l) que en 10 °B (19 g/l) figura 11.

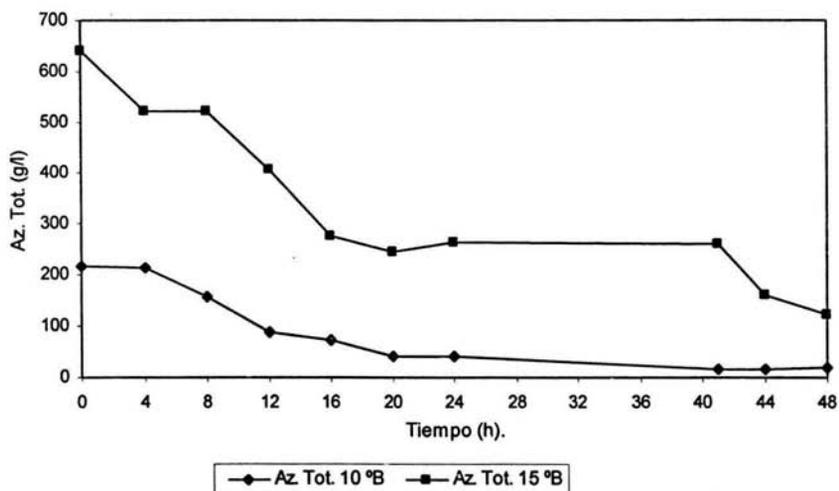


Fig. 11. Consumo de azúcares totales durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel ajustado a 10 y 15 °B con azúcar invertido.

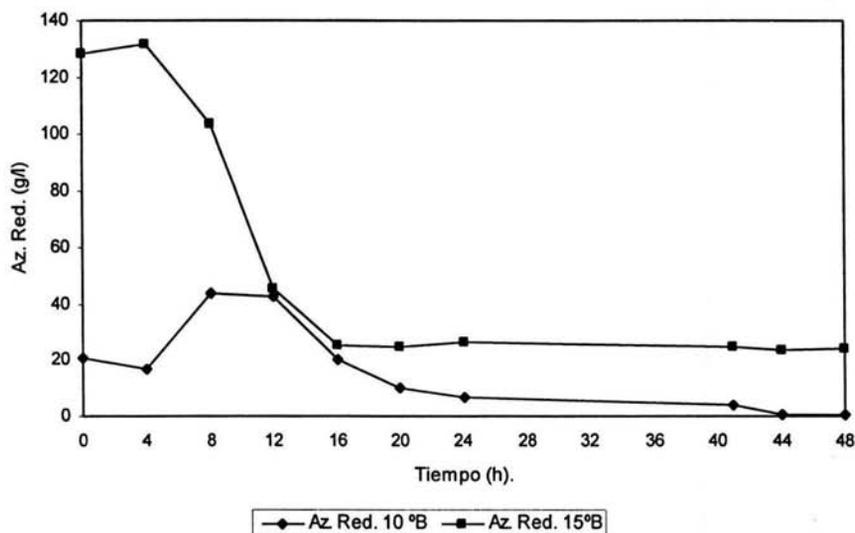


Fig. 12. Consumo de azúcares reductores durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel ajustado a 10 y 15 °B con azúcar invertido.

El aumento en la concentración de los azúcares reductores de las 4 a las 8 horas es debido seguramente a la presencia de glucosa y fructosa por efecto de la hidrólisis de la sacarosa.

La figura 13 nos muestra los resultados obtenidos para la producción de biomasa y consumo de sólidos totales. Como se puede observar, el consumo de sólidos tiene un comportamiento muy similar al presentado por los azúcares totales, esto debido a que de manera indirecta la cantidad de sólidos presentes en el medio nos da una idea de la concentración de azúcar, sin entender con esto que representen lo mismo.

En la fermentación donde se ajustaron los sólidos a 10 °B, la producción de biomasa ocurrió desde el inicio, cosa que no sucedió en la fermentación con ajuste a 15 °B, en la que se presenta una fase lag muy grande (8 h). Esto debido posiblemente a la concentración alta de azúcar a la que *Saccharomyces cerevisiae* debe adaptarse.

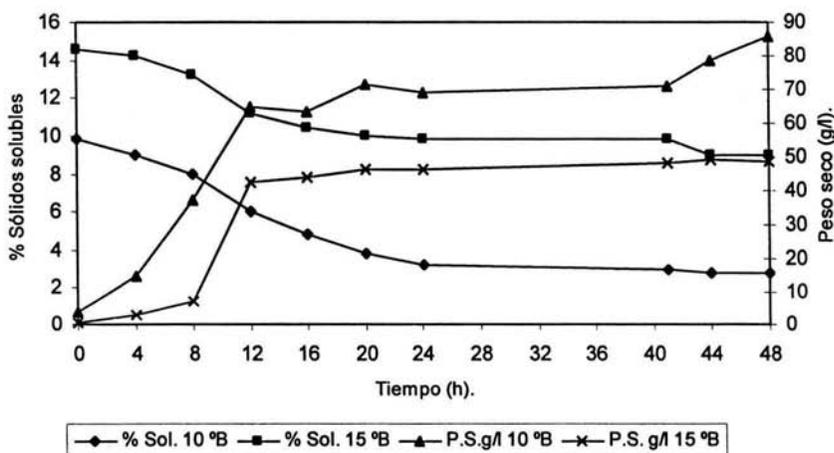


Fig. 13. Consumo de sólidos solubles y producción de biomasa (medida en peso seco), durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel ajustado a 10 y 15 °B con azúcar invertido.

Aunque en la fermentación con el ajuste de sólidos a 10 °B se está generando una mayor concentración de biomasa (86.5 g/l) que en la fermentación por cultivo en lote donde no se adiciona una fuente de carbono

(74.7 g/l), no puede considerarse como un aumento importante, ya que solo se aumentó en 12 g/l aproximadamente. Además, el rendimiento obtenido para este caso es menor $Y_{X/S} = 0.41$ g biomasa / g sustrato consumido, comparado con $Y_{X/S} = 0.604$ g biomasa / g sustrato consumido obtenido para la fermentación en donde no se adicionó azúcar invertido al aguamiel, es decir en la fermentación por cultivo en lote.

