



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

217

24

SELECCION Y CONSERVACION DE  
UNA VARIEDAD DE  
*Saccharomyces cerevisiae*  
PARA PRODUCCION DE ETANOL EN  
UN INGENIO AZUCARERO

T E S I S

Que para obtener el titulo de

B I O L O G O

P r e s e n t a

Marcia Minerva Villarreal Hernández

México 1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

---

# INDICE

---

- ▣ 1.0 Introducción
- ▣ 1.1 Objetivo
- ▣ 2.0 Causas y origen
- ▣ 2.1 Antecedentes históricos
- ▣ 2.2 Teoría de la fermentación
- ▣ 2.3 La caña de azúcar y los Ingenios Azucareros en México
- ▣ 2.4 Planteamiento del problema
- ▣ 3.0 Definición de conceptos
- ▣ 3.1 Glucólisis y Fermentación alcohólica
- ▣ 3.2 Antecedentes de la Glucólisis
- ▣ 3.3 Fermentación Alcohólica
- ▣ 3.4 Posición Taxonómica de la Levadura
- ▣ 4.0 Diseño Experimental
- ▣ 4.1 Material y Métodos
- ▣ 4.2 Aislamiento
- ▣ 4.2 Crecimiento de Levaduras
- ▣ 4.2.1 Rehidratación de Cepas
- ▣ 4.2.2 Aislamiento de la Cepa del Ingenio Azucarero
- ▣ 4.2.3 Producción de etanol

- ▣ 4.3 **Determinación del Consumo de Glucosa**
  - ▣ 4.3.1 **Técnica del DNS**
  - ▣ 4.3.2 **Curva Patrón Estándar de DNS**
- ▣ 4.4 **Producción de Etanol**
  - ▣ 4.4.1 **Fermentación Alcohólica**
  - ▣ 4.4.2 **Determinación de Etanol**
- ▣ 4.5 **Experimento con melazas**
- ▣ 5.0 **Análisis Gráfico de los Datos Experimentales**
  - ▣ 5.1 **Resultados**
  - ▣ 5.2 **Tablas de resultados**
  - ▣ 5.3 **Gráficas**
- ▣ 6.0 **Conclusiones y recomendaciones**
  - ▣ 6.1 **Conclusiones**
  - ▣ 6.2 **Recomendaciones**
- ▣ 7.0 **Apéndices**
- ▣ 8.0 **Bibliografía**

---

# **1. INTRODUCCION**

---

## **1.1 OBJETIVO**

## 1. INTRODUCCION

La alternativa más importante para aprovechar mieles incristalizables, que son un producto de desecho de los ingenios azucareros, es la producción de etanol por fermentación con levaduras.

Contar con una infraestructura para controlar, conservar y propagar las cepas utilizadas en dicha fermentación es una necesidad para la industria que trabaja con ellas. Las industrias que no poseen un laboratorio microbiológico necesitan los servicios de laboratorios particulares ó los servicios que prestan instituciones como la UNAM, para seleccionar el microorganismo más adecuado, optimizar las condiciones del proceso y conservar la cepa.

Por otro lado muchas de estas industrias que no tienen laboratorio, tampoco pueden hacer el reciclaje de la levadura una vez terminado el proceso, lo cual aumenta gastos de producción y en muchos casos la contaminación ambiental.

La Facultad de Química de la UNAM al vincularse con el sector productivo en trabajos como éste, contribuye a solucionar coordinadamente, importantes problemas como son:

- Contaminación del agua por eliminación de la biomasa
- Pérdida de la levadura generada durante el proceso
- Pago de divisas por la importación de cepas
- Baja productividad de los microorganismos

La conversión microbiana de azúcares a etanol es una de las más antiguas aplicaciones de la biotecnología. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido y es actualmente el organismo primordialmente utilizado para la producción de etanol.

La producción total, a nivel mundial, es aproximadamente de 3.2 millones de litros anual; tres cuartas partes de esta producción utiliza la misma técnica que se empleaba durante la época de los 40's. (41)

La fermentación es un proceso de degradación anaerobio de la glucosa donde el aceptor final de electrones es un metabolito derivado del propio sustrato: en este caso el acetaldehído que se reduce a etanol.

Los ingenios azucareros paraestatales adquieren la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de importación. Esta cepa se compra liofilizada y con ella se prepara el inóculo para los fermentadores; sin embargo el rendimiento de etanol de la cepa del ingenio azucarero, con las condiciones de operación empleadas es bajo: del 7 al 8 %; por esta razón se estudian comparativamente cuatro cepas diferentes, para elegir la que dé mejores resultados.

**TABLA 1 : CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS  
UTILIZADAS DURANTE EL EXPERIMENTO.**

C-1 FOUNAM	Donado por el Departamento de la Facultad de Química de la UNAM, con un rendimiento experimental reportado de 11.36% de etanol (11).
C-8 FOUNAM	Donado por el Departamento de la Facultad de Química de la UNAM, con un rendimiento experimental reportado de 10.36% de etanol (11).
ATCC-4753	Donado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, está reportada como productora de Etanol resistente a las altas temperaturas (3).
INGENIO	Que es la que actualmente se utiliza en el Ingenio Azucarero en San Luis Potosí; tiene un rendimiento operacional reportado del 7% al 8%.

---

**1.1 OBJETIVO : EVALUAR LA PRODUCCION DE ETANOL POR DIFERENTES CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* Y SELECCIONAR LA MAS ADECUADA PARA SU USO EN UN INGENIO AZUCARERO**

---



---

## **2.0 CAUSAS Y ORIGEN**

---

- 2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA  
FERMENTACION**
- 2.2 TEORIA DE LA FERMENTACION.**
- 2.3 LA CAÑA DE AZUCAR Y LOS INGENIOS  
AZUCAREROS EN MEXICO**
- 2.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## 2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

Dentro de las principales tecnologías tradicionales se encuentra la de la fermentación, alcohólica considerada como la más antigua de las actuales biotecnologías. Los sumerios utilizaron la levadura hace más de 7000 años.

El cultivo de vid y la preparación de vino eran ya conocidos por los habitantes de Mesopotamia en los años de 3500 - 2500 antes de la era cristiana. La fabricación de cerveza de cebada y trigo era conocida en Mesopotamia en los años de 1500 - 1000 a.c. La utilización de la levadura de cerveza para el pan, además de la fermentación de dátiles para obtener una bebida alcohólica, eran prácticas comunes como se observa en pinturas murales (13).

La introducción de la vitivinicultura en Egipto fue un legado del pueblo mesopotámico. Las técnicas para producir cerveza fueron usadas por los babilonios, el pan elaborado con levadura era utilizado como pago de una parte del salario para los empleados (13). Los egipcios consideraban que la levadura tenía un poder terapéutico y la utilizaban para prevenir enfermedades estomacales (13).

Las antiguas culturas asociaron el poder de la levadura con el poder de la vida, el pan y el vino constituyen el símbolo de la vida eterna en las religiones del mediterráneo; el burbujeo que se desarrolla espontáneamente en el mosto y en la masa de la harina les parecía como la manifestación de algún espíritu vivo.

En 1577 Van Helmont notó que las fermentaciones daban lugar al desprendimiento de gases asfixiantes, los cuales eran denominados "espíritus silvestres"; varias personas habían perecido al respirar los gases cuya producción era atribuida a fantasmas o espíritus malignos (36).

La fermentación fue uno de los problemas favoritos de experimentación entre los alquimistas, que obtuvieron en base a estos experimentos gran parte de su lenguaje simbólico y de su ideología; los cambios que se suceden en el material que se fermenta eran para ellos el símbolo de fuerzas misteriosas que, a semejanza de la piedra filosofal, podrían convertir los metales viles en oro (13).

Anthony Van Leeuwenhoek fue el primero en observar las levaduras microscópicamente en 1680. Cagniard Latour, en 1837, demostró que la cerveza contenía cuerpos esféricos que se multiplicaban y los clasificó como vegetales. Schwann denominó a estos cuerpos "yeast", también son conocidos como "zuckerpilz" de donde derivó su nombre en "sugar fungus", hongos del azúcar, y de donde se les da el nombre a su género *Saccharomyces*.

La teoría celular o vitalicia de la fermentación fue atacada por Justo de Liebig (1803-1873) y por Juan Jacobo Berzelius (1779-1848) los cuales sostenían que la transformación del azúcar se realiza por medios químicos y no biológicos. La asociación de la levadura y el desarrollo de la ciencia bioquímica son dos caminos que están íntimamente entrelazados. Comenzando con los trabajos de Pasteur, seguidos por los descubrimientos

de los hermanos Buchner, que trabajaron en Alemania durante 1897, sobre extractos medicinales de la levadura; estos trabajos fueron el principio de una serie de estudios para determinar la naturaleza de las etapas en la fermentación de glucosa a etanol, bióxido de carbono, y otros productos (13).

La preparación de etanol puro mediante destilación de los vinos recios y del aguardiente se dió en el en el año de 1220; en 1747 Andes Berlines consigue extraer el azúcar de la remolacha. Franz Karl, químico alemán, estudia en 1788 un procedimiento industrial para la extracción de azúcar de la remolacha y en 1801 se obtiene una patente para producir alcohol concentrado por destilación.

Lavoisier, Gay-Lussac, y Dumas estudiaron la transformación del jugo de caña de azúcar en alcohol por los métodos de la química cuantitativa, ya que anteriormente la levadura era considerada como un compuesto químico. Realmente el uso de conceptos biológicos aplicados al medio con fines prácticos comenzó con el descubrimiento de la microbiología.

En el siglo XVIII Black estableció que el alcohol etílico y el bióxido de carbono eran los únicos productos formados del azúcar durante la fermentación. Lavoisier, en 1789, llevó a cabo estudios cuantitativos de la fermentación y mencionó que, además de los anteriores, otros productos eran obtenidos y a este conjunto de productos los denominó ácido acético (29).

Gay Lussac formuló la siguiente ecuación para mostrar la reacción del azúcar en la fermentación alcohólica.



Aunque se tiene conocimiento de la fermentación desde tiempos inmemoriales fue Louis Pasteur quien, por primera vez, estudió este proceso de una forma sistemática. En 1858 inició sus estudios sobre la fermentación alcohólica del azúcar, buscando la solución a problemas en la producción del vino que era -como hasta la fecha- uno de los principales productos en Francia.

Louis Pasteur fué el principal científico francés en cuyo trabajo se cimentó una buena parte de la Microbiología que se desarrolló en su país en este período; a raíz de sus trabajos afirmó que "toda fermentación es obra de un microbio especial" (13).

## 2.2 TEORIA DE LA FERMENTACION

En 1857 Pasteur introduce la teoría microbiana de la fermentación ante la Sociedad Científica de Lille; en diciembre del mismo año presenta a la Academia de Ciencias de París los principios de la fermentación alcohólica, en un documento en el que relata los experimentos mediante los cuales concluye que el cambio de los azúcares en alcohol y bióxido de carbono se debe fundamentalmente a la actividad de una levadura y que la fermentación está intrínsecamente relacionada con la vida de la levadura.

En 1860 la Academia de Ciencias concede a Pasteur el premio de fisiología experimental, en reconocimiento a sus estudios sobre fermentación. Entre los años de 1860 y 1865 se encuentran en sus libros de notas, apuntes sobre la vida sin aire.

De 1871 a 1876 Francia perdía lentamente su dirección intelectual debido a la negligencia con la que el país trataba a las instituciones de educación superior, mientras tanto Pasteur seguía realizando estudios sobre el vino y la cerveza lo cual le llevó a ver que las levaduras formaban un pequeño mundo de unidad bioquímica y que las fermentaciones son manifestaciones de vida. Louis Pasteur comenzó sus estudios sobre fermentación de remolacha azucarera en el año de 1875.

Pasteur estableció por primera vez que además de los dos catabolitos clásicos conocidos como etanol y bióxido de carbono, se producen otras sustancias como glicerina, ácido succínico, y alcohol amílico. El que se encontraran otros subproductos hacía pensar que la fermentación no era un proceso tan fácil como se habían imaginado.

Uno de los principales problemas que enfrentaba Pasteur era el lento desarrollo de la levadura en un medio que contenía azúcar, amoníaco y algunas sales minerales. Lo resolvió cuando tuvo la idea de agregar al medio levadura incinerada, que proporcionó a la levadura sales de ácido fosfórico, potasio, magnesio, y hierro. La levadura en otros medios crecía muy lentamente por que tenía que sintetizar todos los constituyentes celulares en lugar de disponer de ellos en el medio.

Pasteur creó palabras como aerobio y anaerobio para designar a la vida en presencia y ausencia de aire. El 25 de febrero de 1861 señaló, por primera vez, la existencia de organismos anaerobios y sugirió al mismo tiempo una relación causal entre la vida sin aire y la fermentación.

El 12 de abril 1861, manifestó ante la Sociedad Química que la levadura fermenta mejor en ausencia de aire mientras que crece más abundantemente en su presencia; en ausencia de aire la cantidad total de azúcar transformada en bióxido de carbono y alcohol por unidad de levadura era extremadamente alta; eran suficientes 0.5 a 0.7 gramos de levadura para transformar 100 gramos de azúcar en alcohol.

Pasteur postuló en 1861 que la fermentación era el método usado por la levadura para obtener energía del azúcar bajo condiciones anaerobias. En presencia de oxígeno la energía necesaria para el desarrollo procede de la oxidación completa de los azúcares; durante la fermentación (en ausencia de oxígeno) la energía proviene de la descomposición

parcial de la materia fermentable.

