



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENERGÍA

ANÁLISIS CINÉTICO DE LA FERMENTACIÓN  
DE AZÚCARES DE DERIVADOS DE CAÑA DE  
AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*)  
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN INGENIERÍA

ENERGÍA - FUENTES RENOVABLES

P R E S E N T A :

BIANCA YADIRA PÉREZ SARIÑANA

TUTOR:

DR. SEBASTIAN PATHIYAMATTOM JOSEPH



2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dra. Eapen Delfeena

Secretario: Dr. Pathiyamattom Joseph Sebastian

Vocal: Dr. Manzini Poli Fabio

1<sup>er</sup> Suplente: Dr. Gamboa Sánchez Sergio Alberto

2<sup>do</sup> Suplente: Dr. Saldaña Trinidad Sergio

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENERGÍA - UNAM**

**TUTOR DE TESIS**

**Dr. Pathiyamattom Joseph Sebastian**

-----  
FIRMA

---

# Dedicatoria

---

*A Dios, Elpidio, María Dolores, Jesús, Aldo, Diana y Johana*

*Les amo*



---

# Agradecimientos

---

A Dios y a mi amada familia, quienes estuvieron conmigo en todo momento ofreciéndome su apoyo, comprensión y amor.

A mi asesor, Dr. Sebastian Pathiyamattom Joseph, quien me ofreció su paciencia y apoyo para este trabajo.

A mi amigo, Dr. Sergio Saldaña Trinidad, quien es, junto con el Dr Sebastian el principal reponsable de que el proyecto de investigación se haya llevado acabo.

A la Dra. Delfeena Eapen, revisora de mi tesis, por su particular punto de vista y muy interesantes comentarios enfocados a darle forma y sustento a este trabajo.

Al Dr. Fabio Manzini Poli, revisor de mi tesis, por el apoyo y paciencia que me ha dedicado en esta última etapa.

Al Dr. Sergio gamboa, también revisor de mi tesis, por el apoyo que me ha brindado en esta última fase del trabajo.

A la Dra. Peggy Álvarez Gutiérrez, quien me ha apoyó sin reservas durante el desarrollo experimental.

A CONACYT, quien me otorgó una beca para realizar los estudios de maestría

Al personal e instalaciones del CIE-UNAM y la UP-Chiapas, quienes me brindaron todo el apoyo y abrieron las puertas para llevar a cabo la investigación.

A mis amigos del CIE, quienes han hecho agradable la aventura de hacer una tesis, Luis Fernando, Alejandro, Andrés, Toñis, Fábian, Edgar y Lorena.

IV

A mis pastores, Iván Madrigal y Carmita Jiménez, quienes han estado conmigo y me han tenido mucha paciencia y comprensión.

A mis amigos y hermanos, Cony, Amilcar, Verónica, Angélica, Leydi y Viviana.

A todos

Gracias

---

# Contenido

---

<b>Nomenclatura</b>	<b>XIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>XV</b>
<b>Abstract</b>	<b>XVII</b>
<b>Organización de la tesis</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1. Fermentación alcohólica y Bioetanol . . . . .	4
1.2. Caña de Azúcar . . . . .	4
1.2.1. Jugo de caña de azúcar . . . . .	5
1.2.2. Melaza de caña de azúcar . . . . .	5
1.3. Microorganismo fermentativo . . . . .	6
1.3.1. Ciclo de crecimiento del Microorganismo . . . . .	6
1.3.2. Requerimientos nutricionales . . . . .	7
1.3.3. Células viables . . . . .	8
1.3.4. pH y temperatura . . . . .	8
1.4. Azúcares reductores . . . . .	9
1.5. Método para la determinación de Bioetanol . . . . .	9
1.5.1. Cromatografía de gases y espectrometría de masas . . . . .	9
1.6. Metodología de superficie de respuesta (RSM) . . . . .	9
1.6.1. Diseño compuesto central (CCD) . . . . .	11
<b>2. Objetivos</b>	<b>13</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	13
2.1.1. Objetivos específicos . . . . .	13
2.1.2. Hipótesis . . . . .	13