La concentración de etanol no fue mucho mayor que la obtenida en la fermentación sin adición de fuente de carbono; el rendimiento obtenido para la fermentación con el ajuste a 10 °B es de $Y_{P/S} = 0.32$ g etanol / g sustrato consumido comparado con $Y_{P/S} = 0.54$ g etanol / g sustrato consumido obtenido para la fermentación en la que no se adicionó azúcar invertido al aguamiel.

De acuerdo con los resultados obtenidos no se consideró conveniente enriquecer al medio con una fuente de carbono desde el inicio de la fermentación.

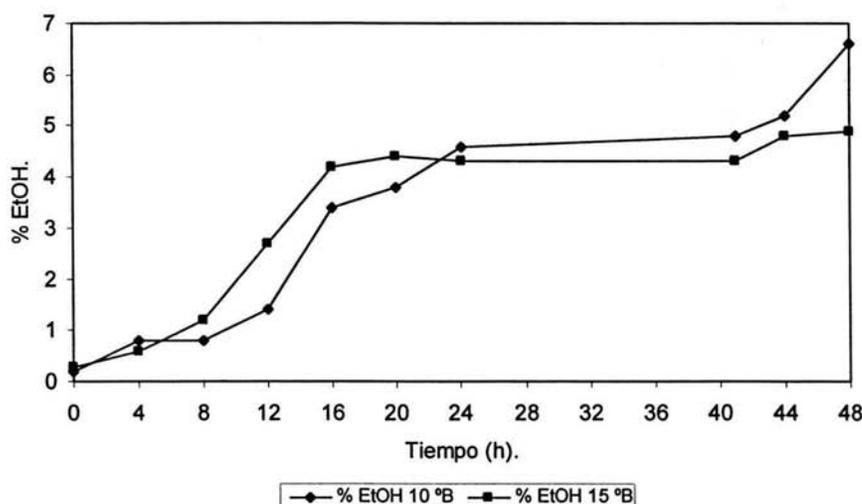


Fig. 14. Producción de etanol durante la fermentación de aguamiel ajustado a 10 y 15 °B con azúcar invertido.

En la fig. 15 se puede observar que el pH sigue mostrando el mismo comportamiento que respecto a las fermentaciones anteriores, ya que en ambos casos se parte de un pH muy cercano a 7 y al terminar tenemos un intervalo de 4- 4.5, la producción de acidez sigue manteniéndose baja 3.4 y 3.4 % respectivamente.

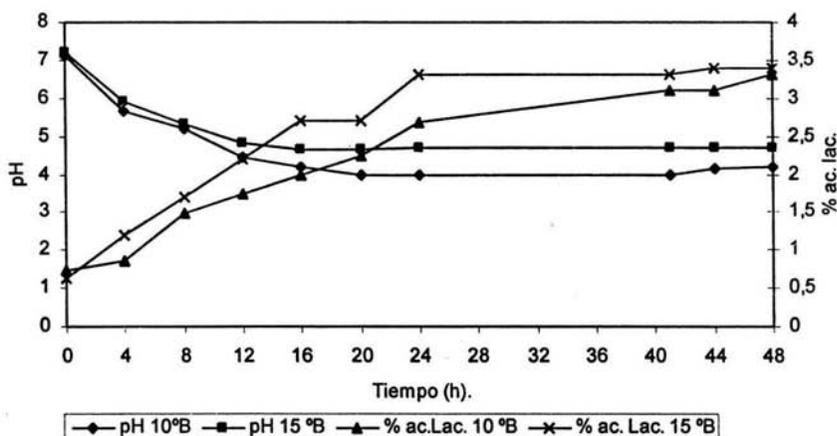


Fig. 15. Valores de pH y de acidez producido durante la fermentación de aguamiel ajustado a 10 y 15 °B con azúcar invertido.

Producción de etanol por cultivo en lote alimentado.

Se inició la fermentación con aguamiel sin la adición de la fuente de carbono y a las 22 horas, cuando se terminan los azúcares se realizó una alimentación con azúcar invertido.

La cantidad de azúcar invertido que se adicionó fue proporcional a la cantidad máxima de hidrólisis de la sacarosa, registrada en las primeras horas de la fermentación. En la alimentación se adicionaron 223 ml de azúcar invertido. En este caso el cálculo para determinar la concentración de azúcar, fue realizado en base a los azúcares totales ya que la fuente de carbono que se adicionará contiene sacarosa, glucosa y fructosa.

Además de esta fermentación se realizaron otras 2 con un lote de aguamiel diferente al que se venía utilizando. Dicho lote de aguamiel procede de Milpa Alta, el cual presenta características diferentes al aguamiel de Nanacamilpa Tlaxcala en cuanto a la concentración de sólidos solubles y por lo tanto también en la concentración de azúcar. Debido a esto, para ajustar la concentración de sólidos presentes en el aguamiel de Milpa Alta (contenido de sólidos 13 ‰), fue necesario diluir con agua estéril hasta alcanzar los 9‰ de sólidos que contienen el aguamiel con el que se estaban realizando las fermentaciones anteriores.

Como puede observarse en la figura 16, en las tres fermentaciones se está partiendo prácticamente de la misma concentración de sólidos totales. Conforme se desarrolla la fermentación el consumo de sólidos es muy similar; a las 22 h la concentración ya es muy poca. En este momento se realizó la alimentación con azúcar invertido para recuperar la concentración que se tenía al inicio de la fermentación. De igual forma al término de las 48 h de fermentación los sólidos son consumidos hasta prácticamente la misma concentración en los tres casos, pero estos no se agotan.