En 1857 Buchner extrajo de la levadura una fracción soluble que llamo zimasa y la cual tenía la capacidad de convertir el azúcar en alcohol, aún en ausencia de levaduras vivas. Este descubrimiento de Buchner creó una nueva era en el estudio de la fermentación alcohólica, ya que sirvió de punto de partida para el análisis de los fenómenos fisiológicos (13).

Los métodos para concentrar las bebidas espirituosas (llamadas así por que en este líquido se originan movimientos al desprender bióxido de carbono y se pensó que los espíritus eran los causantes de este fenómeno) han sido conocidas desde hace tiempo por los egipcios. La comercialización de levaduras especiales seleccionadas para la preparación de bebidas alcohólicas que anteceden la destilación, data de cerca de la presente centuria.

Los licores destilados son bebidas alcohólicas en donde la concentración de alcohol etílico ha sido incrementada de la fermentación original.

El principio de la destilación alcohólica se basa en la diferencia entre el punto de ebullición del etanol (78.3° C a una atmósfera de presión) y el punto de ebullición del agua (100 ° C a una atmósfera de presión). El alcohol puede vaporizar del líquido original, formándose un azeótropo, que a su vez puede ser purificado con la introducción de un tercero (como por ejemplo benceno).

Los chinos destilaron bebidas de arroz 800 años antes de Cristo; en la India se destiló a partir de la caña de azúcar. Los árabes desarrollaron un método de destilación utilizado para producir destilados del vino.

La producción de licores destilados fue reportada en Gran Bretaña antes de la conquista romana. Las técnicas de trabajar el metal aceleraron el desarrollo de las operaciones de destilación.

En México, en los ingenios azucareros se produce aguardiente como bebida destilada o alcohol puro 96% para uso industrial.

En los ingenios azucareros se usan las melazas o mieles incristalizables, que son el residuo de la obtención de azúcar, para producir etanol mediante una fermentación alcohólica que dura entre 48 y 96 horas.

El uso de una cepa vigorosa de levadura, con una alta tolerancia alcohólica y capacidad para producir un gran rendimiento de etanol es de gran beneficio para estas industrias.

Las melazas son ajustadas a una concentración de azúcares adecuada, por la adición de agua y a un pH óptimo por la adición de ácido.

El mosto obtenido de la fermentación se somete a destilaciones para concentrarlo y obtener aguardiente o alcohol puro de 96 %.

## 23 LA CAÑA DE AZÚCAR Y LOS INGENIOS AZUCAREROS EN MÉXICO

En México los ingenios obtienen sacarosa de la caña de azúcar y utilizan los sub-productos conocidos como melazas o mieles incristalizables para obtener etanol por fermentación.

La caña de azúcar es monocotiledónea, la mayoría de las especies muy frecuentemente son anuales, sus tallos presentan estolones con entrenudos de donde se originan las hojas planas, alargadas y angostas muy características por su enrollamiento alrededor del tallo al secar, sus flores son hermafroditas dispuestas en espiguillas.

La rigidez de los tallos se debe a la particular afinidad que tienen estas plantas por el sílice, el cual al penetrar con la savia se solidifica luego en las paredes de las células externas formando en los entrenudos zonas muy duras. La savia de esta gramínea contiene elevadas cantidades de azúcar en disolución lo cual la convierte en una planta ideal para que de ella se extraiga con ventaja dicho carbohidrato.

La presencia de elevadas cantidades de azúcar determina la fermentación dando como resultado diversos líquidos de naturaleza alcohólica contando entre los principales el aguardiente y el ron de caña de azúcar.

El nombre del género *Saccharum* proviene del sanscrito *sakkara* que significa azúcar, Linneo clasificó como *Saccharum officinarum* a esta planta (10). En el corte transversal de una caña se pueden distinguir dos partes esenciales:

### i) Una corteza exterior muy resistente

Formada por una espesa epidermis recubierta de cutícula sólida tapizada por una cubierta de cera impermeable al agua y acompañada de células de paredes más gruesas. La cutícula impide la evaporación y protege las paredes suaves del interior. Una capa formada por células resistentes da consistencia y rigidez al tallo.

Estas células van perdiendo su compactación de acuerdo a su posición con respecto al centro del vegetal (36).

### ii) Una masa de tejido suave en el interior

Ya que las células resistentes van perdiendo, gradualmente la rigidez de sus paredes se transforman en células que sirven para el depósito de jugo azucarado de caña (36).

En raras ocasiones la caña de azúcar produce semillas fértiles; algunas variedades nunca florecen y otras lo hacen solo en los trópicos. La reproducción se lleva a cabo de manera asexual en forma de estacas, ya que este es el método agrícola de propagar la caña de azúcar. Otro método utilizado es el de reproducción por yemas seleccionadas, separando y multiplicando los tallos obtenidos por reproducción sexual que presentan peculiaridades especialmente útiles, fijando así esta característica en nuevos brotes (36).

En la composición de la caña de azúcar según el análisis citado por Ruiz de Velazco (36) se mencionan los componentes que aparecen en la Tabla 2.

TABLA 2.

MATERIA RESINOSA	0.35
MATERIA NITROGENADA	0.55
SACAROSA	18.02
CEBADA	0.46
FIBRA	9.56
AGUA	71.04
TOTAL	100.00

Los porcentajes varían considerablemente con las variedades, países, tipo de suelo, fertilizantes utilizados, etc. La caña criolla es la variedad que Hernán Cortés trajo a México; es la más antigua y la que más se cultiva en el país, posee un jugo abundante (36).

Una de las más importantes industrias en nuestro país lo constituye la industria azucarera. Esta industria en sus inicios utilizó un procedimiento empírico y fundamental, consistía en cortar en trozos la caña y colocarla en morteros. El jugo extraído de la gramínea por presión a base de fuerza animal, se hervía en calderas hasta su concentración y esto era todo. Actualmente la tecnología en la extracción de azúcares nos ofrece mucha ventaja sobre estas primitivas industrias (36).

Existen razones para pensar que la caña de azúcar existía con anterioridad de la llegada de Cortés; en la obra "*Historia Plantarum Nova Spania*" de Don Francisco Jiménez se mencionan. Por otra parte Juan de Lery comenta también sobre las cañas de azúcar que se encuentran en las márgenes del Río de Janeiro (36).

Las primeras etapas de la vida de la caña de azúcar en nuestro país guardan estrecha relación con acontecimientos históricos. El primer lugar donde se cultivó, fue en el estado de Veracruz en el pueblo de San Andrés Tuxtla, (actualmente conocido como Juan de la Luz Enríquez) por mandato de Hernán Cortés; de allí se llevó para sembrar en Morelos, Guerrero y la capital; los terrenos circunvecinos de la casa de Hernán Cortés en Coyoacán fueron elegidos para el cultivo la caña de azúcar, la variedad de *Saccharum officinarum* utilizada fue la criolla. Coyoacán es por lo tanto el segundo lugar de la República en donde se ensayó el cultivo de esta gramínea (36).

Una vez instalado el cultivo, los ingenios comenzaron a proliferar, el ingenio de Buenavista fue un centro de producción de grandes cantidades de mieles y alcoholes. En las fincas azucareras del sur se producían grandes cantidades de aguardiente. La primera transformación del procedimiento industrial de elaboración del alcohol a base de fermentación espontánea se conoció en el estado de Morelos, bajo la supervisión del químico francés Mañe y de Ramón Díez de Sollano.

Cuernavaca está considerada como el primer centro azucarero del país. Dentro de las fábricas de alcohol era bien conocida la de Chalmita en el Estado de México; otra de las fincas bien conocidas fue la Hacienda del Puente la cual se distinguió de las demás fincas azucareras por que así como la Hacienda de San José Vista Hermosa fueron las únicas que en lugar de manufacturar azúcar manufacturaban alcohol de 96, fermentando directamente todo el guarapo que producían (36).

Con el tipo de extracción que se poseía en la época de la conquista se obtenía un 60% de miel y un 40% de azúcar. La cifra fue poco después modificada hacia el 33% de miel y 66% de azúcar. Uno de los pasos seguidos para la obtención de azúcar es la defecación que consiste en separar el guarapo de las materias solubles o insolubles que tienen en suspensión o en disolución y que, por su naturaleza son perjudiciales tanto para la calidad del azúcar como para su cristalización. Una vez que el guarapo fue defecado pasa a la evaporación del agua la que se efectúa por medio de calor, el líquido se mantiene en constante ebullición, mientras más rápido se evapore el agua más miel se tendrá. Las haciendas en el periodo colonial fueron fábricas de miel principalmente (36).

Durante varias centurias en México, el principal material elaborado eran las mieles, las cuales en algunos casos, eran utilizadas para transformarlas en aguardiente considerado de gran importancia en la vida económica e industrial.

El alcohol se obtenía en calderos de cobre con fondo de lámina gruesa también de cobre y con forma ligeramente cónica, en la parte superior se encontraba un recipiente condensador de vapor por el que circulaba el agua fría en conexión con un serpentín sumergido también en el mismo líquido. Estos calderos eran denominados alambiques. Una vez perfeccionadas las máquinas de vapor fueron empleadas en los ingenios azucareros, así el mascabado que era utilizado para la exportación se comenzó a manufacturar con aparatos de vapor. También se comenzó a instalar la energía eléctrica, se perfeccionaron las formas de la defecación y se introdujo el uso de filtros de arena. Desafortunadamente en esta época de la historia de los ingenios azucareros todas las fincas pusieron en práctica los hornos de quemar bagazo verde (36). Las fincas azucareras que produjeron la caña en los estados de la República se pueden separar en tres grupos:

- a) Las que fundaron la industria azucarera y de las cuales actualmente solo quedan ruinas.
- b) Las que pudieron continuar a pesar de las revueltas internas en el país y siguen produciendo hasta hoy.
- c) Las que han surgido después de las revueltas internas del país, o que ya existiendo con anterioridad han logrado aumentar su productividad.

Los ingenios que continuaron sus actividades durante la revolución en el estado de San Luis Potosí fueron; Agua Buena y Tamasopo (36).



### 3.1 GLUCOLISIS Y FERMENTACION ALCOHOLICA

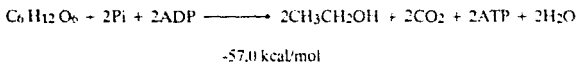
Como ya se mencionó, la glucosa es una molécula muy importante dentro de las reacciones metabólicas; es considerada un alimento universal, debido a que la mayor parte de los organismos la utilizan como combustible para el metabolismo; en términos químicos la glucosa es considerada un carbohidrato, del grupo de los monosacáridos los cuales están definidos como aldehídos y cetonas polihidroxiados. Todos los monosacáridos simples tienen la fórmula de  $(CH_2O)_n$ . Los monosacáridos se clasifican en dos tipos, aldehídicos y cetónicos, por convención llevan la nomenclatura cuya terminación es -osa (32).

Cuando en el metabolismo se degrada la glucosa, se produce una cantidad de energía. A este tipo de procesos degradativos en general se les conoce como catabolismo, pero dependiendo del tipo de organismo y sus condiciones de crecimiento la vía de la glucólisis puede seguir dos caminos diferentes, por ejemplo:

i) Uno de los caminos que sigue la glucólisis se manifiesta en los organismos que crecen bajo condiciones aerobias (con presencia de oxígeno), en este caso la principal ruta catabólica que sigue la glucosa es conocida como respiración, la que origina como productos finales dióxido de carbono y agua. La diferencia entre ambas para obtener energía se puede observar con los rendimientos netos para cada ecuación, de esta forma la oxidación completa en la respiración (8):

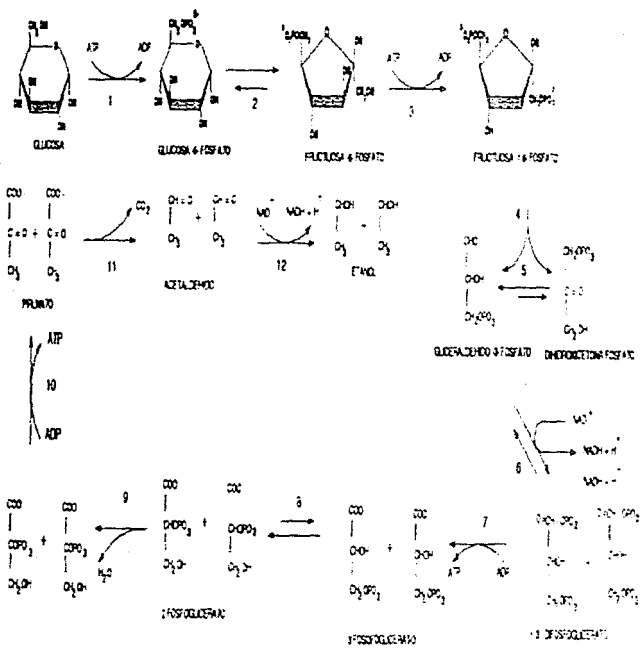


ii) En microorganismos que crecen bajo condiciones anaerobias (en ausencia de oxígeno), la principal ruta catabólica que produce energía mediante los azúcares es conocida como fermentación y origina como productos finales entre otros etanol, ácido láctico (lactato) y glicerol. La fermentación alcohólica es un proceso exclusivamente microbiano y la cantidad de energía que se obtiene mediante este proceso es menor que la que se obtiene en la respiración. El término fermentación, es muy general e involucra la degradación anaerobia del sustrato inicial así como la transferencia de los electrones a una molécula producida a partir del propio sustrato. (8)



# ESQUEMA 1.

## PROCESO DE LA GLUCOLISIS



### 3.2 ANTECEDENTES DE LA GLUCOLISIS

El descubrimiento de la ruta metabólica de la glucólisis fué el logro de diferentes investigadores en distintas épocas. Las primeras observaciones ocurrieron de una manera accidental; los hermanos Buchner en el año de 1897 descubrieron que un extracto obtenido de levaduras filtradas, libre de células era capaz de fermentar el azúcar en alcohol. Este fué el primer experimento en donde se realizó una función metabólica fuera de una célula, desafortunadamente este experimento pasó desapercibido hasta varios años después.