<b>3. Metodología general</b>	<b>15</b>
3.1. Estrategia experimental . . . . .	15
3.2. Técnicas analíticas . . . . .	16
3.2.1. Preparación del Inóculo . . . . .	16
3.2.2. Conteo de células viables . . . . .	16
3.2.3. Fermentación . . . . .	17
3.2.4. Concentración de azúcares reductores . . . . .	17
3.2.5. Determinación de Bioetanol . . . . .	17
<b>4. Establecimiento del proceso de fermentación</b>	<b>19</b>
4.1. Introducción . . . . .	19
4.2. Diseño experimental . . . . .	19
4.3. Design Expert . . . . .	20
4.4. Descripción del sistema . . . . .	20
4.4.1. Acondicionamiento de la levadura y sustratos . . . . .	21
4.5. Cinética de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y cinética de reducción de azúcares reductores . . . . .	22
4.6. Cálculo de parámetros cinéticos . . . . .	22
4.6.1. Velocidad de crecimiento . . . . .	22
4.7. Medición de pH y temperatura durante el proceso . . . . .	23
<b>5. Determinación de la presencia de Bioetanol</b>	<b>27</b>
5.1. Introducción . . . . .	27
5.2. Características del equipo . . . . .	27
5.3. Metodología . . . . .	27
5.4. Resultados cromatografía de gases . . . . .	28
5.5. Rendimiento . . . . .	29
<b>6. Optimización del proceso de fermentación</b>	<b>31</b>
6.1. Introducción . . . . .	31
6.2. Disposición del diseño . . . . .	31
6.3. Análisis <i>ANOVA</i> . . . . .	31
6.4. Parámetros estimados para la producción de etanol . . . . .	32
<b>Conclusiones</b>	<b>39</b>
<b>A. Conteo de células viables</b>	<b>41</b>
<b>B. DNS</b>	<b>43</b>
<b>C. Ruta completa de Embden-Meyerhof</b>	<b>47</b>
<b>D. Fermentación</b>	<b>49</b>

<i>Contenido</i>	VII
<b>E. Preparación del medio <i>YPD</i></b>	<b>51</b>
<b>F. Preparación del medio de fermentación</b>	<b>53</b>
<b>G. Siembra de la levadura</b>	<b>55</b>
<b>H. Preparación de muestras</b>	<b>57</b>
<b>I. Dilución de azul de tripano</b>	<b>59</b>
<b>Referencias</b>	<b>60</b>



---

## Lista de Tablas

---

1.1. Clasificación científica de la caña de azúcar . . . . .	5
1.2. Clasificación científica de la levadura <i>Saccaromyces cerevisiae</i> (Tortora et al., 2007) . . . . .	6
4.1. Diseño experimental (rango de parámetros). . . . .	20
4.2. Resultado de diseño experimental para jugo y melaza de caña de azúcar usando software <i>Desigh expert</i> . . . . .	20
4.3. Acondicionamiento de la concentración de azúcares reductores en los sustratos. . . . .	22
4.4. Parámetros cinéticos calculados. . . . .	25
5.1. Los resultados obtenidos en el cromatógrafo de gases para la construcción de la curva estándar. . . . .	28
5.2. Áreas obtenidas del análisis de Bioetanol con cromatografía de gases. . . . .	30
6.1. Disposición de diseños. . . . .	35
6.2. Análisis de varianza para la producción de Bioetanol de jugo y melaza de caña. . . . .	36
6.3. Coeficientes estimados de múltiples determinaciones de la producción de etanol de jugo y melaza utilizando valores codificados . . . . .	37
6.4. Párametros óptimos. . . . .	37