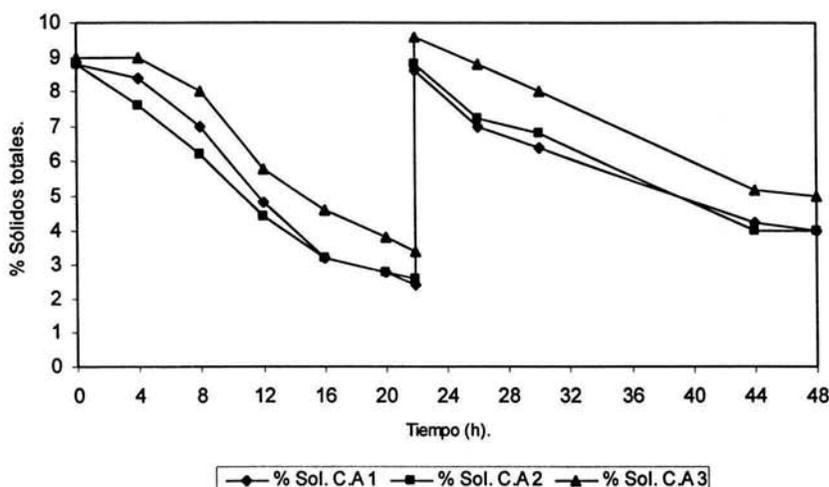


Fig. 16. Consumo de sólidos solubles durante las tres fermentaciones por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A. 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A. 2 y C.A. 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

En las figuras 17 y 18, se pueden observar los valores obtenidos para el consumo de carbohidratos totales y los azúcares reductores respectivamente. Como se puede observar en la fig. 17, a pesar de que en la fermentación C.A 1 se utilizó aguamiel diferente a las otras dos fermentaciones, el perfil de consumo de azúcares fue muy parecido, ya que al principio de la fermentación se partió de una concentración similar y a las 22 h la concentración de azúcares fue baja en todos los casos. En este tiempo se realizó la alimentación y la concentración de azúcar aumentó, obteniéndose prácticamente lo que se tenía al principio.

Después de la alimentación nuevamente se dio el mismo comportamiento en cuanto al consumo, lo que nos indica que la fuente de carbono empleada está siendo metabolizada de forma adecuada por la levadura.

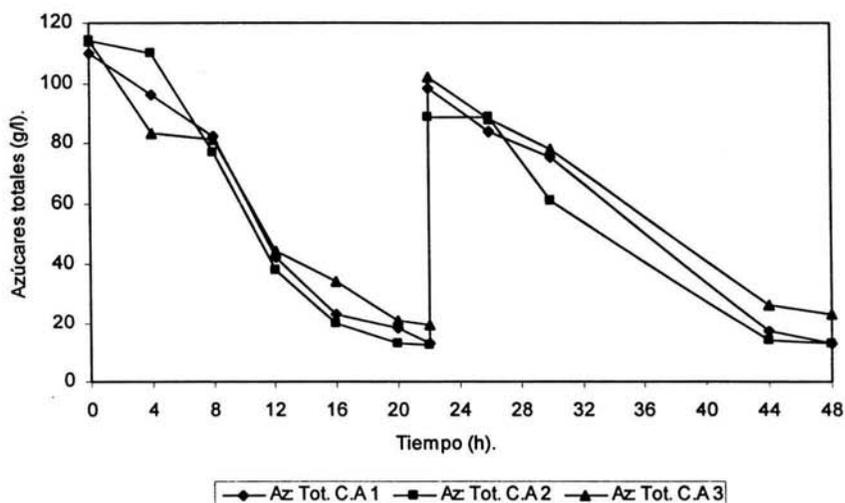


Fig. 17. Consumo de azúcares totales durante las tres fermentaciones de aguamiel por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A 2 y C.A 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

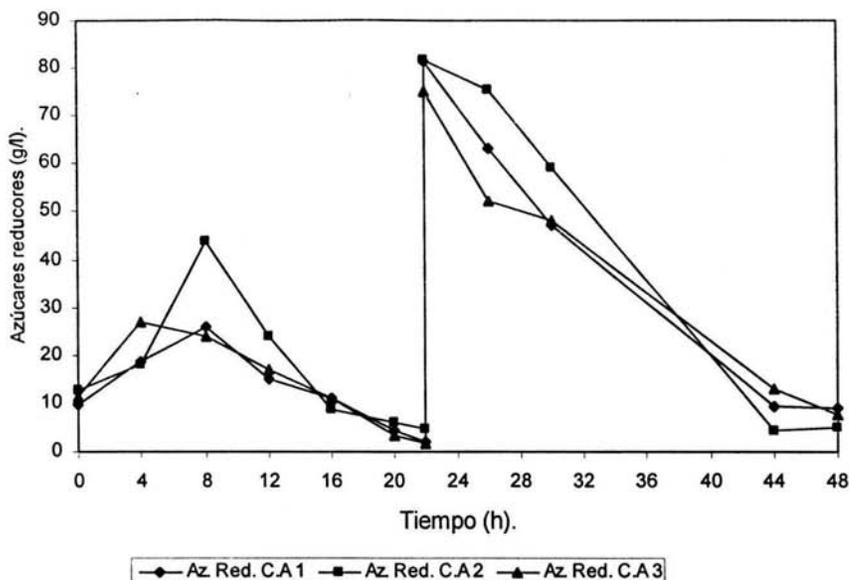


Fig. 18. Consumo de azúcares reductores durante las tres fermentaciones de aguamiel por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A 2 y C.A 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

En la figura 18 se presentan los valores obtenidos para los azúcares reductores. Al inicio de la fermentación se aprecia que hay un incremento en la concentración de éstos y después disminuyen. Esto es debido a que en el aguamiel el azúcar que predomina es la sacarosa y como este no puede ser utilizado por la levadura, se lleva a cabo la hidrólisis de dicho azúcar, convirtiéndose en glucosa y fructosa que es lo que se registra en los picos que se observan a la 8 h. Después de que se realizó la alimentación no se muestra este mismo comportamiento ya que en la fuente de carbono empleada (azúcar invertido) se tienen desde un principio a los azúcares reductores y no solo la sacarosa. Una vez que se termina el tiempo de fermentación podemos observar que también prácticamente se agota la concentración de azúcares, lo que nos confirma que la fuente de carbono empleada para la alimentación es perfectamente metabolizable por la levadura.

En la figura 19, se observan las curvas de crecimiento durante las tres fermentaciones. Como podemos observar, la cantidad de biomasa generada durante las primeras 22 h es prácticamente la misma para las tres. En el caso de C.A 1 y C.A. 2 se da una fase lag de 4 horas y para el caso de C.A. 3 la producción de biomasa ocurre casi de inmediato. A las 22 h se aprecia una disminución en la concentración de biomasa debido tal vez al efecto de dilución que se da por agregar el volumen de la fuente de carbono, pero después, a las 48 horas, se logra recuperar la cantidad de biomasa que se tenía antes de la alimentación. Esto indica que después de haberse realizado la alimentación, la cantidad de azúcares consumidos se están destinando a la producción de etanol y ya no para su crecimiento.