Los siguientes investigadores que experimentaron sobre la producción de etanol fueron Harden y Young a principios de siglo; en los años 1905 al 1910 ellos realizaron un estudio sobre la producción de alcohol usando como sustrato glucosa con extractos acelulares de levadura en ausencia de oxígeno; de este experimento se obtuvieron observaciones importantes; la primera, fue que el extracto podía separarse por diálisis en dos fracciones, uno sensible al calor y otro no, ninguno capaz de fermentar por si mismo al azúcar; la segunda observación importante fue, que la producción de alcohol podía restaurarse combinando ambas fracciones

Con el paso del tiempo y gracias a estudios realizados por O.Warburg y W.Christian, en 1928 se llegó a conocer que la fracción obtenida en el experimento que no era dializable y se descomponía con calor, estaba formada por las enzimas, y la fracción que si se podía dializar y que se mantenía estable al ser sometida al calor, estaba constituido por difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), y nicotinamida adenin dinucleotido ( $NADH^+$ ). Por estas observaciones dedujo que durante la glucólisis es muy importante el suministro de fosfato inorgánico así como de nucleótidos de adenina. Estos mismos investigadores descubrieron que la óxido-reducción y la fosforilación juegan papeles muy importantes dentro del metabolismo.

A partir de estos experimentos se inició una serie de análisis sobre las dos fracciones teniendo como consecuencia el descubrimiento de las enzimas que actúan en el proceso y los intermediarios que se forman durante la reacción.

Durante cerca de 15 años, de 1925 a 1940 Meyerhof, Embden, Parnas y Warburg estudiaron interrelaciones de diversos intermediarios aislando y caracterizando las enzimas implicadas en la glucólisis. Uno de los más importantes descubrimientos fue el de la enzima aldolasa por Meyerhof en el año de 1936, en honor de estos investigadores la vía glucolítica se conoce como vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). (8)

### 3.3 FERMENTACION ALCOHOLICA

La glucosa es la molécula de combustible más usada en el metabolismo; llega a ser degradada hasta piruvato y alcohol, por medio de la fermentación, la glucólisis es una de las partes más importantes del catabolismo. (4)

Los microorganismos pueden utilizar los carbohidratos siguiendo la ruta metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas.

En la glucólisis se efectúan principalmente reacciones de tipo óxido-reducción y fosforilación, cada una de las enzimas que participan, cataliza una reacción consecutiva que van desde glucosa a etanol (4).

En ausencia de un aceptor de electrones, las levaduras efectúan reacciones redox de los compuestos orgánicos que utilizan como sustratos, acompañados de la liberación de energía, a éste proceso se le denomina fermentación; la oxidación de los átomos de carbono sólo es parcial y en consecuencia solo una pequeña cantidad de energía se libera.

En la anaerobiosis no tenemos al oxígeno como aceptor último de los electrones, el metabolismo de la glucosa en estas condiciones produce un cúmulo de piruvato el cual puede ser transformado en acetaldehído y finalmente en etanol.

La energía que se produce en esta fermentación es de 57 kcal/mol una parte es conservada como enlaces fosfato de alta energía en el ATP con una producción neta de dos enlaces y el resto se libera como calor. Las enzimas utilizadas durante la fermentación alcohólica se muestran en la tabla 3

**TABLA 3: SUBSTRATOS Y ENZIMAS INVOLUCRADAS DURANTE LA GLUCOLISIS**

SUBSTRATO	ENZIMA
GLUCOSA	HEXOQUINASA
GLUCOSA 6 FOSFATO	FOSFOLUCOSOMERASA
FRUCTOSA 6 FOSFATO	FOSFOPRUCTOQUINASA
FRUCTOSA 1,6 DIFOSFATO	FRUCTOSA DIFOSFATO ALDOLASA
DICETONICERONA FOSFATO	TRIOXA-FOSFATO-ISOMERASA
GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO	GLICERALDEHIDO 3P-DESHIDROGENASA
1,3 DIFOSFOLICERATO	3 FOSFOLICERATO QUINASA
3 FOSFOLICERATO	FOSFOLICERATO QUINASA
2 FOSFOLICERATO	ENOILASA
FOFMOENOL PIRUVATO	PIRUVATO QUINASA
PIRUVATO	PIRUVATO DECARBOXILASA
ACETALDEHIDO	ALCOHOL DESHIDROGENASA

### 3.4 POSICION TAXONOMICA DE LA LEVADURA.

A lo largo del tiempo el hombre siempre ha intentado el darle una ubicación a las cosas, los seres vivos no fueron una excepción, de hecho desde Aristóteles se utilizó una clasificación basada en dos reinos a partir de los que tenían sangre y los que no; Linneo clasificó a los organismos en plantas si eran incapaces de moverse y animales si tenían esta capacidad; Cuvier por su parte denominó a los Protoctistas como todos aquellos organismos microscópicos y designó a los animales como los que se desarrollan a partir de un embrión.

Esta clasificación de dos reinos continuó durante mucho tiempo dado que no existía una necesidad de agrupar a organismos en otra parte; no fué sino hasta que Ernst Haeckel propuso la creación de un nuevo reino, cuando se dió un cambio sobresaliente, tanto en la forma de pensar como en la forma de agrupar organismos por parte de muchos científicos. El nuevo reino fue el Protista en el cual se distinguía la presencia de algas, bacterias; éste paso fué de fundamental importancia dado que suscitó el cuestionamiento relacionado con la legitimidad y veracidad de las tendencias filogénicas en esos momentos.

El estudio por resolver estas incógnitas dió cabida al siguiente eslabón en la cadena para la unificación de conceptos; este movimiento fue dado en principio por los avances tecnológicos; nuevos descubrimientos y la creación de técnicas bioquímicas y microscópicas facilitaron el estudio de diferencias estructurales a nivel bioquímico y microscópico en los organismos, lo cual impulsó muchas de las actuales obras sobre la clasificación (28).

### 3.5 CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO

#### *Saccharomyces cerevisiae*

Los ascomicetos son un grupo polifacético; entre ellos se encuentran hongos muy diversos y de importancia económica como las levaduras; cada uno de estos organismos es una célula con capacidad de llevar a cabo sus propios procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción; los hongos poseen un núcleo verdadero por lo que son considerados eucariotes. Las células al formar hifas pueden o no presentar septos de separación y no es raro el encontrar varios núcleos en ellas (28).

Aunque la evolución de los hongos no se ha aclarado todavía, es bien conocido que una de las más importantes ventajas de estos organismos es la de compartir características propias de bacterias como suelen ser, la velocidad de multiplicación y la simplicidad de exigencias nutritivas, con propiedades de organismos superiores por ejemplo la presencia de cromosomas dentro de un núcleo definido y el tamaño relativamente "grande"; aproximadamente 5 micras de diámetro lo cual facilita el trabajar con ellos (16).

*Saccharomyces* es un género de levadura del grupo de los Ascomycetes, éstos se diferencian de otros grupos por que tienen una estructura reproductiva que recibe el nombre de asca y se forma cuando se unen organismos sexualmente opuestos. La reproducción sexual no es muy característica de estos organismos; más bien se reproducen asexualmente por gemación y producen las esporas solo bajo condiciones especiales. Levadura es el término que se da a las formas de Ascomycetos que producen un talo predominantemente unicelular. Abundan en ambientes ricos en azúcares como néctares de flores, frutas, en la tierra, en vegetales; son organismos unicelulares con pared definida y una vacuola que ocupa gran parte de la célula. Cada célula mide 5 micras de diámetro aproximadamente y está rodeada por una membrana que secreta una pared rígida que cumple con la función de protegerla del medio ambiente.

En inglés la palabra levadura yeast proviene de la palabra gist del viejo francés y cuyo significado tiene que ver con la fuerza vital de todas las cosas. en el español levadura proviene del latín *levature* y *levare* cuyo significado es elevarse, subir, levantar, etc; en alemán se le designa con el nombre de *leben* cuyo significado es hirviendo. De manera similar las definiciones se refieren a la peculiar acción del burbujeo que se manifiesta en los líquidos fermentables (12).

Las levaduras pueden variar en su morfología, pueden ser esféricas, elipsoidales, ovoides, cilíndricas, en forma de limón, elongadas, entre otras. Las levaduras "silvestres" requieren de cierta humedad relativa para cumplir con su ciclo de vida. El crecimiento de levaduras en un medio diferente al natural, (por ejemplo en un medio de cultivo en agitación) puede dar como resultado la formación de un sedimento compacto o de una suspensión espesa o también la formación de una película en la parte superior del medio de

cultivo.

En la actualidad se asocia el término fermentación con el organismo *Saccharomyces cerevisiae*, las variedades difieren principalmente por su habilidad y capacidad para fermentar azúcares.

Las levaduras son heterótrofas, crecen muy bien generalmente a pH bajo, y con una temperatura que oscila entre los 0° y 45° C. La oxigenación estimula el crecimiento de todas la levaduras. la mayoría de las levaduras usan iones amonio en forma de nitratos o de aminoácidos, en cuanto a las vitaminas que utilizan, éstas son del grupo B, la biotina es la más común seguida por la rivo flavina.

FIGURA 1: IMAGEN MICROSCOPICA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.

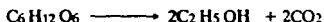


### 3.6 TAXONOMIA DE LA LEVADURA (27)

- Reino : *Fungi*  
Clase : *Ascomycotina*  
Subclase : *Hemiascomycetales*  
Orden : *Endomycetales*  
Familia : *Saccharomycetaceae*  
Subfamilia : *Saccharomycetoidaeae*  
Género : *Saccharomyces*  
Especie : *cerevisiae*

La producción de etanol por fermentación puede realizarse a partir de a) azúcares b) almidones c) material celulósico. En este caso se trata de una fermentación de azúcares, (glucosa) para la selección de la cepa; y glucosa y levulosa (fructosa) cuando se utilizan mieles incristalizables en el ingenio (33).

La fermentación sigue la ecuación general de:



Para un buen desarrollo de la fermentación es necesario: la eliminación del crecimiento bacteriano, el uso de una vigorosa cepa de levadura con una alta tolerancia al alcohol y el mantenimiento de condiciones anaeróbicas durante la fermentación.

La mayoría de las cepas de *Saccharomyces* son muy eficientes para metabolizar los azúcares. *Saccharomyces cerevisiae* fermenta todos los azúcares excepto lactosa y melibiosa. Algunas especies están adaptadas al crecimiento en altas concentraciones de azúcar, característica que se va seleccionando a través del cultivo continuo o condiciones ambientales.

La levadura utiliza del 70 al 75 % del total de azúcar consumido para la producción del ATP, del 10 al 20 % del azúcar es asimilado para formar las estructuras celulares y del 5 al 10% en el mantenimiento del potencial redox y otras funciones (25).



### 3.7 TOLERANCIA AL ETANOL

La actividad fermentativa de todos los microorganismos productores de etanol declina progresivamente en función de la tasa de fermentación, y de la acumulación de etanol en el medio. La inhibición por producto es uno de los factores que decrecienta la conversión de azúcares a etanol, incrementa el tiempo requerido para la conversión de sustrato y limita la concentración final. En los ingenios, el reactor de fermentación es una de las inversiones de capital más alto para la producción comercial de etanol, y el tamaño de este reactor, es usualmente el factor determinante de la producción; la reducción del tiempo requerido para completar la conversión de sustrato, puede incrementar substancialmente, la productividad (20).

Las levaduras de destilería son organismos que el hombre ha seleccionado por su alto rendimiento de etanol. La tolerancia al alcohol en primera instancia puede variar del 5% al 8% o hasta 11.6% (13).

La acumulación de etanol en el medio ambiente microbiano presenta una presión para la levadura; una alta concentración de alcohol en el medio puede ocasionar estragos parecidos a los que producen los niveles extremos de pH o temperatura. Los microorganismos que están adaptados a vivir en medio ambientes extremos han modificado muchas de sus enzimas y su membrana estructural, la cual no es parecida a la de organismos que viven en ambientes más moderados (20).

Los cambios en el tipo y cantidad de los ácidos grasos en respuesta al etanol, por parte de microorganismos fermentadores obligados, y la inhibición de crecimiento, parecen ser el resultado de procesos específicos en la membrana (20).

La tolerancia al etanol en *Saccharomyces cerevisiae* es controlada por un gran número de genes. (1, 21, 23, 24). Por esta razón es muy difícil el obtener levaduras mutantes resistentes al etanol. Los genes que limitan el crecimiento son diferentes dependiendo de la concentración de etanol lo cual indica que la cinética de inhibición de crecimiento por etanol es el resultado de la inhibición de diferentes funciones celulares al incrementarse la concentración de etanol; 14.2 % es la máxima concentración de etanol que permite crecimiento y fermentación (24).

La tolerancia de diferentes tipos de levadura depende también considerablemente del estado fisiológico en que se encuentre (19).

Los cambios evolutivos que presentan los microorganismos permiten seleccionar ciertas características, ya que sólo los microorganismos resistentes son los que pueden sobrevivir y reproducirse en ambientes extremos; el etanol induce cambios variables dependiendo del microorganismo (20).