---

## Lista de Figuras

---

1.1. Ciclo de crecimiento microbiano. . . . .	7
1.2. Diseño compuesto central. . . . .	12
3.1. Estrategia experimental . . . . .	15
3.2. Cámara de neubauer . . . . .	16
3.3. Colonias de <i>S. cerevisiae</i> (Objetivo de 40X). . . . .	16
4.1. Agitación orbital de 9 matraces con dos diferentes sustratos (Jugo y Melaza). . . . .	21
4.2. Sustrato A): 50, 125 y 200 g/L. . . . .	24
4.3. Sustrato B): 50, 125 y 200 g/L . . . . .	24
4.4. Efecto de la concentración de azúcares sobre la velocidad de crecimiento neto de la levadura <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	25
4.5. Medición de pH y temperatura para cada corrida de jugo y melaza . . .	26
5.1. Curva de calibración estándar de etanol absoluto. . . . .	29
6.1. Gráficos de superficie de respuesta y contorno que muestran el efecto de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores y Bioetanol . .	33
6.2. Gráficos de superficie de respuesta y contorno que muestran el efecto de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores y rendimientos. . . . .	34
6.3. Gráficos de superficie de respuesta y contorno que muestran el efecto de las concentraciones de biomasa, azúcares y la función de conveniencia . . . . .	38
B.1. Muestras con reactivo DNS. . . . .	45
B.2. Curva de calibración estándar de fructosa usada para medir azúcares reductores en jugo de caña de azúcar. . . . .	46
B.3. Curva de calibración estándar de fructosa usada para medir azúcares reductores en melaza de caña de azúcar. . . . .	46
E.1. Medio <i>YPD</i> líquido en tubos falcon y sólido en cajas petri. . . . .	52

G.1. Crecimiento de la levadura <i>S. cerevisiae</i> en medio <i>YPD</i> líquido y sólido.	56
--	----

---

# Nomenclatura

---

---

## Nomenclatura usada en el trabajo

---

<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometer (Cromatógrafo de Gases - Espectrómetro de Masas)
TIC	Total Ion Current (Corriente iónica total)
YPD	Yeast extract - Peptone - Dextrose (Extracto de levadura - Peptona - Dextrosa)

---

g/L	Gramos por litro	Concentración
m <sup>3</sup>	Metro cúbico	Volumen
mL	Mililitro	Volumen
mm	Milímetro	Longitud
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico	Volumen
mM	Milimolar	Concentración molar
PJ	Petajoules	Energía

---

$\mu\text{L}$	Microlitro	Volumen
$\mu\text{M}$	Micromolar	Concentración molar
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados	Temperatura

---

---

# Resumen

---

El bioetanol es un tipo de combustible renovable que puede producirse a partir de materias primas agrícolas con un alto contenido de azúcar. Puede ser producido a partir de cultivos muy comunes, como la caña de azúcar.

Microorganismos como la levadura *Saccaromyces cerevisiae* puede producir bioetanol a través de fermentación alcohólica en ausencia de oxígeno mediante la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de bioetanol y dos moléculas de dióxido de carbono.

El objetivo de este trabajo fue analizar y evaluar el proceso de fermentación de azúcares de derivados de caña de azúcar con el fin de generar y caracterizar las variables biológicas y físico-químicas a escala matraces de fermentación.

El diseño experimental de  $2^2$  factorial se hizo con la concentración de sustrato y biomasa inicial como variable con cinco niveles para cada parámetro. Un diseño compuesto central se realizó para establecer la formulación de los medios y las condiciones de fermentación. Los resultados muestran la cinética de la fermentación de bioetanol a partir de jugo y melaza de caña de azúcar como sustrato.

Biomasa, producción de bioetanol, consumo de sustrato y variables físico-químicas tales como el pH y temperatura fueron analizadas. Parámetros de la fermentación tales como velocidad máxima de crecimiento específico y rendimiento fueron estimados.