Los rendimientos que se obtienen en los tres casos también son muy parecidos; para C.A 1 tenemos $Y_{X/S} = 0.56$ g biomasa / g sustrato consumido, para C.A 2 $Y_{X/S} = 0.51$ g biomasa / g sustrato consumido y para C.A 3 $Y_{X/S} = 0.58$ g biomasa / g sustrato consumido, además las velocidades específicas para cada uno son $\mu = 0.35, 0.3$ y 0.31 respectivamente; lo que nos indica la reproducibilidad en la producción de biomasa, todos calculados a las 22 horas ya que es el tiempo en el que se alimenta. Los rendimiento obtenidos de las 22 a las 48 horas bajaron de manera considerable, obteniéndose los siguientes resultados: $Y_{X/S} = 0.07$ g biomasa / g sustrato consumido, para C.A 2 $Y_{X/S} = 0.08$ g biomasa / g sustrato consumido y para C.A 3 $Y_{X/S} = 0.08$ g biomasa / g sustrato consumido. Esto confirma que la fuente de carbono consumida a partir de la alimentación se esta destinando para la producción de etanol y no para su crecimiento. Las velocidades específicas de crecimiento a partir de este momento son prácticamente de cero, ya que la concentración de biomasa permanece constante de las 22 a las 48h, pero no así la concentración de etanol (fig. 20) lo que nos indica que la fuente de carbono que se adiciono se esta destinando a la producción de etanol. A las 22 h se observa una disminución en la concentración de biomasa, esto es debido a la adición del azúcar invertido que produce un efecto de dilución en el medio, pero que después de 3 h se recupera y permanece constante.

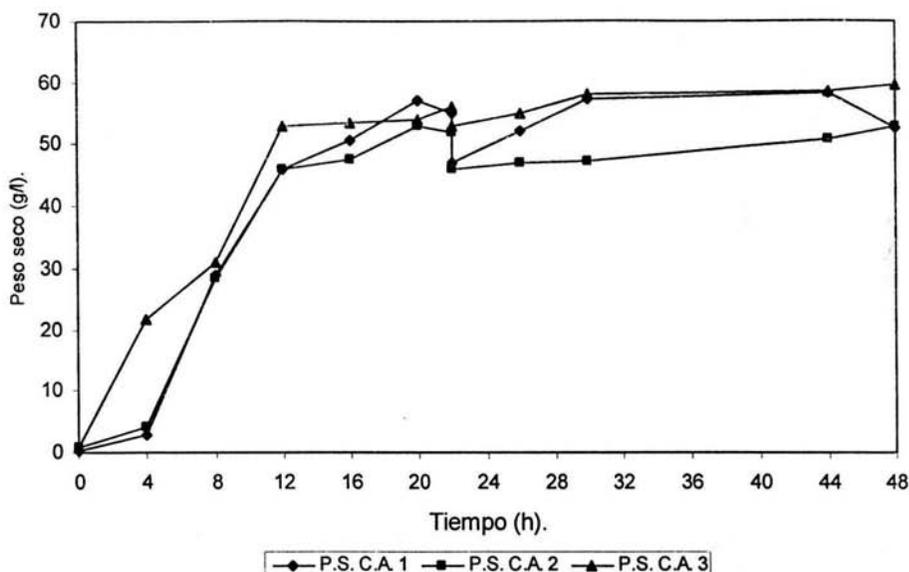


Fig. 19. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de aguamiel por cultivo en lote alimentado. C.A 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A 2 y C.A 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

En la figura 20 se presentan los resultados obtenidos para la producción de etanol durante las tres fermentaciones. Los valores que se obtienen durante las tres fermentaciones nos hablan nuevamente de la reproducibilidad que se obtuvo en las fermentaciones, a pesar de que se están empleando dos lotes diferentes de aguamiel. Las condiciones bajo las cuales se realizan las fermentaciones son las adecuadas para la producción de etanol.

Los rendimientos que se obtienen en estos casos para la producción de etanol fueron, $Y_{P/S} = 0.5$ g etanol / g consumo de sustrato para C.A 1, $Y_{P/S} = 0.6$ g etanol / g consumo de sustrato para C.A 2 y de $Y_{P/S} = 0.56$ g etanol / g consumo de sustrato para C.A 3 obtenidos para las 22 horas. Estos valores resultan muy parecidos a los rendimientos obtenidos de las 22 a las 48 horas, los cuales fueron $Y_{P/S} = 0.52$ g Etanol / g consumo de sustrato para C.A 1, $Y_{P/S} = 0.55$ g Etanol / g consumo de sustrato para C.A 2 y de $Y_{P/S} = 0.52$ g Etanol / g consumo de sustrato para C.A 3, como podemos observar los rendimiento se mantienen en cada uno de los tres casos después de que se ha

llevado a cabo la alimentación , lo que confirma que la fuente de carbono que se adicionó se esta destinando a la producción de etanol.

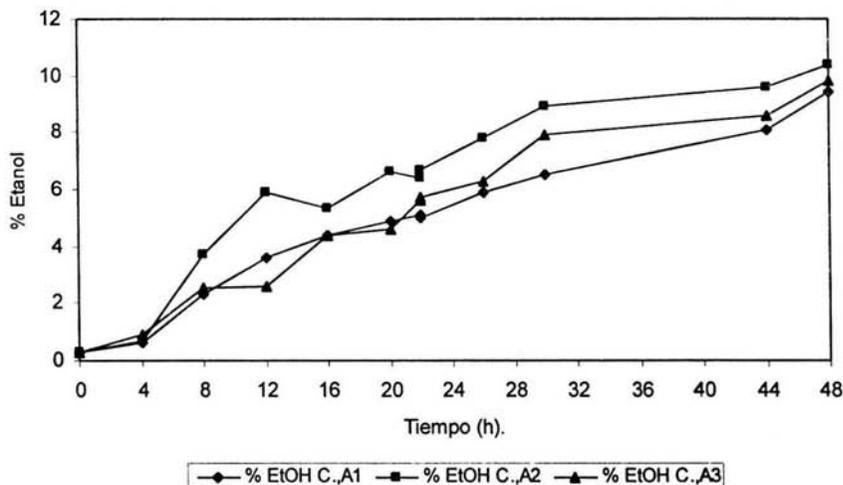


Fig. 20. Producción de etanol durante la fermentación de aguamiel por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A 2 y C.A 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