Se han postulado dos tipos de hipótesis básicas para explicar el mecanismo de inhibición por alcohol en la fermentación.

1.- El primero involucra a la membrana celular

2.- El segundo involucra la inhibición de enzimas glucolíticas por el producto final (20).

La hipótesis de la inhibición del producto final y de enzimas "etanogénicas" no parece ser de importancia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos estudios han demostrado que estas enzimas son relativamente resistentes al etanol y son inhibidas sólo por concentraciones mucho más altas que las reportadas para la fermentación (29).

*Saccharomyces cerevisiae*, es muy adaptable a altas concentraciones de etanol e inclusive a algunas que exceden el nivel requerido para la inhibición del crecimiento de otros organismos tolerantes (cerca del 8 %). En levaduras resistentes al etanol es común ver una alteración en la cantidad y el tipo de ácidos grasos que contiene su membrana. Los cambios en la composición de lípidos en *S.cerevisiae* justifican la tolerancia al etanol; de tal manera que al aumentar la concentración de etanol se incrementa la proporción de ácido oléico en la membrana celular, de un 26 % hasta sobrepasar el 50 % del total de ácidos grasos que se encuentran en una célula; este incremento es acompañado por la correspondiente reducción de ácido palmítico. Este fenómeno en la membrana celular se observa en otros organismos que se enfrentan a condiciones similares por lo cual se presupone que el ácido oléico cumple un rol adaptativo (20).

Una comparación entre los cambios de membrana asociados con la tolerancia de etanol sobre varios organismos muestra una tendencia común en la evolución de la tolerancia al etanol. Dicha tendencia involucra un incremento en la cantidad de ácidos grasos insaturados acompañado por la disminución de ácidos grasos saturados formadores de la membrana (20).

Es muy posible que el mecanismo por el cual la levadura sobrevive a la concentración de etanol sea una consecuencia de los cambios estructurales en la composición de la membrana, ya que en la membrana normal el alcohol interactúa con ésta, decrementando sus niveles de organización y dando como resultado la formación de grietas. La acción del alcohol en la membrana puede ser clasificada en tres categorías según L.O. Ingram. (20)

1.- Interacción directa con la membrana

2.- Efectos dieléctricos

3.- Efectos coligativos

El alcohol es una molécula anfotérica y se encuentra constituida por una región hidrofílica y otra hidrofóbica la cual es atraída por zonas específicas de la membrana; por ello la presencia de etanol en la membrana tiende a aumentar la polaridad en el medio ambiente incrementando así su habilidad para solubilizar otras moléculas polares y decrementando la función de la membrana como barrera (20).

Una alta concentración de etanol causa un cambio dramático en las propiedades del medio de crecimiento y del citoplasma, puede romper el equilibrio de ionización presente en toda la célula y destruirla (20).

### 3.8 CARACTERISTICAS DE LAS MELAZAS

La agroindustria azucarera tiene una cantidad considerable de desechos orgánicos los cuales pueden ser utilizados para la producción de sustancias útiles con valor agregado; la melaza ha sido un sustrato utilizado para la producción de levaduras, alcohol y otros productos microbianos.

La composición de las melazas es muy variable y esto es razonable si pensamos que es el residuo de una gran cantidad de cañas las cuales provienen de zonas con diferentes tipos de suelos y por lo tanto, una diversidad de micronutrientes.

Aunque el porcentaje varía se tienen en general los componentes que se muestran en la tabla 4 (37)

Se estima que solo el 50% del fosfato es asimilado por la levadura.

**TABLA 4: COMPOSICION DE LAS MELAZAS**

COMPONENTES	MELAZA(%) EN PESO SECO
SOLIDOS TOTALES	78 - 85
AZUCAR TOTAL	50 - 58
CENIZA TOTAL	3.5 - 7.5
NITROGENO	0.08 - 0.05
CARBONO	28 - 33
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.01 - 0.04
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.001 - 0.04
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.009 - 0.07
SiO <sub>2</sub>	0.05 - 0.3
CaO	0.15 - 0.8
MgO	0.25 - 0.8
K <sub>2</sub> O	0.8 - 2.2

La siguiente tabla es comparativa para tres tipos de melaza provenientes de tres diferentes regiones (37):

TABLA 5: COMPOSICION DE MELAZAS  
POR REGIONES

REGIONES	1	2	3
AZUCAR TOTAL	56	75	66
NITROGENO	0.48-0.59	0.08-0.13	0.29-0.45
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.2-0.3	0.06-0.08	0.13-0.17

Los azúcares tampoco son los mismos ni en concentración ni en el tipo por ejemplo (37):

TABLA 6: PORCENTAJE DE AZUCARES  
Y OTROS COMPONENTES

COMPONENTES	PORCENTAJE
AZUCARES	19.6
AZUCAR INVERTIDA	21.2
SACAROSA	33.4
CENIZAS	9.0
AGUA	18.0

En la fermentación de las melazas de caña para la producción de alcohol intervienen varios factores para obtener un máximo rendimiento del azúcar presente en la solución fermentable. Algunos de estos factores son la temperatura de fermentación y suplementos alimenticios adecuados para un óptimo desarrollo del microorganismo. Uno de los más importantes factores en la solución fermentable de las melazas de caña es el pH: generalmente se utiliza ácido sulfúrico para ajustarlo a 4 ó 4.5 ya que generalmente las melazas son básicas o neutras (33).

La preparación de las melazas para la fermentación también requiere del ajuste en la concentración de azúcar, hasta aproximadamente el 12 % de glucosa. (33).

### 3.9 CARACTERISTICAS DEL ETANOL

Los alcoholes son compuestos de formula general ROH, todos estos contienen el grupo hidroxilo (-OH), el cual tiene alta polaridad, dado el caracter fuertemente electronegativo del hidrógeno unido al oxígeno, de esta manera la formula desarrollada para el etanol es



El etanol es uno de los compuestos químicos más utilizados ya que se emplea en la producción de desinfectantes, cosméticos, perfumes, como solvente, como reactivo químico, para producir acetaldehído, etileno, éter etílico, vinagre y en forma diluida como bebida, es el más antiguo producto conocido de fermentación.

Bajo condiciones ordinarias el etanol es un compuesto volátil, flamable, claro y líquido es miscible en agua, otros alcoholes, éter, cloroformo, benceno, además de ser un buen solvente para muchos compuestos.

Las principales propiedades fisicoquímicas son las siguientes: punto de ebullición del etanol puro a 1013 mbar es de 78.3° C., punto de fusión -115° C., solubilidad infinita. (17, 41)

---

## **4.0 DISEÑO EXPERIMENTAL**

---

### **4.1 MATERIAL Y METODOS**

### **4.2 CRECIMIENTO DE LEVADURAS**

#### **4.2.1 REHIDRATACION Y CONSERVACION DE CEPAS**

#### **4.2.2 AISLAMIENTO DE LA CEPA DEL ING. AZUCARERO**

#### **4.2.3 CURVA DE CRECIMIENTO**

### **4.3 DETERMINACION DEL CONSUMO DE GLUCOSA**

#### **4.3.1 TECNICA DE DNS**

#### **4.3.2 CURVA PATRON DE DNS**

### **4.4 PRODUCCION DE ETANOL**

#### **4.4.1 FERMENTACION ALCOHOLICA**

#### **4.4.2 DETERMINACION DE ETANOL**

### **4.5 EXPERIMENTO CON MELAZAS**

## 4.0 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los objetivos propuestos en este trabajo se realizaron las siguientes acciones:

- a) Se consiguieron cuatro cepas de levadura productoras de etanol ;éstas fueron : C-1 F.Q. UNAM, C-5 F.Q. UNAM, ATCC- 9763, cepa del Ingenio Azucarero.
- b) Se estudiaron las curvas de crecimiento y la producción de etanol a partir de glucosa en las cuatro cepas; las determinaciones se relizaron por triplicado y los parámetros considerados fueron: - Produccion de biomasa - Grado alcohólico y - Azúcares reductores en función del tiempo.
- c) Concluído el trabajo experimental se procedió a tabular y analizar el material con la información obtenida para la elaboración de los resultados.

## 4.1 MATERIALES Y METODOS

### 4.2 CRECIMIENTO DE LEVADURAS

#### 4.2.1 REHIDRATACION Y CONSERVACION DE LAS CEPAS.

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
Tubos de 16 x 150	Agua destilada	Campana de flujo laminar
Tubos de 22 x 175	Agar Sabouraud *	Horno
Pipetas de 1, 5, y 10 ml, estériles	Caldos Sabouraud *	Incubadora a 28°C
Vasos de precipitados 100 ml	Fenol al 5%	Potenciómetro
Pipetas Pasteur estériles	Azul de metileno	Autoclave
Cajas de Petri		Microscopio
Compresas estériles		
Algodón		
Gracillas		
Pinzas		
Asa microbiológica		
Sierras metálicas		
Portaobjetos		
Mechero		

\* Composición y preparación en el Anexo 1



Las cepas C-1 y C-5 de la Facultad de Química y la ATCC 9763 se obtuvieron liofilizadas, se rehidrataron en caldo Sabouraud siguiendo la técnica del Cepario de la Facultad de Química (11).

La cepa del ingenio azucarero se obtuvo del residuo de biomasa del fermentador y se purificó como se indica en el inciso 4.2.2.

#### Método:

Se toma la ampollita del microorganismo liofilizado y se procede a marcar la zona de corte en el vidrio, por arriba de la etiqueta con una sierra metálica; este paso es para ayudar a la ruptura de la ampollita, la cual se coloca en un vaso de precipitados con fenol al 5% junto con unas pinzas para poder sacarla, y se deja durante media hora, con el fin de eliminar microorganismos de la superficie. Pasado este tiempo, dentro de la campana microbiológica, se toma la ampollita con las pinzas estériles y se coloca en la parte central de la compresa estéril, se cubre la ampollita con la gasa y se ejerce presión para romperla en la zona marcada.

Mediante una pipeta Pasteur estéril se toma caldo Sabouraud y se agrega a la ampollita, una vez que el liofilizado está suspendido se transfiere a otro tubo de caldo, esta operación se repite hasta que en la ampollita no quedan residuos. El caldo inoculado se incuba durante 24 a 48 h a 28 °C y posteriormente se resiembró en agar Sabouraud.

Las cepas rehidratadas se sembraron por triplicado en agar Sabouraud y se incubaron 48 h; se hizo una prueba microscópica de pureza y se almacenaron en refrigeración, resemebrando cada 6 a 8 semanas.

#### ▣ REACTIVACION

Antes de emplear las cepas en los experimentos fueron reactivadas a partir de los cultivos refrigerados, mediante tres resiembras consecutivas, cada 24 h en caldo Sabouraud e incubando a 28 °C.

#### 4.2.2 AISLAMIENTO DE LA CEPAS DEL INGENIO AZUCARERO

La cepa enviada por el ingenio azucarero estaba contaminada por bacterias y otras levaduras lo cual, además de impedir el estudio y la caracterización, evidentemente reduce la eficiencia del proceso. El aislamiento se realizó por agotamiento en placas de Sabouraud con pH de 3 y a 28 °C.

Una vez aislada la cepa del ingenio azucarero se procedió a su propagación, simultáneamente con C-1, C-5, y 9763 ATCC en tubos con agar Sabouraud.

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
Pipetas automáticas	Acido clorhídrico	Balanza granataria
Matraces Erlenmeyer	Sol. salina isotónica	Espectrofotómetro
Matraces fondo plano	Papel aluminio	Agitador magnético
Pipetas Pasteur estériles	Medio de Crecimiento *	Incubadora
Agitadores		Autoclave
Algodón		
Viales		
Gasa		

\* Composición y preparación en el Anexo 1

## 4.2.3 CURVA DE CRECIMIENTO

### METODO

Se realizó la curva de crecimiento de las cepas con el fin de estandarizar el inóculo para la prueba de fermentación alcohólica. La estandarización del inóculo se lleva a cabo en base a diluciones de cultivos que han llegado a su máximo crecimiento; cada una de las cepas alcanza esta condición fisiológica en tiempos diferentes, lo cual se detecta mediante densidad óptica

Para lograr que las cepas se encontraran en la fase exponencial, que es también conocida como fase de crecimiento rápido, se activó cada cepa sembrándola en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de crecimiento, incubando a 28°C con una agitación de 150 r.p.m.

Para hacer la curva de crecimiento se resembró de las cepas activadas de 24 h, a matraces de 500 ml con 250 ml de medio y se tomaron muestras durante cada hora en condiciones asépticas, para medir el crecimiento por cambio en la densidad óptica (absorbancia) con relación al tiempo. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin - Elmer Hitachi 2000, haciendo las lecturas con una longitud de onda de 650 nm .

Las muestras fueron diluidas tanto como fue necesario para caer en un rango de lectura entre 0.05 y 0.4 en donde la ley de Lambert y Beer es aplicable; las curvas definitivas se hicieron con el inóculo estandarizado a una D.O. inicial de 0.1 a 650 nm (6,43).

Los resultados se muestran en las tablas 7, 8, 9, 10 y en las gráficas 1, 2, 3, 4, y 5.

## 4.3 DETERMINACION DEL CONSUMO DE GLUCOSA

### 4.3.1 TECNICA DEL DNS

El consumo de glucosa fue determinado por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por primera vez por James B. Sumner en 1921 (14, 39) y modificado por Miller en 1958 (30) y otros investigadores (28, 16, 39, 30).

Este es un método colorimétrico con alta sensibilidad y en donde el color es estable, este método se utiliza para detectar cantidades muy pequeñas de glucosa, además de que no hay que poner especial cuidado en el control de las condiciones ambientales (5, 9, 40).