---

# Abstract

---

Bioethanol is a form of renewable fuel that can be produced from agricultural feedstocks with a high sugar content. It can be produced from very common crops such as sugar cane.

Microorganisms like yeast *Saccharomyces cerevisiae* can produce bioethanol through fermentation in the absence of oxygen by converting a molecule of glucose into two molecules of ethanol and two molecules of carbon dioxide.

The objective of this study was to analyze and evaluate the process of fermentation of sugars derived from sugar cane in order to generate and characterize the biological variables and physical-chemical scale fermentation flasks.

A  $2^2$  factorial experimental design was made using substrate concentration and biomass as variable with five levels for each parameter. A Central composite design was run to establish media formulation and fermentation conditions. Results show the kinetics of fermentation of ethanol from juice and sugar cane molasses as substrate.

Biomass, bioethanol production, substrate consumption and physical-chemical variables such as pH and temperature were analyzed. Fermentation parameters such as specific growth speed and yield were estimated.

---

# Organización de la tesis

---

La tesis se encuentra dividida en los siguientes capítulos:

1. **Introducción**

Se presentan generalidades sobre el proceso de obtención de Bioetanol a partir de derivados de caña de azúcar.

2. **Objetivos**

Se presentan el objetivo general y los objetivos específicos; que son indispensables para cumplir el objetivo general y por último la hipótesis planteada para el proyecto de investigación.

3. **Metodología general**

Se describen de manera general los materiales y métodos empleados en el trabajo.

**Resultados y discusión**

Aquí se presentan los resultados y discusión para cada uno de los objetivos específicos planteados en el documento.

Cada sección de la tesis está conformada por una pequeña introducción al tema en particular, la metodología seguida en esta parte de la investigación, los resultados principales y su discusión.

4. **Establecimiento del proceso de fermentación**

Se diseñó y se llevó a cabo el experimento siguiendo la metodología general; se analizaron parámetros cinéticos obtenidos.



5. **Determinación de la presencia de Bioetanol**

Se describió el proceso para determinar el porcentaje de Bioetanol en cada muestra.

6. **Optimización del proceso de fermentación**

Se realizó el análisis *ANOVA* para determinar parámetros óptimos en derivados de caña de azúcar.

7. **Conclusiones**

Finalmente se presentan las conclusiones generales de la tesis.

---

# Capítulo 1

## Introducción

---

De acuerdo con el Balance Nacional de Energía 2008, las reservas nacionales probadas de hidrocarburos indica que son suficientes para satisfacer la producción actual de petróleo por 10 años.

Menciona también que el consumo final total de energía en el sector transporte fue de 2,427.54 PJ, 12.4 % por arriba del año 2007. Este aumento fue producto de un mayor consumo en el autotransporte, que registró 269.6 PJ más que en 2007.

Los mayores incrementos en relación al consumo de energéticos, fueron los correspondientes a gasolinas y diesel, con variaciones porcentuales de 15.2 % y 11.6 %, respectivamente (SENER, 2009).

En cuanto a las emisiones de dióxido de carbono per cápita en México en el 2007 fue 1.20 toneladas métricas<sup>1</sup> de carbono y las emisiones de los combustibles en el transporte fue 3276 miles de toneladas métricas de carbono (Boden et al., 2010).

Una alternativa a esta demanda de combustibles, es el aprovechamiento sustentable de la biomasa como fuente de energía (bioenergía). La bioenergía tiene un posibilidad de llegar a ser una pieza importante en los sistemas de energía sustentables, contribuyendo en la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero, promoviendo el desarrollo sustentable y gradualmente pueden reemplazar a los combustibles fósiles.

El etanol derivado de biomasa<sup>2</sup>, es una de las formas modernas de bioenergía, tiene el potencial de ser un combustible para el transporte sustentable, así como un oxígeno de combustible que puede reemplazar la gasolina (Kim and Dale, 2004).