La concentración de etanol obtenida a partir de una fermentación por cultivo en lote alimentado fue mayor que la obtenida en las fermentación por cultivo en lote sin alimentar y mucho mejor todavía que una fermentación en la cual se enriquece el medio desde el inicio de la fermentación. Esto puede atribuirse a que, durante la primera etapa de la fermentación, es decir antes de alimentar, debido a que el sistema se le proporciona durante las 2 primeras horas un flujo de aire de 1 vvm, existen condiciones de aerobiosis, por lo que se está favoreciendo la producción de biomasa. También se está consiguiendo producir etanol, puesto que su producción está asociada al crecimiento. Una vez que se realiza la alimentación ya no se produce biomasa, debido a que las condiciones presentes en el medio ya son totalmente anaeróbicas, favoreciéndose la producción de etanol a partir de la concentración de biomasa que se tenía.

En los casos anteriores (fermentación por cultivo en lote sin alimentar y la fermentación donde se adiciona la fuente de carbono desde el inicio), aunque se parte de las mismas condiciones de aeración, temperatura, agitación, etc., lo que limitaba la producción de etanol era la concentración de azúcar presente en el medio.

En las figuras 21, 22 y 23 se presenta el consumo de sacarosa, glucosa y fructosa. Como se puede observar en la figura 21, al principio de la fermentación el azúcar predominante en el aguamiel es la sacarosa, que se consume aproximadamente a las 16 horas y su concentración aumenta ligeramente a las 22 horas, cuando se alimenta y al cabo de las 48 horas es consumida en su totalidad. Al final de la fermentación la concentración de sacarosa es prácticamente de cero, lo que nos indica que la fuente de carbono es perfectamente metabolizable.

En las figuras 22 y 23 se presentan los valores de consumo de glucosa y fructosa respectivamente. En ambos casos se presenta un patrón muy similar, de las 0 a las 8 horas se da un aumento en la concentración de dichos azúcares debido a la hidrólisis de la sacarosa, a partir de ese momento y hasta las 22 horas disminuye la concentración ya que son consumidos. Después de las 22 horas se da otro aumento en la concentración pero ahora es debido a la alimentación, posteriormente de las 22 a las 48 horas ocurre el mismo comportamiento en el aumento de la concentración debido a la hidrólisis de la sacarosa presente en el azúcar invertido y al cabo de las 48 horas se observa que las azúcares vuelven a ser consumidos.

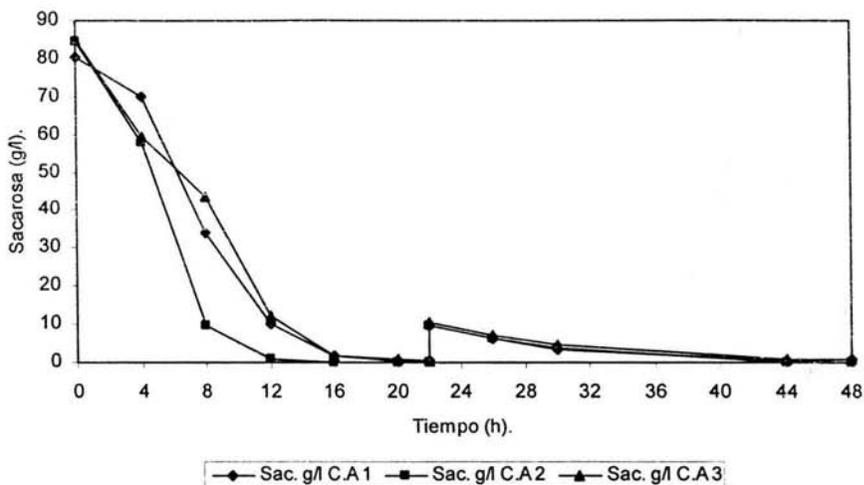


Fig. 21. Concentración de sacarosa durante la fermentación de aguamiel por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A. 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A. 2 y C.A. 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

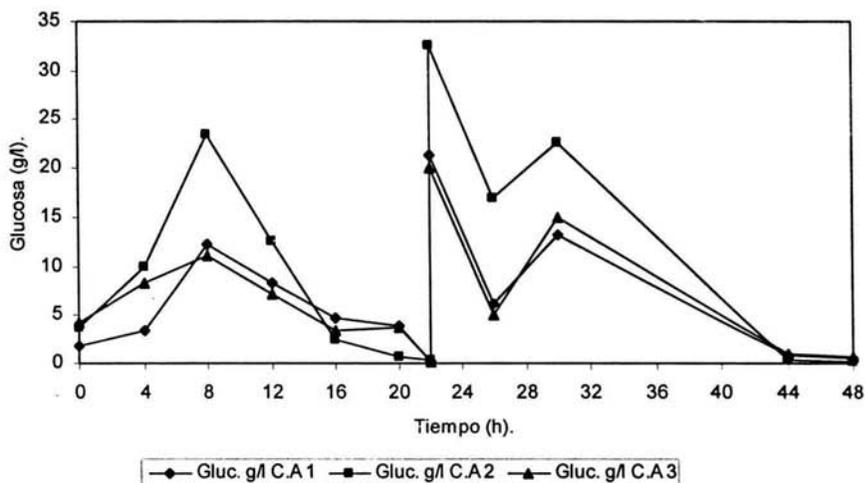


Fig. 22. Concentración de glucosa durante la fermentación de aguamiel por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A. 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A. 2 y C.A. 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