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
Pipetas automáticas	Tartrato doble de Sodio y Potasio	Parrilla térmica
Vasos de precipitados de 250 ml	Acido 3,5-dinitrosalicílico	Cronómetro
Vasos de precipitados de 500 ml	Hidróxido de sodio	Agitador magnético
Matraz aforado de 1000 ml	Agua destilada	Guantes de asbesto
Matraz aforado de 10 ml	Papel aluminio	
Frasco ámbar de 2000 ml		
Tubos de ensayo de 12 x 150		
Canicas		
Embudo		

## METODO:

### -PREPARACION DEL REACTIVO

Para la preparación del reactivo es necesario forrar el matraz aforado de 1000 ml con papel aluminio para evitar que la luz altere la mezcla. Se disuelven primero 16 g de sosa en el matraz el cual contiene unos 800 ml. de agua destilada; se agregan 300 g de tartrato doble de sodio y potasio, poco a poco colocando la mezcla en agitación hasta que se disuelva, una vez que la mezcla se encuentra homogénea, se procede a agregarle 10 g de DNS usando un agitador magnético para facilitar la disolución. Una vez terminada se procede al aforo de la solución con agua destilada y se almacena en un frasco ambar cubierto con aluminio (7, 18, 39).

### DETERMINACION

Utilizando una pipeta automática de 1.0 ml se toman 0.5 ml de DNS y 0.5 ml de la muestra a determinar; se colocan en tubos de ensayo de 12 x 120 se agitan y se meten en agua en ebullición durante 5 min (midiendo el tiempo con cronómetro) se sacan y se colocan en agua fría durante 5 min para detener la reacción. A cada uno de los tubos con la muestra se le agregan, 5 ml de agua con pipeta automática, se agitan y se leen a 540 nm; es importante el que se realice también un blanco con 0.5 ml de agua en vez de muestra y siguiendo el mismo tratamiento (7, 38).

Los resultados se expresan en D.O. y deben ser convertidos a gramos de glucosa por litro para lo cual se aplica la siguiente fórmula:

$$(D.O/m) \times F.d. = gG/l$$

- D.O. = Densidad Optica  
m = Pendiente de la curva patrón del DNS  
F.d. = Factor de dilución  
g.G/l. = Gramos de Glucosa por Litro.

Los resultados se muestran en las tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, y pueden apreciarse en las gráficas.

### 4.3.2 CURVA PATRON ESTANDAR DE DNS:

Se hace una curva estándar con concentraciones de glucosa de 0.2 a 2.0 mg/ml, determinando la D. O. (Absorbancia) en un espectrofotómetro Perkin - Elmer Hitachi 2000 haciendo las lecturas a con una longitud de onda de 540 nm.

Para la curva patrón; se prepara una solución stock con 2.0 mg/ml de glucosa disolviendo 0.02 g en un matraz aforado de 10 ml; su concentración corresponde a 2.0 g de glucosa/l, que es la más alta de las concentraciones que se manejan para la curva patrón. De ésta solución se procede a realizar las diluciones para tener las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 miligramos de glucosa por mililitro, en la forma siguiente:

Tubo 1      0.05 ml de la solución stock + 0.45 ml de agua

(para obtener una concentración de glucosa de 0.2 mg/ml)

Tubo 2      0.1 ml de la solución stock + 0.4 ml de agua

(para obtener una concentración de 0.4 mg/ml)

Tubo 3      0.15 ml de la solución stock + 0.35 ml de agua

( para obtener una concentración de 0.6 mg/ml)

Tubo 4      0.2 ml de la solución stock + 0.30 ml de agua

(para obtener una concentración de 0.8 mg/ml)

Tubo 5      0.25 ml de la solución stock + 0.25 ml de agua

(para obtener una concentración de 1.0 mg/ml)

Tubo 6      0.3 ml de la solución stock + 0.2 ml de agua

(para obtener una concentración de 1.2 mg/ml)

Tubo 7      0.35 ml de la solución stock + 0.15 ml de agua

(para obtener una concentración de 1.4 mg/ml)

Tubo 8      0.4 ml de la solución stock + 0.1 ml de agua

(para obtener una concentración de 1.6 mg/ml)

Tubo 9 0.45 ml de la solución stock + 0.05 ml de agua  
(para obtener una concentración de 1.8 mg/ml)

Tubo 10 0.5 ml de la solución stock  
(para obtener una concentración de 2.0 mg/ml)

Tubo blanco 0.5 ml de agua destilada

De esta forma cada uno de los tubos contiene en total 0.5 ml y se le agregan 0.5 ml del DNS, se agitan y colocan en un recipiente con agua en ebullición durante 5 min (midiendo el tiempo con cronómetro) después de los cuales se sacan y colocan en agua fría por 5 min; una vez transcurrido el tiempo se les agregan 5 ml de agua destilada, con pipeta automática y se lee su absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro. Es aconsejable el trabajar con tres muestras para corroborar los valores. Los resultados se muestran en la tabla 15 y en la gráfica 13

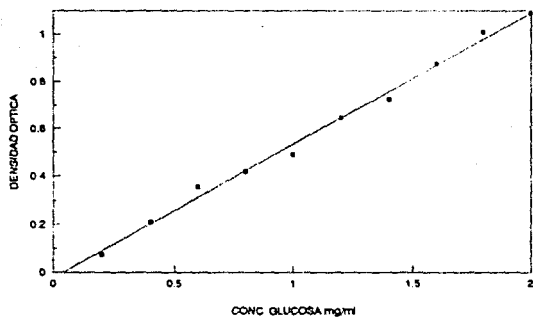
TABLA 15.

**CURVA PATRON**  
**D.N.S.**

CONC. GLUCOSA mg/ml	DENSIDAD OPTICA
0.2	0.077
0.4	0.210
0.6	0.358
0.8	0.421
1	0.491
1.2	0.646
1.4	0.724
1.6	0.878
1.8	1.010
2	1.090

GRAFICA 13.

CURVA PATRON DE GLUCOSA  
TECNICA D.N.S.





## 4.4 PRODUCCION DE ETANOL

### 4.4.1 FERMENTACION ALCOHOLICA

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
Matraces Erlenmeyer de 1000 ml	Medio de fermentación	Autoclave
Matraces fondo plano de 6000 ml	Agua destilada	Incubadora a 28 °C
Pipetas de 1 y 5 ml		Horno

\* Composición y preparación en el Anexo 1

#### Método:

Las cuatro cepas se probaron para determinar su eficiencia en la fermentación alcohólica. Se utilizó el medio de cultivo ya mencionado en matraces de 6 litros conteniendo 4 litros de medio de fermentación. Se inocularon a partir de un pie de cuba producido en las condiciones óptimas de la curva de crecimiento, en matraces de un litro con 500 ml de medio. Una vez inoculado el fermentador se ajusta la densidad óptica inicial a 0.1 de absorbancia en una longitud de onda de 650 nm.

Las muestras se incubaron a 28 °C sin agitación. Se tomaron muestras cada 3 o 4 horas para determinar etanol por destilación y glucosa por el método de DNS. Los resultados se pueden apreciar en las tablas 11, 12, 13, 14, 15 y en las gráficas 7, 8, 9, 10, 11, 12.

#### 4.4.2 DETERMINACION DE ETANOL

MATERIAL	REACTIVO	EQUIPO
Vaso de precipitado 100 ml	Sosa	Termómetro de -10 a 200 °C
Vaso de precipitado 250 ml	Acido clorhídrico	Equipo de destilación
Matraz aforado de 200 ml	Papel pH	Balanza granataria.
Matraz aforado de 100 ml	Agua destilada	Alcoholímetro
Probeta de 250 ml	Fenofaleina	Centrífuga
		Piedras de Ebullición

#### Método:

Se tomaron muestras de la fermentación cada tres o cuatro horas; a cada una de éstas muestras se les sometió a centrifugación para eliminar las células, una vez concluido este proceso se midieron 100 ml de sobrenadante en un matraz aforado de 100 ml; el contenido fue vertido en un matraz redondo de destilación de 500 ml de capacidad, los residuos de la fermentación que quedaron en las paredes fueron enjuagados con una pequeña porción de agua destilada, (aproximadamente 10 ml) el aparato de destilación consta del matraz de bola de 500 ml, termostato, T de destilación, termómetro, refrigerante y recipiente; se destiló el alcohol recuperando la fracción que destila entre los 72 °C y 76 °C. El destilado obtenido fue aforado a 100 ml con agua destilada para obtener los grados Gay Lussac mediante un alcoholímetro (34, 2).

## 5.2 EXPERIMENTO CON MELAZAS

Una vez que se determinó la producción de etanol de cada una de las cepas se seleccionaron las dos más productivas para cuantificar su rendimiento sobre las melazas, y éstas fueron las cepas ATCC-9763 y la cepa del Ingenio Azucarero

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
Matraces Erlenmeyer 100 ml	Medio de fermentación	Agitador magnético
Matraces fondo plano	Agua destilada	Autoclave
Pipetas		Incubadora a 28° C
Matraces Erlenmeyer 250 ml		Horno
Vasos de precipitados de 100 ml		Termómetro de -10 de 200° C
Vasos de precipitados de 250 ml		Balanza granataria.
Matraz aforado de 200 ml		Centrífuga
Probeta de 250 ml		

### METODO:

El inóculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio, incubado a 28° C, realizando resiembras a mayor cantidad de medio en matraces de 1000 ml conteniendo 500 ml de medio de fermentación. Para la fermentación final se utilizaron matraces de fondo plano de 6 litros con 4 litros de medio y se ajustó el inóculo a 0.1 de absorbancia en una longitud de onda de 650 nm.

Se tomaron muestras durante cada 3 horas y se les determinó su grado alcohólico como se indica en el punto 4.4.2

El resultado de este experimento fue que la fermentación en melazas no alcanzó un valor tan alto como la glucosa para cada una de las respectivas cepas. El valor alcanzado es de 6 grados Gay Lussac para la cepa del Ingenio Azucarero y de 3 grados Gay Lussac para la cepa ATCC-9763 lo cual sugiere que en estas melazas se debe de encontrar alguna sustancia que no facilita la formación de etanol, al inhibir la formación de producto ó, tal vez, la utilización del azúcar.

Durante la preparación del medio se notó que había una gran cantidad de residuo insoluble y extraño en las melazas; además no fue posible obtener datos sobre el tiempo y condiciones de almacenamiento, ni otra muestra de melazas por lo que no pudo repetirse este experimento. Se sabe que el tiempo y condiciones de almacenamiento de las melazas son factores determinantes en los bajos rendimientos de la fermentación alcohólica, por lo que se propone otro estudio más amplio en el cual se controlen dichas variables de las melazas y se prueben las cepas seleccionadas y conservadas mediante el presente estudio.

---

## **5.0 ANALISIS GRAFICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES**

---

**5.1 RESULTADOS**

**5.2 TABLAS DE RESULTADOS**

**5.3 GRAFICAS**

## 5.0 ANALISIS GRAFICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

### 5.1 - RESULTADOS

Para conocer la relación que existe entre el consumo de glucosa, la producción de biomasa y etanol con respecto al tiempo se monitorearon las fermentaciones de las cuatro cepas así como su producción de biomasa, las muestras se tomaron cada hora para las curvas de crecimiento y cada cuatro horas para la fermentación alcohólica.

Se realizaron determinaciones por duplicado de cada una de las muestras obtenidas, los parámetros considerados fueron:

- a) azúcares reductores totales
- b) grado alcohólico
- c) biomasa

Los resultados se presentan en dos formas distintas; la primera es una representación gráfica de la variación de las concentraciones de cada una de las diferentes especies con respecto al tiempo de fermentación. La segunda es una tabla de valores numéricos que nos indica con detalle el valor numérico para cada uno de los puntos de las gráficas.

De esta manera se probaron 4 diferentes cepas de *S. cerevisiae*, provenientes dos de ellas del Cepario de la Facultad de Química, otra de ellas del Cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas y una más proveniente del Ingenio Azucarero.

### PRODUCCION DE BIOMASA:

#### MAXIMA DENSIDAD OPTICA ALCANZADA

CEPA	D.O.	TIEMPO
INGENIO	0.185	26 h
C-1 F. Q.	0.170	49 h
ATCC-9763	0.140	31 h
C-5 F. Q.	0.112	23 h

Esta tabla nos muestra que en condiciones aerobias con una agitación de 150 r.p.m. a 28° C y en un litro de medio de fermentación la cepa del ingenio azucarero tiene mayor capacidad de reproducción; (ver gráfica 5).

#### CONSUMO DE GLUCOSA DURANTE LA PRODUCCION DE BIOMASA:

##### GLUCOSA RESIDUAL

CEPA	Glucosa g/l	TIEMPO
INGENIO	7.92	51 h
C-1 F. Q.	5.14	54 h
ATCC-9763	25.96	54 h
C-5 F. Q.	47.32	54 h

\* Concentración inicial de glucosa; 120 g/l

El consumo de glucosa fue obtenido por la técnica del DNS, en esta tabla podemos ver que la cepa que consume más azúcar es la C-1 F.Q. UNAM, seguida por la del ingenio, estas dos cepas son las que más producción de biomasa tienen bajo estas condiciones; (glucosa inicial 120 g/l. 28 ° C y 150 r.p.m.) estos resultados se aprecian mejor en la gráfica 6.