---

<sup>1</sup>1 tonelada métrica= 1000 kilogramos

<sup>2</sup>Bioetanol

En una prospectiva, la Secretaría de Energía recomienda producir biotanol a partir de caña de azúcar, en este estudio se menciona un programa de introducción gradual del bioetanol con tres escenarios. El primer escenario (2007-2012) se tendría como meta producir 411.9 miles de  $m^3$  de bioetanol, el cual se obtendría principalmente de mieles de caña de azúcar y se dirigiría a reemplazar MTBE<sup>3</sup> y TAME<sup>4</sup> para fabricar ETBE<sup>5</sup>. El etanol como componente del ETBE fabricado en México correspondería a una penetración del 5.7% en volumen de un porcentaje de las gasolinas suministradas a las Zonas Metropolitanas.

Para 2012, y sobre la base de etanol de jugo de caña de azúcar, podría tener lugar la sustitución del 5.7% de todas las gasolinas de las áreas metropolitanas.

De 2012 en adelante, y sobre la base de caña de azúcar y otros posibles insumos, como el cultivo múltiple anual sorgo dulce o maíz, el 10% de todas las gasolinas en México podría ser reemplazado por etanol (SENER, 2006).

## 1.1. Fermentación alcohólica y Bioetanol

La fermentación alcohólica es un conjunto de transformaciones bioquímicas por lo cual los azúcares contenidos diferentes productos vegetales tales como: caña de azúcar, cereales, sorgo, entre otros; mediante la acción de levaduras se transforman en Bioetanol. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa.

Estequiometricamente: una molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de etanol ( $C_2H_5OH$ ) y dos de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), *ecuación 1.1*.



El bioetanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión (FAO, 2008).

## 1.2. Caña de Azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum Officinarum figura 1.1*) es un cultivo tropical que se desarrolla en lugares cálidos y con adecuadas cantidades de agua, lo que favorece en gran medida a su crecimiento; por ello, este tipo de plantaciones se ha desarrollado de manera óptima en el país considerándosele como un cultivo relevante no solo a nivel nacional, en el estado de Chiapas se han visto buenos resultados.

---

<sup>3</sup>MTBE (Metil-Ter-Butil-Eter) es uno de los sustitutos del plomo en la gasolina.

<sup>4</sup>TAME (Ter-Amil-Metil-Eter) sustituto del plomo en la gasolina.

<sup>5</sup>ETBE (Etil-Ter-Butil-Eter) es un éter derivado de corrientes como butano y etanol de características similares al MTBE (Ruiz, 2007)

Se considera a la caña de azúcar como el sexto cultivo más importante por la superficie cosechada, superado por el maíz, frijol, sorgo, trigo y café. En el 2008, México ocupó el sexto lugar mundial en producción de caña después de Pakistán; también es importante mencionar que los campos cañeros se encuentran distribuidos en 15 estados de la República: Campeche, Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz.

La superficie cosechada en Chiapas ha crecido 55 %, al igual que su producción que incrementó 165 %, debido a líneas estratégicas y proyectos como el Fomento a la Productividad, Calidad y Sustentabilidad, Desarrollo de la Investigación y Transferencia de Tecnología, Impulso a la Capacitación y Asistencia Técnica, entre otros; que han servido para lograr el mejor y mayor rendimiento de las plantaciones.

Esta planta se ha utilizado como materia prima para una amplia gama de productos, algunos de los cuales han servido para sustituir a otros que afectan al medio ambiente; la importancia de este cultivo en México se debe a que es uno de los sistemas-producto agrícola mas sobresalientes en cuanto a superficie cultivada a nivel nacional, ya que se cuenta con aproximadamente 690 mil hectáreas, según datos que aporta la Cámara Nacional de la Industria Azucarera y Alcoholera en el 2009 (CNIAA, 2009).