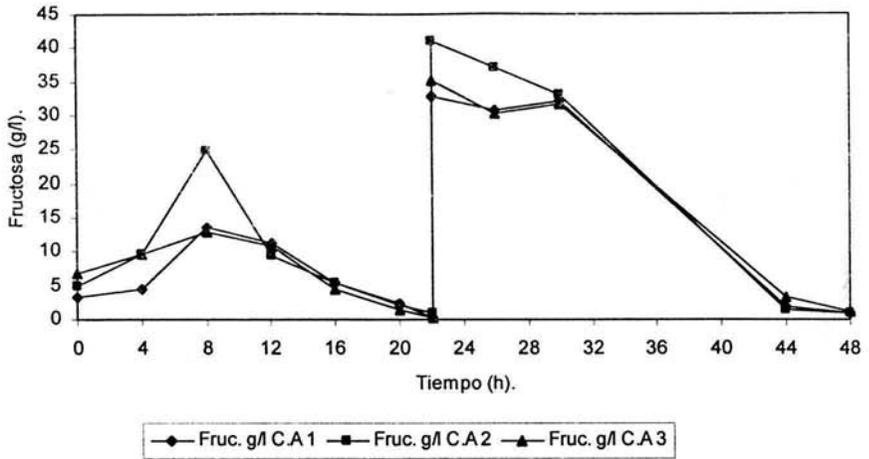


Fig. 23. Concentración de fructosa en g/l durante la fermentación de aguamiel por cultivo en lote alimentado a las 22 h. C.A 1 Cultivo en lote alimentado a las 22 h utilizando aguamiel procedente de Nanacamilpa Tlaxcala; C.A 2 y C.A 3 Cultivo en lote alimentado a las 22 utilizando aguamiel procedente de Milpa Alta.

En la figura 24 se presentan los resultados obtenidos para pH y la producción de ácido láctico. Los resultados que se tienen coinciden con los valores de las fermentaciones anteriores, donde se parte de un pH muy cercano a 7 en todos los casos y al final de la fermentación el pH oscila en un valor de 4 – 4.5. Este valor coincide con lo reportado en la literatura (Enríquez, 1995). El valor de pH a partir de la 16 h ya no varía. En el caso de la acidez, podemos observar que de las 0 a las 22 horas se da un aumento muy variable respecto a cada una de las fermentaciones, pero a partir de la 22 a las 48 horas el comportamiento es muy similar en los tres casos ya que al final se tienen casi la misma concentración.

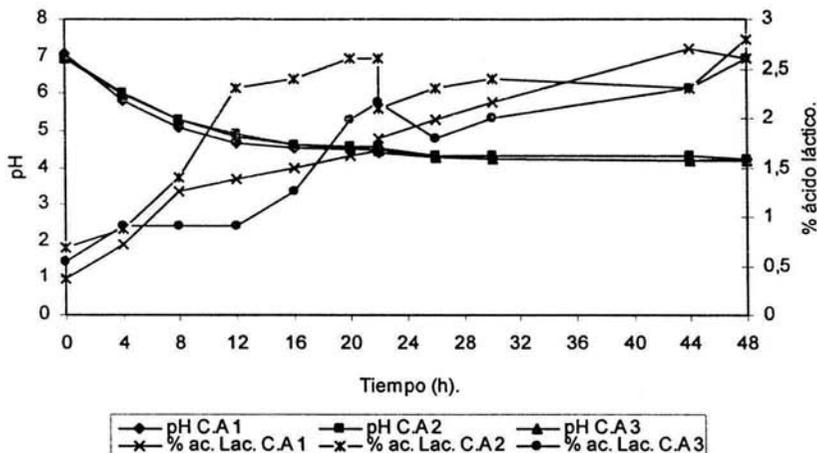


Fig. 24. Valores obtenidos para pH y de ácido láctico durante la fermentación de aguamiel por cultivo en lote alimentado a la 22 h.

En la tabla 6 se presentan los parámetros obtenidos para cada uno de los cultivos realizados para incrementar la concentración de etanol. Como se puede observar, una concentración alta de azúcar al inicio de la fermentación no permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que la concentración de etanol que se obtiene es baja así como el rendimiento y la productividad. Si se lleva a cabo una fermentación con una alimentación a las 22 h, la concentración de etanol obtenida incrementa hasta en un 50% al cabo de las 48 horas; además después de realizarse la alimentación los rendimientos de biomasa bajan pero no los rendimientos de etanol. Estos se mantienen hasta el final de la fermentación, lo que nos indica que la fuente de carbono adicionada se emplea para la producción de etanol.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de los diferentes cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* con aguamiel.

Parámetros	Cultivo por lote	Cultivo A		Cultivo B		Cultivo C		Cultivo D		Cultivo E	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Etapas	1	48	48	22	48	22	48	22	48	22	48
Fermentación (h).	48	48	48	22	48	22	48	22	48	22	48
% sólidos inicial	9.2	9.8	14.6	9.0	8.8	9.0	9.6	8.8	8.6	8.8	8.6
Carbohidratos totales iniciales (g/l).	118.2	215	640	114.0	88.6	114.4	88.0	110	92.0	110	92.0
Carbohidratos totales residuales (g/l).	20	19	120.4	12.3	14	10.2	20	13	13	13	13
Biomasa (g/l).	74.7	85.6	48.8	52	53	56	59.7	55	52.8	55	52.8
Etanol (g/l).	62	66	49	64	108	56	98	51	95	51	95
Y _{X/S} (g/l).	0.604	0.41	0.093	0.56	0.07	0.51	0.08	0.58	0.08	0.58	0.08
Y _{P/S} (g/l).	0.54	0.32	0.089	0.50	0.52	0.60	0.55	0.56	0.52	0.56	0.52
μ (h ⁻¹).	0.157	0.185	0.345	0.35	0	0.3	0	0.31	0	0.31	0
Productividad total (g/h).	1.29	1.37	1.02	2.3	2.3	2.5	2.4	2.5	2.4	2.5	2.4

- Cultivo A . cultivo en lote con ajuste de sólidos a 10 °B.
- Cultivo B. cultivo en lote con ajuste de sólidos a 15 °B.
- Cultivo C. cultivo en lote alimentado a las 22 h con azúcar invertido, aguamiel de la Delegación Milpa alta.
- Cultivo D y E. cultivo en lote alimentado a las 22 h con azúcar invertido, aguamiel de Tlaxcala.

7. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo para incrementar la producción de etanol durante la fermentación de aguamiel por *Saccharomyces cerevisiae* se concluye que:

- La mejor producción de biomasa obtenida para la preparación del inóculo se obtuvo en el matraz de 1 litro con un volumen de 300 ml de aguamiel y agitación (200 rpm); de acuerdo con la fase exponencial obtenida, el tiempo de fermentación para el inóculo fue de 22 horas, tiempo en el cual las células están metabólicamente activas.
- La producción de biomasa se aumenta con oxígeno y agitación.
- Un pH bajo en el aguamiel (4.0) no inhibe la producción de biomasa, sólo la retrasa, comparada con un aguamiel con un pH de 7.0
- Azúcar invertido fue la fuente de carbono con la cual se logró obtener un mayor incremento en la concentración de etanol durante la fermentación por cultivo en lote alimentado.
- Altas concentraciones de azúcar reprimen el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.
- El empleo de un cultivo en lote alimentado aumentó la productividad de 1.29 a 2.5 así como la concentración de etanol de 60 g/l a 9.6 g/l con respecto a la fermentación de aguamiel por cultivo en lote.
- Después de la alimentación la velocidad específica de crecimiento $\mu = 0$, lo que nos indica que la fuente de carbono se está destinando a la producción de etanol.

- A pesar de que se utilizó aguamiel de diferentes localidades, los cuales presentaban diferentes características (principalmente en la concentración de azúcar), se logró obtener reproducibilidad en cuanto a la producción de biomasa, así como en la producción de etanol.
- Se desarrolló un proceso reproducible para la obtención de una concentración alta de etanol a partir de aguamiel fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*.

8. APENDICES.

Apéndice 1.

Tabla 4. Orden de la adición de los reactivos para la determinación de etanol.

Pipetear dentro de celdas	Blanco	Muestra
Solución 1	1.5000 ml	1.5000 ml
Agua destilada	0.0500 ml	-
Solución muestra	-	0.0500 ml
*Mezclar, leer absorbancias de las soluciones después de 3 min (A ₁). Empezar la reacción por adición de :		
Suspensión 2	0.0250 ml	0.0250 ml
*Mezclar, esperar el final de la reacción (5-10 min) y leer las absorbancias de las soluciones (A ₂).		

*Agitar con una espátula de plástico o con movimientos suaves después de tapar las celdas. Es necesario tapar las celdas durante las mediciones (p.e. parafilm).

Solución 1: Buffer de difosfato de potasio, NAD y Aldéido-deshidrogenasa.

Suspensión 2: Alcohol-deshidrogenasa.

El análisis se realizó en celdas de cuarzo de 3 ml con un paso de luz de 1cm. El equipo utilizado (Spectronic Genesys 5, Thermo-spectronic) se calibró con una celda con agua destilada.

Para calcular la concentración de etanol se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 100} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = Volumen final (ml)

v = Volumen de la muestra (ml)

MW = Peso molecular del etanol (g/mol)

d = paso de luz (cm)

ϵ = Coeficiente de extinción de NADH A 340 nm (6.3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

Si la muestra fue diluida durante la preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución.

Apéndice 2.

Tabla 5. Orden de la adición de reactivos para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa.

Pipetear dentro de celda de	Blanco de sacarosa de	Muestra de sacarosa de	Blanco de D-glucosa y D-fructosa.	Muestra de d-glucosa y D-fructosa.
Solución 1	0.100 ml	0.100 ml	---	---
Solución muestra	---	0.050 ml	---	0.050 ml
Mezclar*, incubar por 15 min. a 20-25°C				
Solución 2	0.500 ml	0.500 ml	0.500 ml	0.500 ml
Agua destilada	0.900 ml	0.850 ml	1.000 ml	0.950 ml
Mezclar, leer absorbancias de las soluciones después aprox. 3 min. (A ₁). Empezar la reacción por adición de:				
Suspensión 3	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
Mezclar, esperar el termino de la reacción (aprox. 10-15 min.) y leer absorbancias de las soluciones (A ₂). Adición de:				
Suspensión 4	---	---	0.010 ml	0.010 ml
Mezclar, leer absorbancias de las soluciones después de 10-15min. (A ₃).				

*Agitar con una espátula de plástico o con movimientos suaves después de tapar las celdas.

Es necesario tapar las celdas durante las mediciones (p.e. parafilm).

Solución 1: Buffer de citratos a pH= 4.6, β -fructosidasa.

Solución 2: Buffer de trietanolamina pH=7.6, NADP, ATP.

Suspensión 3: hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Suspensión 4: fosfoglucosa isomerasa.

** Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado.

Se tomaron muestras cada 4 horas y se realizan las mismas determinaciones que para las fermentaciones anteriores.

Apéndice 3.

MEDIO DE CULTIVO GELPA.

Glucosa	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Peptona bacteriológica	1 g
Agar	2 g
Agua destilada	100 ml.

9.- BIBLIOGRAFIA.

- * Abate C., Dalleri D., Rodríguez E. (1996). Ethanol production by a mixture culture of flocculents strains of *Zimomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotecnol. 45: 580-83.
- * Anderson and Jackson (1968). Essential aminoacids in microbial proteins. Applied Microbiology. 6: 369-72.
- * Anónimo. Comercio exterior (1982). El maguey y el pulque. Industria Alimentaria 4: 10-29.
- * Bailey J., and Ollas (1977). Biochemical engineering fundamentals. Mc Graw book Hill Co. U.S.A.
- * Barnett J., Payne R. and Yarrow D. (1977). Aguide to identifying and classifying yeast. Cambridge University Press, London.
- * Blomberg, L. (2000). Tequila, mezcal y pulque. Cap. 1, Edit. Diana. Mex. D.F. Pág. 15-19 y 35-44.
- * Cravioto René O., Guillermo Massieu, Jesús Guzman . Composición de alimentos mexicanos. Intituto nacional de nutrición 1952-58. 5: 129-155.
- * Cravioto René, Massieu (1962). Aspecto metabólico de las levaduras del pulque. Escuela Nacional de Ciencia Químicas. Mex. D.F. pág. 11- 16.
- * Dabba R., (1970). Protein from microorganisms. Food Technology. 25: 659.
- * Demian, Arnold L. (1985). Biology of industrial microorganisms. Cap. 9 Ed. The Benjamin/ Cumming Publishing Co. INC. pág. 261-285.
- * Del Río, E. (1977). Microbiología del pulque. Ciencia. Nos. 4 y 5: 121.
- * De Moss R., Bard C. and Gunsalis I. The Mechanism of the heteroloctic fermentation: A new route of ethanol formation. Jour. Bact. 62: 499-511.
- * De Moss R., and Gibbs M. Mechanisms of ethanol formation by *Pseudomonas lindneri*. Bacteriol. Proc. 1952.
- * Dirección general de Normas. Depto. de normalización. S.I.C. Bioquímica. Norma Oficial Mexicana para Aguamiel. Expediente 15/ V D.G.N. V-22- 1972.
- Doelle H. Bacterial Metabolism. Second Edition. Academia Press. Londres 1980.
- * Dolley Charles. Notes on maguey sap and aguamiel, a therapeutic agent of high value. Therapeutic Gazette.