## PRODUCCION DE ETANOL.

### MAXIMO GRADO ALCOHOLICO ALCANZADO

CEPA	Grados Gay Lussac	TIEMPO
INGENIO	11	84 h
C-1 F.Q.	8	78 h
ATCC-9763	7	96 h
C-5 F.Q.	2	48 h

Los datos obtenidos muestran que la producción de etanol se detiene en diferentes rangos para cada una de las cepas; esto aparentemente tiene relación no solo con las condiciones del medio sino además con la adaptación que muestra cada una de las cepas hacia el etanol.

La cepa que manifiesta una mejor producción de etanol bajo condiciones de laboratorio en un volumen de 4 l. es la del ingenio azucarero reportando 11 grados Gay Lussac, seguida por la del Cepario de la Facultad de Química C-1 F.Q. UNAM. La gráfica 11 muestra también estos resultados.

### CONSUMO DE GLUCOSA DURANTE LA PRODUCCION DE ETANOL:

#### GLUCOSA RESIDUAL REGISTRADA

CEPA	Glucosa g/l.	TIEMPO
INGENIO	0.535	96 h
C-1 F.Q.	25.0	96 h
ATCC-9763	29.33	96 h
C-5 F.Q.	74.946	96 h

\* Concentración inicial de glucosa: 120 g/l



En estas tablas se puede observar que para las dos primeras cepas, la glucosa se consume casi completamente. ( El final de la fermentacion puede ser detectado por el valor de los azúcares reductores totales de la muestra cuando estos se acercan a cero); cuando los valores permanecen constantes, y el valor es todavía muy alto, esto nos indica algun problema en la dos cepas finales lo cual se puede constatar al existir una cantidad excesiva de glucosa residual; lo cual nos esta indicando problemas en la fermentación.

La cepa que mejor transforma el azúcar en etanol es la del ingenio azucarero ya que nos da un más alto rendimiento en la producción de etanol y es también la que deja menos azúcares residuales en el medio.

**TABLA 7.**

**CONSUMO DE GLUCOSA  
EN LA PRODUCCION DE BIOMASA  
CEPA DEL INGENIO AZUCARERO**

t	D.N.S.	GLUCOSA	BIOMASA
	DENSIDAD OPTICA	g/l	DENSIDAD OPTICA
0	2.050	106.74	0.15
1	2.010	107.60	0.20
2	1.960	104.93	0.25
3	1.940	103.85	0.28
4	1.940	103.85	0.30
5	1.840	96.50	0.36
6	1.740	93.15	0.47
7	1.630	87.26	0.70
8	1.480	78.16	0.68
9	1.370	73.34	0.99
10	1.360	72.81	1.08
22	0.851	45.56	1.75
23	0.803	42.99	1.80
24	0.718	38.44	1.82
25	0.683	34.86	1.84
26	0.627	33.57	1.85
27	0.620	33.19	1.85
28	0.612	32.76	1.85
29	0.603	32.28	1.85
30	0.589	31.53	1.85
31	0.571	30.57	1.85
32	0.526	28.16	1.85
33	0.505	27.03	1.85
46	0.202	10.81	1.85
47	0.183	8.73	1.85
48	0.180	8.57	1.85
49	0.158	8.46	1.85
50	0.149	7.98	1.85
51	0.148	7.92	1.85
52	0.148	7.92	1.85
53	0.148	7.92	1.85
54	0.147	7.87	1.85

1 ESTA EN HORAS

TABLA 8.

**CONSUMO DE GLUCOSA  
EN LA PRODUCCION DE BIOMASA  
CEPA ATCC-9763**

t	D.R.S.	GLUCOSA	BIOMASA
	DENSIDAD OPTICA	g/l	DENSIDAD OPTICA
0	1.837	95.340	0.13
1	1.826	97.752	0.14
2	1.818	97.323	0.15
3	1.778	95.075	0.18
4	1.774	94.958	0.18
5	1.757	94.058	0.20
6	1.745	93.415	0.22
7	1.742	93.255	0.23
8	1.730	92.812	0.34
9	1.805	85.921	0.53
10	1.572	84.154	0.59
22	1.200	64.240	1.24
23	1.163	62.259	1.28
24	1.182	62.208	1.33
25	1.148	61.456	1.36
26	1.126	60.278	1.38
27	1.081	57.869	1.38
28	1.080	57.227	1.38
29	1.088	57.088	1.39
30	1.080	56.745	1.39
31	1.059	56.892	1.40
32	1.049	56.156	1.40
33	1.011	54.122	1.40
46	0.777	41.595	1.40
47	0.723	38.704	1.40
48	0.721	38.597	1.40
49	0.634	33.645	1.40
50	0.610	32.655	1.45
51	0.578	30.542	1.40
52	0.547	29.283	1.40
53	0.532	28.480	1.40
54	0.485	25.964	1.40

ESTA EN HORAS

TABLA 9.

**CONSUMO DE GLUCOSA  
EN LA PRODUCCION DE BIOMASA  
CEPA C-1 FQ UNAM**

t	D.N.S.	GLUCOSA	BIOMASA
	DENSIDAD OPTICA	g/l	DENSIDAD OPTICA
0	2.150	115.096	0.18
1	2.059	110.225	0.25
2	1.913	102.409	0.32
3	1.848	96.822	0.34
4	1.817	97.270	0.35
5	1.804	96.574	0.42
6	1.772	94.861	0.60
7	1.763	94.379	0.65
8	1.702	91.713	0.72
9	1.616	86.510	0.76
10	1.566	83.833	0.84
22	1.221	65.364	0.96
23	1.218	65.096	0.97
24	1.210	64.776	0.99
25	1.166	62.420	1.02
26	1.102	58.994	1.06
27	1.036	55.460	1.11
28	1.020	54.604	1.13
29	1.014	54.283	1.16
30	0.920	49.251	1.20
31	0.883	47.270	1.24
32	0.817	43.737	1.27
33	0.814	43.576	1.29
46	0.368	19.700	1.65
47	0.366	19.593	1.68
48	0.328	17.552	1.69
49	0.235	12.530	1.70
50	0.219	11.724	1.70
51	0.161	8.619	1.70
52	0.120	5.424	1.70
53	0.098	3.246	1.70
54	0.066	5.139	1.70

1 ESTA EN HORAS

TABLA 10.

**CONSUMO DE GLUCOSA  
EN LA PRODUCCION DE BIOMASA  
CEPA C-5 FQ UNAM**

t	D.N.S. DENSIDAD OPTICA	GLUCOSA g/l	BIOMASA DENSIDAD OPTICA
0	1.983	106.156	0.13
1	1.978	105.569	0.15
2	1.967	105.300	0.17
3	1.908	102.141	0.21
4	1.877	100.482	0.26
5	1.825	97.658	0.28
6	1.807	95.846	0.34
7	1.831	83.030	0.73
8	1.485	79.497	0.80
9	1.454	77.837	0.84
10	1.423	76.178	0.88
22	1.308	70.021	1.10
23	1.284	68.737	1.12
24	1.281	68.576	1.12
25	1.271	68.041	1.12
26	1.248	66.806	1.12
27	1.237	66.221	1.12
28	1.225	65.578	1.12
29	1.203	64.400	1.12
30	1.179	63.116	1.12
31	1.157	61.838	1.12
32	1.130	60.443	1.12
33	1.116	59.743	1.12
46	1.028	55.032	1.12
47	1.016	54.300	1.12
48	0.983	52.623	1.12
49	0.967	51.767	1.12
50	0.966	51.660	1.12
51	0.962	51.496	1.12
52	0.952	50.964	1.12
53	0.907	48.555	1.12
54	0.854	47.323	1.12

t ESTA EN HORAS

TABLA 11.

**CONSUMO DE GLUCOSA  
DURANTE LA PRODUCCION DE ETANOL  
CEPA DEL INGENIO AZUCARERO**

t	D.N.S. DENSIDAD OPTICA	GLUCOSA g/l	ETANOL G.L.
3	2.250	120.450	0.5
6	2.230	119.379	1.0
9	2.170	116.167	1.5
12	2.060	110.278	2.0
23	1.630	87.259	3.5
27	1.450	77.623	4.0
30	1.290	69.058	5.0
33	1.060	56.745	5.5
37	0.934	50.000	6.0
48	0.548	29.336	8.0
51	0.451	24.143	8.0
54	0.336	17.987	8.5
57	0.265	14.186	9.0
60	0.202	10.814	9.0
72	0.106	5.675	10.0
78	0.063	3.373	10.0
81	0.053	2.837	10.0
84	0.040	2.141	10.5
96	0.010	0.535	11.0

¡ ESTA EN HORAS

TABLA 12.

**CONSUMO DE GLUCOSA  
DURANTE LA PRODUCCION DE ETANOL  
CEPA ATCC-9763**

t	D.N.S.	GLUCOSA	ETANOL
	DENSIDAD OPTICA	g/l	G.L.
3	2.200	117.773	0.5
6	2.060	110.278	1.0
9	1.912	102.355	2.0
12	1.800	96.360	2.5
23	1.600	85.653	3.0
27	1.520	81.370	3.5
30	1.480	79.229	3.5
33	1.453	77.784	4.0
37	1.421	76.071	4.0
48	1.400	74.946	4.0
51	1.390	74.411	4.0
54	1.383	74.036	4.5
57	1.354	72.484	4.5
60	1.307	69.968	5.0
72	0.934	50.000	6.0
78	0.747	39.989	6.5
81	0.654	35.011	6.5
84	0.598	32.013	6.5
96	0.548	29.336	7.0

t ESTA EN HORAS

TABLA 13.

**CONSUMO DE GLUCOSA  
DURANTE LA PRODUCCION DE ETANOL  
CEPA C-1 FQ UNAM**

t	D.N.S.	GLUCOSA	ETANOL
	DENSIDAD OPTICA	g/l	G.L.
3	2.320	124.197	0.0
6	2.310	123.662	0.5
9	2.290	122.591	0.5
12	2.240	119.914	0.5
23	2.180	116.702	1.0
27	2.140	114.561	1.5
30	2.090	111.884	1.5
33	2.050	109.743	2.0
37	2.010	107.602	2.0
48	1.680	89.936	3.0
51	1.600	85.653	3.5
54	1.500	80.300	3.5
57	1.430	76.552	4.0
60	1.160	62.099	5.0
72	0.775	41.488	7.0
78	0.562	30.086	8.0
81	0.516	27.623	8.0
84	0.501	26.820	8.0
95	0.467	25.000	8.5

ESTA EN HORAS



TABLA 14.

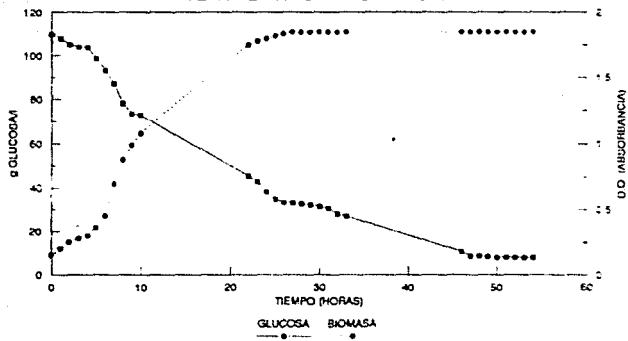
**CONSUMO DE GLUCOSA  
DURANTE LA PRODUCCION DE ETANOL  
CEPA C-5 FQ UNAM**

t	D.N.S. DENSIDAD OPTICA	GLUCOSA g/l	ETANOL G.L.
3	1.940	163.854	0.0
6	1.900	101.713	0.5
9	1.880	100.642	0.5
12	1.860	99.572	0.5
23	1.760	94.218	1.0
27	1.750	93.683	1.0
30	1.730	92.612	1.0
33	1.720	92.077	1.0
37	1.700	91.006	1.0
48	1.680	89.936	2.0
51	1.680	89.936	2.0
54	1.660	88.865	2.0
57	1.650	88.330	2.0
60	1.600	85.653	2.0
72	1.520	81.370	2.5
78	1.500	80.300	2.5
81	1.470	78.694	2.5
84	1.460	78.158	2.5
96	1.400	74.946	3.0

¡ ESTA EN HORAS

GRAFICA 1.

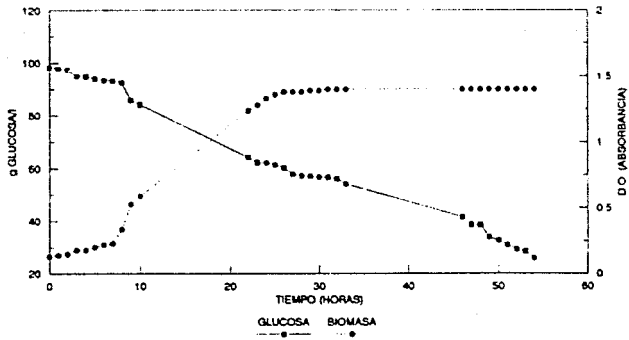
TIEMPO VS PRODUCCION DE BIOMASA  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA DEL INGENIO AZUCARERO



11 - 28°C - 150 mm - 60 h

GRAFICA 2.

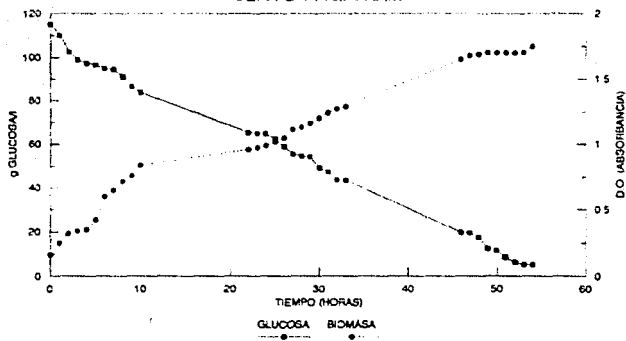
TIEMPO VS PRODUCCION DE BIOMASA  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA ATCC-9763



1 l - 28°C - 150 rpm - 60 h

GRAFICA 3.