La caña tiene la siguiente clasificación científica (Bakker, 1999):

Tabla 1.1: Clasificación científica de la caña de azúcar

Reino:	<i>Plantae</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Orden:	<i>Poales</i>
Familia:	<i>Poaceae</i>
Tribu:	<i>Andropogoneae</i>
Género:	<i>Saccharum</i>
Especie:	<i>Officinarum</i>

### 1.2.1. Jugo de caña de azúcar

Después de cosechar la caña de azúcar, esta se hace pasar a través de cuchillas desmenuzadoras, para luego pasar al trapiche<sup>6</sup>; es así como se extrae el jugo.

El jugo de la caña es la principal fuente de azúcar.

### 1.2.2. Melaza de caña de azúcar

La melaza de caña de azúcar es un residuo agroindustrial líquido que se obtiene como desecho de la fabricación de azúcar partir del jugo de caña de azúcar (Cazetta

<sup>6</sup>Molino para extraer el jugo de algunos frutos de la tierra, como la caña de azúcar (RAE, 2001)

et al., 2007), en el cual las impurezas y los azúcares reductores impiden la cristalización del azúcar residual.

### 1.3. Microorganismo fermentativo

Históricamente, el microorganismo más utilizado ha sido la levadura. Entre las levaduras; *Saccaromyces cerevisiae* Y2034 (Figura 1.2), puede producir etanol para dar una concentración tan alta del 18 % del caldo de fermentación. Es la preferida para la mayoría de las fermentaciones de etanol, y para realizar este trabajo no es la excepción. Y al igual que con muchos microorganismos, *S. cerevisiae* metaboliza la glucosa por vía *Embden-Meyerhof* (Lin and Tanaka, 2006) (véase apéndice C en la página 47).

Teóricamente el rendimiento estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO<sub>2</sub> por 1 g de glucosa (Pereira et al., 2010).

Tabla 1.2: Clasificación científica de la levadura *Saccaromyces cerevisiae* (Tortora et al., 2007)

Reino:	<i>Fungi-Mycetae</i>
División:	<i>Amastigomycota-Eumycota</i>
Clase:	<i>Ascomycetes-Hemiascomycete</i>
Orden:	<i>Endomycetales-Saccharomycetales</i>
Familia:	<i>Saccharomycetaceae-Endomycetaceae</i>
Género:	<i>Saccharomyces</i>
Especie:	<i>Cerevisiae</i>

#### 1.3.1. Ciclo de crecimiento del Microorganismo

En un cultivo de microorganismos en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución del número de células por una unidad de tiempo determinada.

- Fase lag o de adaptación: Durante esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales poder iniciar un crecimiento exponencial.
- Fase exponencial: En esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de duplicación ( $td$ ) es mínimo. Por lo tanto los microorganismos consumen nutrientes del medio a velocidad máxima. La evolución del número de células durante esta fase se explica con el modelo matemático inscrito en la figura 1.1 donde  $X$  es el número de células,  $t$  es el tiempo y  $\mu$  es la velocidad de crecimiento.

- Fase estacionaria: En la fase estacionaria no se incrementa el número de microorganismo. Las células en esta fase desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial. Es decir el número de células con respecto al tiempo es igual a cero.
- Fase de muerte: Se produce una reducción del número de células viables en el medio; el modelo matemático expresa el número de células con respecto al tiempo  $-kX$ , donde:  $-k$  es la constante que representa la disminución de estas células.