- * Espín P. Aspectos generales de la obtención de la proteína forrajera por el proceso de melazas-amoniaco. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM. 1982.
- * FAO (1983). Informe alimentario mundial. Roma, Italia.
- * García Garibay, Mariano (1993). Producción de alcohol de *Zymomonas mobilis*. Biotecnología alimentaria. Cap. 19. Editorial Limusa, México D.F. pág. 617-32.
- * Gibbs Martin Y Ralph D. Moss. Anaerobic dissimilation of C¹⁴ labeled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. The journal of biological 207: 689-94.
- *Goltschalk G. Bacterial metabolism. Springer. New York, 1977.
- *Gonçalves de Lima O., Larios C. y Azcarate E. Aislamiento y estudio de nuevas cepas de *Pseudomonas lindneri* en aguamieles de la meseta central mexicana. Ciencia XI (10-12): 273-77. México 1972).
- *Gonçalves de Lima O., Larios C. Aislamiento y propiedades antagonista de *Pseudomonas lindneri* UNAM. Congreso científico mexicano. México. 1971.
- * Gonçalves de Lima O. El maguey y el pulque en los códigos mexicanos. Fondo de cultura económica. Segunda edición. México 1978.
- * Hartwell L., and Culotti J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science. 183: 46.
- * Herrera T. y Ulloa M. (1975). Reconsideraciones sobre dos trabajos anteriores para la identificación de *Kluyveromyces fragilis* y *Candida Quilliermondii* en el pozol y el pulque. Bol. De la Soc. Mex. De micología. 9: 13.
- * Herrera T., Ulloa M and Tabeada M. (1980). Mexican indigenous fermented beverages. Sixth Internacional conference. Lagos Nigeria.
- * Hoblely T.J., Pamment. N. (1984). Differences in response of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* to change in intracelular athanol concentration. Biotechnol. Bioeng. 43: 155-58.
- * Krebs, H. (1972). The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. Essays. Biochem. 8: 2.
- * Lappe, Patricia; Wachter, Ma del Carmen (1993). Microbiología del pulque. Alimentos fermentados indígenas de México, cap. 3, Cd. Universitaria, México. D.F. pág. 76-78.

- * Lappe, Patricia; Ulloa, Miguel. Estudio de cinco especies de levaduras de pulque y comparación de la microbiota de esta bebida con la de otras semejantes del mundo. *Anales Inst. Biol. UNAM*. 1989. pág. 31-48.
- * Leningher, A. (1979). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ed. Omega. 2da. Edición. Barcelona España.
- * Levine, D.W. and Cooney ,C.L. (1973). Isolation and characterization of a thermotolerant methanol utilizing yeast. *Appl. Microbiol.* 26: 982.
- * Lindner Paul. La importancia práctica y científica del estudio del pulque. *Revista mexicana de biología*. México 1956.
- * Lobato J. Estudio químico industrial de los varios productos del maguey mexicano y análisis químico del aguamiel y del pulque. *Tip. Dela Sría. Fom.* México 1884.
- * Loyola Montemayor Elías. La industria del pulque. Banco de México, S.A. Depto. De investigaciones industriales. México 1976.
- * Macedo Miguel. Manual del magueyero. Ediciones agrícolas TRCCO. México 1950.
- * Madinaveitia A. y Orozco D. Estudio químico del agave, *Eigth Am. Scient. Congr. Proc.* 7: 177-184, (1942).
- * Niels, A. W. (1981). *Yeast cell envelopes: Biochemistry and ultrastructure*. C.R.C. Press. Vol. 1.
- * Otero, M; Bernal, G y Almaza, A. (1981). La proteína unicelular. Fuentes de carbono y energía utilizadas. *Revista de la asociación de técnicos azucareros*. Vol. 40 No. 1: 8.
- * Phaff, H.J.; Niller, M.W. (1978). *The life of yeast*. Harvard university press. London. 2 Edition.
- * Prince and Barford. Continuous tower fermentation for power athanol production. The University of Sydney, 1996 Australia. Pág. 263-265.
- * Quintero, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones*. Edit. Alambra. Primera edición. México.
- * Río Estrada Carlos. *Microbiología del pulque*. *Ciencia* (4-5): 121-126. México 1947.
- * Ruíz Oronoz Manuel. Nota acerca de la microbiología del aguamiel. México, 1976.

- * Russel, I and Graham, S. Osmotic pressure effect and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. Ontario Canada. Journal of industrial microbiology, 1988 pág. 365-72.
- * Sánchez- Marroquín, A. (1976). Estudios sobre la microbiología del pulque. Elaboración de las bebidas mediante cultivos puros, en plantas piloto. Rev. Latinoamericana de microbiología y parasitología, 9: 83.
- * Sánchez- Marroquín, A. (1970). Investigaciones realizadas en la facultad de química de la UNAM tendientes a la industrialización del agave. Revista de la sociedad química de México. 14: 184.
- * Ulloa Miguel, Herrera Teófilo (1982). Estudio actual del conocimiento sobre la microbiología de las bebidas fermentadas indígenas de México. Inst. Biol. UNAM. D.F., pág 145, 152-4.
- * Valero, Eva; Millan, Carmen and Ortega José. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in *Saccharomyces cerevisiae* in enological fermentations. Department of microbiology, Faculty of science, University of Cordoba Spain, 2001, vol. 9: 33-38.