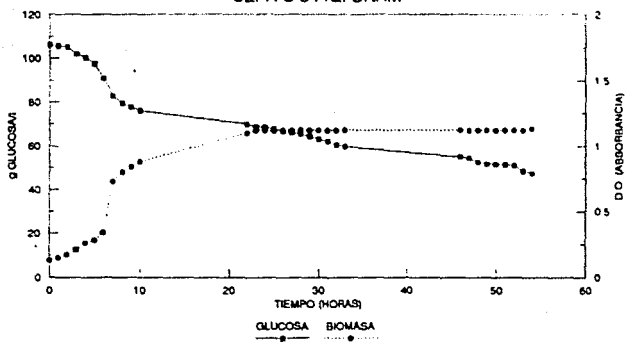
TIEMPO VS PRODUCCION DE BIOMASA  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA C-1 F.Q. UNAM



11-28 °C - 150 rpm - 60 h

GRAFICA 4.

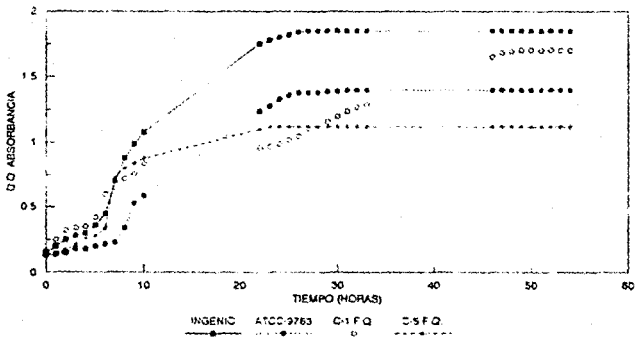
TIEMPO VS PRODUCCION DE BIOMASA  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA C-5 F.Q. UNAM



11 - 28°C - 150 rpm - 60 h

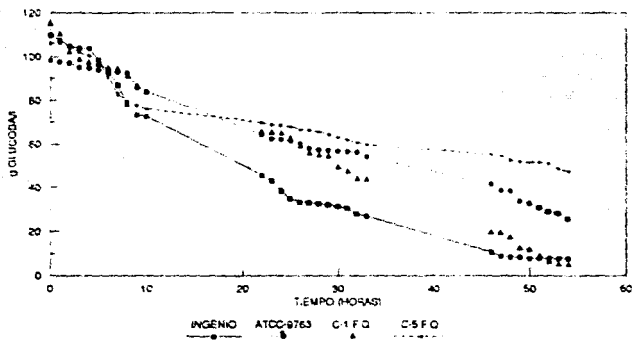
GRAFICA 5.

TIEMPO VS PRODUCCION DE BIOMASA  
CUATRO CEPAS



GRAFICA 6.

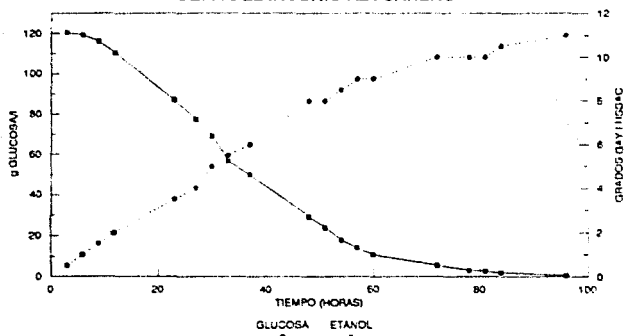
TIEMPO VS CONSUMO DE GLUCOSA  
CUATRO CEPAS



1 l - 28°C - 150 rpm - 60 h

GRAFICA 7.

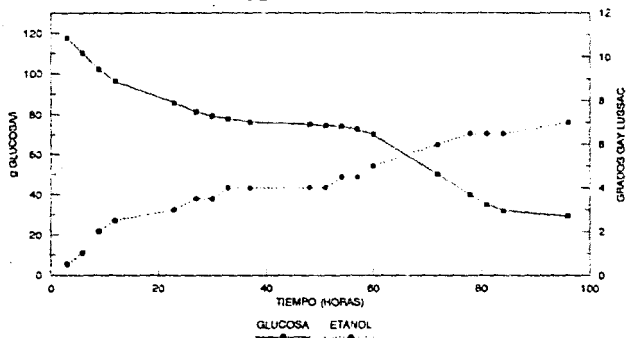
TIEMPO VS PRODUCCION DE ETANOL  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA DEL INGENIO AZUCARERO





GRAFICA 8.

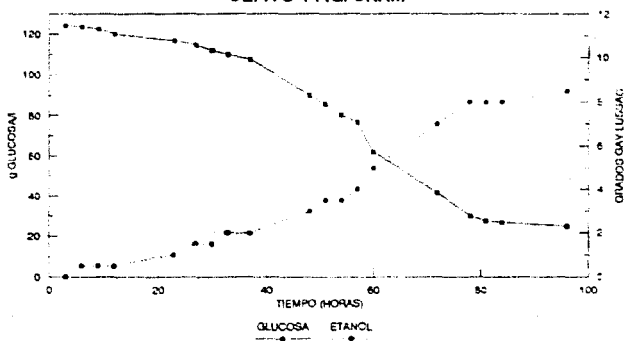
**TIEMPO VS PRODUCCION DE ETANOL  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA ATCC-9763**



41 - 28°C - ESTÁTICO - 100 h

GRAFICA 9.

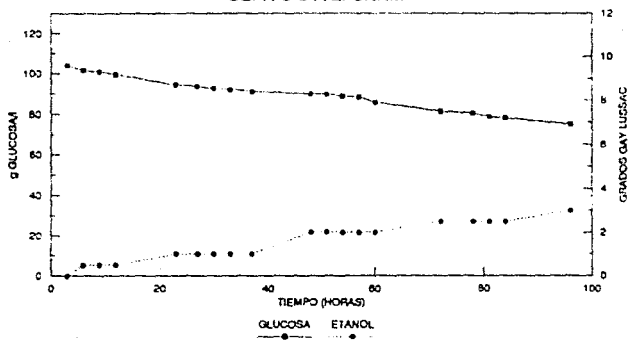
TIEMPO VS PRODUCCION DE ETANOL  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA C-1 F.Q. UNAM



41-28°C - ESTÁTICO - 100 h

GRAFICA 10.

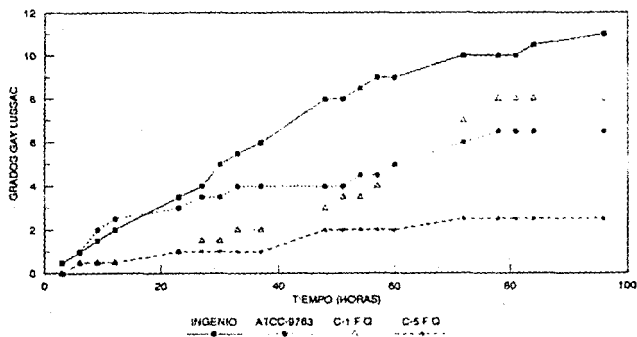
TIEMPO VS PRODUCCION DE ETANOL  
Y CONSUMO DE GLUCOSA  
CEPA C-5 F.Q. UNAM



41 - 25°C - ESTÁTICO - 100 h

GRAFICA 11.

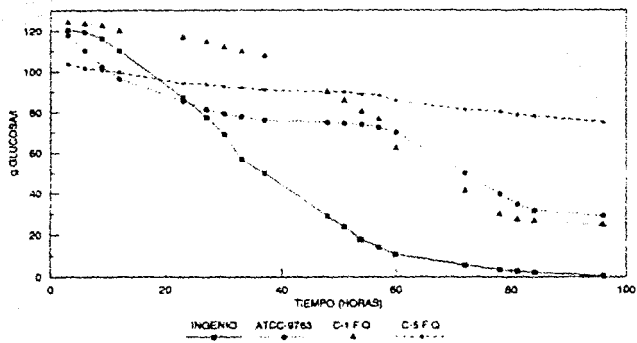
TIEMPO VS PRODUCCION DE ETANOL  
CUATRO CEPAS



41-28°C - ESTÁTICO - 100 h

GRAFICA 12

TIEMPO VS CONSUMO DE GLUCOSA  
CUATRO CEPAS



41 - 28°C - ESTÁTICO - 100 h

---

## **6.0 CONCLUSIONES**

---

### **6.1 CONCLUSIONES**

### **6.2 RECOMENDACIONES**

## 6.1 CONCLUSIONES

- 1 La cepa C-1 F.Q. UNAM tiene la mayor producción de biomasa en las primeras seis horas, pero la cepa del Ingenio Azucarero tiene la mayor producción a partir de las 15 horas alcanzando el final de la fase de crecimiento exponencial alrededor de las 20 horas, con una producción de biomasa mucho mayor que las otras cepas.
- 2 Estos resultados concuerdan con los del consumo de glucosa, puesto que la cepa del Ingenio Azucarero es la que la utiliza de manera más eficiente, agotando el azúcar disponible y produciendo el máximo de biomasa en el menor tiempo.
- 3 En cuanto a la producción de etanol la cepa del ingenio azucarero es la que da los mejores resultados llegando a 10 ° G. L. en 7.5 horas y a 11 ° G. L. en 96 horas. La siguiente en productividad es la C-1 F.Q. UNAM aunque sólo llega a 8 ° G. L. en 75 horas y a 8.5 en 96 horas, valores inferiores a los que produce la cepa del Ingenio Azucarero.
- 4 La calidad de las melazas no permitió obtener resultados en el medio utilizado en el ingenio azucarero.
- 5 La cepa del ingenio azucarero, ha dado los mejores resultados, comparada con otras tres cepas. Es importante enfatizar que antes de probarla, la cepa fué purificada y que seguramente la presencia de bacterias y otras levaduras contaminantes son causa, al menos parcial de los bajos rendimientos obtenidos en el Ingenio.
- 6 Las cepas están conservadas en el Cepario de la Facultad de Química.

## 6.2 RECOMENDACIONES

La primera recomendación es lograr que el ingenio azucarero utilice la levadura en condiciones adecuadas de pureza. Como demuestran los resultados, esta cepa es buena productora de etanol pero es indudable que la contaminación que tiene afecta su rendimiento de manera significativa.

Para ello es necesario revisar el inóculo que se está utilizando y el proceso de preparación del pié de cuba, y corregir los problemas que se detecten, incluyendo el establecimiento de controles, y la capacitación del personal involucrado.

Se recomienda también hacer pruebas de fermentación con las dos cepas previamente seleccionadas pero caracterizando y controlando adecuadamente la calidad de las melazas empleadas.

Existen reportes sobre el desarrollo de procesos que disminuyen la disponibilidad de azúcares de las melazas durante el almacenamiento y, como ya se mencionó en el ingenio no se obtuvieron datos sobre el tiempo y las condiciones de almacenamiento de las melazas.



---

## **ANEXOS Y BIBLIOGRAFIA**

---

## ANEXO 1

### COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:

#### MEDIO DE FERMENTACION:

Extracto de levadura	0.2 g
Mg SO <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.04 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2 g
Glucosa	10.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
Ajustar el pH	4.0
Agua destilada	100 ml

El extracto de levadura se disuelve en agua destilada; una vez que se tiene una mezcla homogénea se procede a añadir los demás compuestos en el orden en el que aparecen. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.

#### MEDIO DE FERMENTACION CON MELAZAS:

Extracto de levadura	0.2 g
Mg SO <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.04 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2 g
Melazas	10.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
Ajustar el pH	4.0
Agua destilada	100 ml

Las melazas se utilizan una vez que son centrifugadas para eliminar los lodos que aparecen en ellas. El medio se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos.

#### AGAR SABOURAUD:

Dextrosa .....	2 g
Neopeptona .....	1 g
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O .....	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
Agar .....	10 g
Agua destilada .....	1 l

El agar Sabouraud se disuelve en agua destilada; una vez que se tiene una mezcla homogénea se calienta a la flama del mechero hasta que se disuelve el agar, luego se procede a verter el contenido en los tubos de ensayo aislándolos del medio con una torunda.

Se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos.

#### CALDO SABOURAUD:

Dextrosa .....	2 g
Neopeptona .....	1 g
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O .....	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
Agua destilada .....	1 l

El Caldo Sabouraud se disuelve en agua destilada; una vez que se tiene una mezcla homogénea; se procede a verter el contenido en los tubos de ensayo aislándolos del medio con una torunda.

Se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos.

ANEXO 2

**CRONOGRAMA SOBRE LA EVOLUCION DE LA**

**FERMENTACION (26, 13)**

- ▣ 3500 - 3000 a.c. Cultivo de vid y preparación de vino en Mesopotamia.
- ▣ 3000 - 2500 a.c. Introducción de la vitivinicultura y del vino en Egipto procedente de Mesopotamia.
- ▣ 2000 - 1500 a.c. Fermentación de dátiles para obtener una bebida alcohólica representada en pinturas murales en Egipto; también se han encontrado vasijas que contenían dátiles con miel para obtener una bebida en graduación alcohólica muy elevada en Mesopotamia.
- ▣ 1500 - 1000 a.c. Uso de la levadura de cerveza para el pan, en Egipto y Asia menor.
- ▣ 612 a.c. Cultivo de caña de azúcar en la India
- ▣ 700 - 900 d.c. Los alquimistas clasifican las sustancias en tres tipos les llaman espíritus a aquellas que se presentan en forma volátil, las que brillan son denominadas metales, y polvos a las restantes.
- ▣ 1220 d.c. Preparación de etanol puro mediante la destilación de los vinos recios y del aguardiente en Europa ( siglo XIII ).
- ▣ 1747 Andrés S. Margraf (1709 - 1782) químico berlinés consigue extraer el azúcar de la remolacha.
- ▣ 1788 Franz Karl Achard (1751 - 1823) químico alemán estudia un procedimiento industrial para la extracción de azúcar de la remolacha.
- ▣ 1801 Edouard Adam de Rouen obtiene una patente para producir alcohol concentrado con una sola destilación.
- ▣ 1810 Gay-Lussac deduce la ecuación de la fermentación alcohólica.
- ▣ 1830 Liebig desarrolla técnicas de análisis cuantitativo aplicadas a sistemas biológicos.
- ▣ 1833 Payen y Persoz purifican la diastasa (amilasa) del trigo, mostrando que era termolábil y enuncian la impotencia de las enzimas.