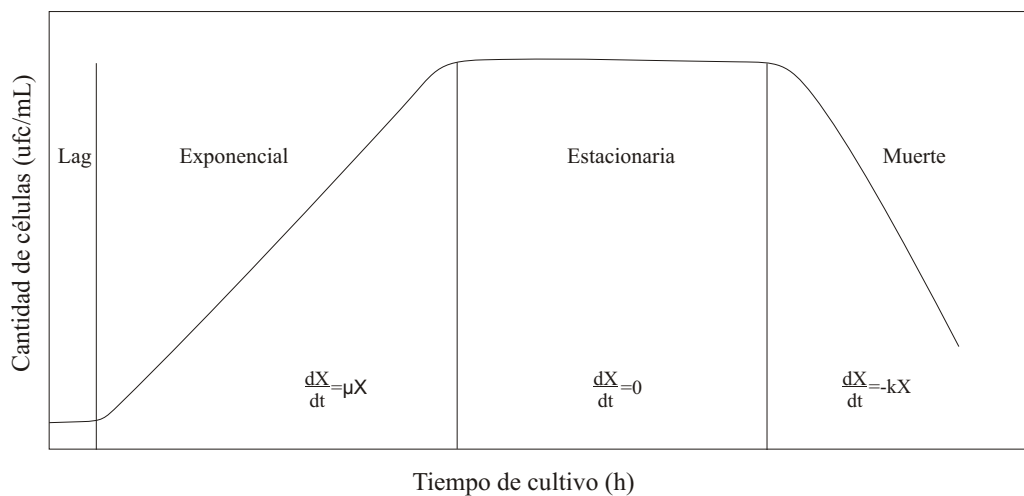


Figura 1.1: Ciclo de crecimiento microbiano.

### 1.3.2. Requerimientos nutricionales

- Carbono: Los compuestos carbonados son utilizados a la vez como fuente de energía, las fuentes de carbono usadas por *Saccharomyces cerevisiae* son D-azúcares como: hexosa, glucosa, fructosa, manosa, etc., porque los L-azúcares pueden ser considerados no fermentables por esta levadura (Flanzy, 2003).
- Nitrógeno: Este elemento es un constituyente en los medios de cultivo para promover el crecimiento; *S. cerevisiae* es capaz de utilizar el nitrógeno en forma de ión amonio. Los iones amonio pueden ser aportados en el medio por el nitrato de amonio, fosfato de amonio y sobretodo el sulfato de amonio que provee además una fuente de azufre asimilable  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ .
- Fósforo: El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones ortofosfato  $(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ , es esencial para el crecimiento y regula la síntesis de los lípidos y los carbohidratos.

- Azufre: Constituye el 0.4% del peso seco de las levaduras. La fuente de azufre más utilizada por *S. cerevisiae* es el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfato.
- Elementos traza: Macronutrientes. K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl. Se requiere en concentraciones de 0.1 – 1 mM.
- Potasio: Las fuentes de potasio son el cloruro potásico y los fosfatos mono y dipotásico. A pH ácidos estimula la fermentación y la respiración, actúa como efector de numerosas enzimas: piruvato quinasas, aldolasa, aldehído deshidrogenasa y permeasa e interviene en la estructura de los ARN.
- Magnesio: Es utilizado como activador de las enzimas glicolíticas, estimula la síntesis de ácidos grasos, regula las ATPasas de las membranas y participa con el potasio en la penetración del fosfato. El magnesio es aportado en el medio de cultivo en forma de sulfato o de cloruro de magnesio.
- Microelementos: Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, Va. Se requieren concentraciones 0.1 - 100  $\mu\text{M}$ . Inhibidores, los cuales pueden afectar el crecimiento de la levadura cuando se encuentran en concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$ : Hg, Ag, Ar, Ba, Li, Ni, Os, Pb, Se, Te.
- Otros compuestos: Inositol, pantotenato, vitamina B6 o piridoxina, tiamina (vitamina B1) y biotina. Otras vitaminas: ácido fólico, ácido p-amino benzoico y riboflavina.

### 1.3.3. Células viables

Para que la levadura pueda ser utilizada eficientemente sólo se utilizan las células viables, existen varios métodos para diferenciar entre células vivas y muertas.

El procedimiento más utilizado es la prueba de exclusión del colorante. Este método se basa en el supuesto de que determinados colorantes, donde este mancha sólo las células muertas, mientras que las células vivas permanecen sin teñir cuando está expuesto a estas sustancias en las suspensiones.