- ▣ **1837 Berzelius postula la naturaleza catalítica de la fermentación.**
- ▣ **1854 Luis Pasteur es nombrado profesor de química y decano de la Facultad de Ciencias recientemente organizada en Lille.**
- ▣ **1855 Pasteur comienza sus estudios sobre fermentación**
- ▣ **1857 Pasteur publica la memoria sobre fermentación láctica.**
- ▣ **1860 Pasteur publica la memoria sobre la fermentación alcohólica.**
- ▣ **1861 Descubrimiento de la vida anaerobia por Luis Pasteur**
- ▣ **1871 Estudios sobre la cerveza de Luis Pasteur.**
- ▣ **1875 Pasteur establece un laboratorio para estudios sobre la fermentación.**
- ▣ **1876 Se publican los estudios de Pasteur sobre la cerveza.**
- ▣ **1893 Ostwald demuestra que las enzimas son catalizadores.**
- ▣ **1897 Buchner descubre que la fermentación alcohólica pueden provocarla los extractos de levadura exentos de células.**
- ▣ **1905 Harden y Young demuestran que la fermentación alcohólica requiere la presencia de fosfato y aíslan la primera coenzima, la nombran cozimasa; posteriormente se identifica como NAD.**
- ▣ **1912 Neuberg propone una ruta metabólica química para la fermentación.**
- ▣ **1913 Michaelis y Menten desarrollan una teoría cinética de la acción enzimática.**
- ▣ **1933 Embden y Meyerhof identifican a varios productos intermediarios de la ruta química de la glucólisis y de la fermentación.**
- ▣ **1951 Lehninger demuestra que el transporte electrónico desde el NADH al oxígeno es la fuente de energía inmediata para la fosforilación oxidativa.**

## ANEXO 3

### PROGRAMA UTILIZADO PARA OBTENER LA PENDIENTE DE LA CURVA PATRON DE GLUCOSA EN LA TECNICA DEL DNS

```
5 REM
10 INPUT "NUMERO DE DATOS" ,M
20 FOR Q = 1 TO M
30 INPUT "X =",X
35 INPUT "Y =",Y
40 C=C+X
50 V=V+Y
60 B=B+(X*X)
70 N=N+(X*Y)
80 H=H+(Y*Y)
90 NEXT Q
100 A=M*B-(C*C)
110 Z=((B*V)-(C*N))/A
120 P=((M*N)-(C*V))/A
130 R=((M*N)-(C*V))/SQR(A*((M*H)-(V*V)))
140 PRINT "B=";Z,"M=";P,"COEF.CORR.";R
150 END
```

### AISLAMIENTO Y VERIFICACION DE LA IDENTIDAD DE LA CEPA PROVENIENTE DEL INGENIO

La técnica utilizada frecuentemente para el aislamiento de microorganismos se basa en una serie de diluciones de la muestra problema, para luego sembrar una parte de la dilución en una placa de agar, separando lo suficiente para que cada organismo que se desarrolle en el medio puede formar una colonia.

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
Cajas de Petri desechables estériles	Agar Sabouraud	Incubadora 28° C
Cajas de Petri de vidrio estériles	Agua peptonada estéril	Autoclave
Tubos de Ensayo de 12 x 150	Celobiosa	phmetro
Pipetas de 1 y 10 ml	Glicerina	
Ases bacteriológicos estériles	Glucosa	
Ciempinas de fermentación	Lactosa	
Tubos con tapón rosca	Maltosa	
	Melzitosa	
	Melibiosa	
	Rafinosa	
	Sacarosa	
	Medio Base Rojo de fenol	

### Método:

Se etiquetan 6 tubos de ensayo para efectuar en ellos las diluciones. de manera similar se etiquetan seis cajas de Petri en donde se van a verter las diluciones; se toman 0.5 ml de muestra proveniente del fondo del reactor y se coloca en el primer tubo, el cual debe contener 4.5 ml de agua peptonada estéril, esta mezcla se agita hasta formar una suspensión homogénea y con una pipeta estéril se toman 0.5 ml de la mezcla  $10^{-1}$  y se coloca en el tubo de  $10^{-2}$ . Este procedimiento se repite hasta terminar con todas las diluciones. Utilizando pipetas estériles para cada una de las suspensiones se procede a transferir 0.1 ml de cada tubo a la caja de Petri correspondiente. Se incuban a  $28^{\circ}\text{C}$  y después de 24 h se observa el desarrollo de colonias en cada una de las cajas, se selecciona la caja en donde la densidad de las colonias sea baja y permita tomar una sin el riesgo de contaminarla. Esta colonia se resiembró un medio de cultivo adecuado para su desarrollo.

El aislamiento se lleva a cabo para seleccionar una colonia de las demás, el medio debe ser el adecuado para permitir el correcto desarrollo de un microorganismo, una vez aislada la colonia se realiza la resiembra de ésta a nuevos medios de cultivo, éste proceso se repite de 4 a 6 veces para lograr la purificación de la cepa, ésta última colonia en crecimiento es utilizada como inóculo para verificar que se haya aislado la cepa que nos interesa.

Esto se logra mediante el estudio microscópico, zimograma y pruebas de fermentación diferencial.

Se utiliza como indicador la base rojo de fenol a un pH de 7.4 el cual es adicionado con diferentes azúcares, las pruebas se realizan en tubos con tapón de rosca con campana para observar la producción de gas. Se utilizaron 9 diferentes azúcares.

Los resultados de la identificación fueron positivos para *Saccharomyces cerevisiae*

Celobiosa	ácido
Galactosa	ácido y gas
Glucosa	ácido y gas
Lactosa	ácido
Maltosa	ácido
Melezitosa	ácido
Melibiosa	ácido
Rafinosa	ácido
Sacarosa	ácido y gas



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguilera A. and T. Benitez 1986 "Ethanol sensitive mutants of *S. cerevisiae*" Arch. Microbiol 142: 389-392 (1986)
- 2.- A.O.A.C. 1980 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Cap 31 pags 520-528.
- 3.- ATCC "Catalog of strains" The. 1978 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.
- 4.- Avers, J. 1980 "Biología celular" Grupo Editorial Interamericano, México, D. F.
- 5.- Benedict, S.R. 1921. "The determination of small quantities of sugar in urine, including observations on the polysaccharide content of human urine" Cornell Univ. Med. Col. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 17: 183
- 6.- Bestic, P. P. and Arnold, W. N. "Linear Transformation of standad curves for yeast turbidity" Appl. Env. Míc. 32 (4) : 640 - 641 (1976).
- 7.- Bibbins Martínez, Martha Tesis de la Facultad de Química UNAMG para recibir el título de Química Farmacología, 1990. "Caracteriztica de Enzimas extracelulares de Microorganismos aislados de caña de azúcar"
- 8.- Bohinski, C. 1978 "Bioquímica" Fondo Educativo Interamericano, México D.F.
- 9.- Brodersen, R. and Ricketts, H. T. J. 1951 "Buffers in biochemistry" Lab. Clin. Med. 34 : 2132
- 10.- Casiano, C. 1981 "Flora Taxonómica Mexicana" Vol. 1 Ed. Instituto Politécnico Nacional y Centro Nacional de Enseñanza Técnica Industrial, México D. F.
- 11.- Cepario de la Facultad de Química, (Notas internas sobre técnicas microbiológicas) incunable.
- 12.- Davenport, R.R. Curso organizado por el ministerio de comercio, CONAFRUT, la Universidad de México y el National Fruit Institute 1978 "Yeast and yeast-like organism in beverages and foods with special application to their significance and simple identification" Bristol Inglaterra en julio de 1978. Consultado en el Cepario de la Facultad de Química.
- 13.- Dubous R. J., 1985 " Pasteur " Colección Salvat Barcelona, España
- 14.- Durán D., C. "The efect of alcohol concentration on the kinetics of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*." tesis de M. en C., Universidad de California en Berkeley, 1969
- 15.- Cepario de la Facultad de Química tablas sobre identificación de Levaduras, Archivo

Interno.

- 16.- Gaillardin, C. y Heslot, H "La levadura" edición especial sobre biotecnologías Mundo Científico 7 (71): 716 - 724 (1985)
- 17.- González, P. y Giovani, E. Compiladores 1966 "La ciencia y la técnica" Editorial Montaner y Simon, S. A. Barcelona, España.
- 18.- Hostettler, F. et. al. 1950 "History of ion exchange" *Experientia* 6: 445 - 456
- 19.- Ingram L. O. 1976 "Adaptation of membrane Lipids to Alcohols" *Journal of Bacteriology* 125 (2): 670-678.
- 20.- Ingram, L. O. 1986 "Microbial Tolerance to alcohols: role of the cell membrane" *Tibtech* (feb): 40-44
- 21.- Ismail, A. A. and A. M. Ali 1971 "Selección de hightance." *Folia Microbiol.* 16 : 350- 354 (1971) (artículo donde se desarrolla la teoría sobre resistencia al etanol por parte de los organismos).
- 22.- Iturbe Andreu Maria Carmen 1987 "Formación de una subcolección de cepas de interés industrial para el Cepario de la Facultad de Química Tesis de Q.F.B. F.Q. UNAM
- 23.- Jiménez, J. and T. Benítez 1987 "Genetics analysis of highly ethanol tolerance wine yeast". *Curr. Genet.* 12 : 421-428 (1987)
- 24.- Jimenez, J. and T. Benítez "Selection of ethanol-Tolerant yeast híbridos in pH regulated continuous culture" *Appl. and Environ. Microbiol.* 54 (4): 917-922 (1988)
- 25.- Lagunas, R. "Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* yeast 2: 221 - 228 (1986)
- 26.- Lenhinger, L. 1982 "Bioquímica" Ed. Omega Barcelona, España.
- 27.- Lodder, J. and Kreger - Van Rij, N. 1952 "The yeast a taxonomic studie" Amsterdam, North- Holland Publishing Co.
- 28.- Margulis, L. y Schwartz, K. 1981 "Cinco reinos; guía ilustrada de los phyla de la vida en la tierra" Universidad de Massachusetts, Boston U.S.A.
- 29.- Millard D.G. 1982 "Rapid purification of alcoholic yeast" *Biotechnology Letters* 4:601-606.
- 30.- Miller, J. L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar" *Anal. Chem.* Nov.: 426 - 428 (1958)
- 31.- Monroe, O y Viniestra G. compiladores 1981. "Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos" capítulo 1 (introducción: consideraciones económicas sobre el aprovechamiento de los desperdicios ganaderos y agroindustriales) pag. 19 - 29. Agt Editor, S.A. Mexico, D.F.
- 32.- Morrison and Boyd 1970 "Química orgánica" Parte tres Biomoléculas capítulo

- 34 (carbohidratos, monosacáridos) pag. 1097 - 1135. Fondo Educativo Interamericano, Mexico D.F.
- 33.- Prescott, S. C. and Dunn, C. C. 1940 "Industrial Microbiology" Cap. 3 (The production of industrial alcohol by fermentation) pag. 40 - 66 Mc.Graw Hill, New York. U.S.A.
- 34.- Kretzschmar, H. 1961 "Levaduras y Alcoholes" Ed. Revertre, S. A. Barcelona España.
- 35.- Rose, A. H. 1977 "Alcoholic Beverages" Vol.1 y 2 Ed. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- 36.- Ruiz de Velasco F. 1937 "Historia y evoluciones del cultivo de la caña y la industria azucarera en México, hasta el año de 1910 por el Ingeniero Felipe Ruiz de Velasco". Publicaciones de Azúcar S. A. Editorial Cultura. México, D. F.
- 37.- Solomons, G. L. 1969 "Materials and Methods in Fermentation" Cap. 3 (Constituents of fermentation culture medium) pag. 115 - 132. Academic Press, London and New York.
- 38.- Sumner J.B. 1921 "Dinitrosalicilic Acid: a Reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine" J.Biol. Chem. 47: 4-9.
- 39.- Sumner, J. B. "The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicilic acid" J. Biol. Chem. 62: 287 - 290 (1924).
- 40.- Sumner, J. B. and Somers, G. 1944 "Laboratory experiments in biological chemistry." Academic Press, New York.
- 41.- Von Bremen L. and Schmolzi M. 1986 "Economics and politics of the ethanol market" *Tibitech* (January): 16-23
- 42.- Wang I. C. et. al. 1979 "Fermentation and Enzyme Technology" Cap. 6 (Fermentation Kinetics) pag. 66 John Willey and Sons. New York, U.S.A.
- 43.- Wasungu, K. M. and Simard, R. E. "Growth Characteristics of bakers' yeast in ethanol" *BioTech. and Bioing.* 24: 1125 - 1134 (1982).