### 1.3.4. pH y temperatura

Para el crecimiento, la levadura tiene un intervalo de pH entre 4.5 y 5, pero el óptimo es 5 (Ostergaard et al., 2002).

Para cada tipo de levadura existe una temperatura óptima de desarrollo. Se tiene una zona independiente de la temperatura óptima en la cual la levadura aún presenta actividad; a medida que se aleja de la temperatura óptima su actividad disminuye notablemente. Pero al exponer cualquier levadura a una temperatura superior a 45 °C se produce su muerte. En el caso de *saccharomyces cerevisiae* 30 °C es la temperatura óptima para su desarrollo. (Olsson and Ahring, 2008).

## 1.4. Azúcares reductores

Monosacárido o disacárido que puede ceder electrones a otras moléculas y puede, por tanto, actuar como agente reductor. La presencia de un grupo cetona (-CO-) o aldehído (-CHO) libre permite a la mayoría de los monosacáridos y polisacáridos actuar como azúcares reductores (Julián et al., 2003).

El método DNS o ácido 3,5 dinitrosalicílico es la técnica de óxido-reducción más empleada para determinar la concentración de azúcares reductores.

## 1.5. Método para la determinación de Bioetanol

### 1.5.1. Cromatografía de gases y espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Gutiérrez and Droguet, 2002).

## 1.6. Metodología de superficie de respuesta (RSM)

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una herramienta eficaz para proporcionar una visión práctica en el desarrollo de nuevos procesos y la optimización de ellos. RSM es una colección de métodos estadísticos y matemáticos que son útiles para el modelado y el análisis de problemas de ingeniería. En esta técnica, el objetivo principal es optimizar la superficie de respuesta que es influenciada por diversos pará-



metros del proceso. En la metodología de superficie de respuesta también se cuantifica la relación entre los parámetros controlables de entrada y la respuesta de superficie obtenida. (Raissi, 2009).

El procedimiento de diseño de la metodología de superficie de respuesta es de la siguiente manera (Kwak, 2005):

- Diseñar una serie de experimentos para la adecuada medición fiable de la respuesta de interés.
- Desarrollo de un modelo matemático de segundo orden de superficie de respuesta con los mejores accesorios.
- Hallar el conjunto óptimo de parámetros experimentales que producen un valor máximo o mínimo de respuesta.
- representa los efectos directos e interactivos de los parámetros del proceso en dos y tres dimensiones.

Si todas las variables son apreciables, la respuesta de superficie puede ser expresada como sigue:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_3) \quad (1.2)$$

El objetivo es optimizar la variable de respuesta y esto es asumido que las variables independientes son continuas y controlables por experimentos con despreciable error. Y se requiere para encontrar una apropiada aproximación para la verdadera relación funcional entre las variables independientes y la superficie de respuesta.

Por lo general el modelo de segundo orden es utilizado en la metodología de respuesta de superficie.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_i i x_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_i j x_i x_j + \varepsilon \quad (1.3)$$

Donde  $\varepsilon$  es el error aleatorio. El coeficiente  $\beta$  que debe ser determinado en el modelo de segundo orden, es obtenido por mínimos cuadrados.

En general puede ser escrito en forma matricial.

$$y = bX + E \quad (1.4)$$

Donde  $Y$  es definido como una matriz de valores medidos,  $X$  es una matriz de variables independientes. Las matrices  $b$  y  $E$  consisten de coeficientes y errores, respectivamente. La solución puede ser obtenida por la matriz de aproximación.

$$b = (X^t X)^{-1} X^t Y \quad (1.5)$$

Donde  $X^t$  es la transpuesta de la matriz  $X$  y  $(X^t X)^{-1}$  es la inversa de la matriz  $X^t X$ .

Los modelos matemáticos son para cada respuesta por medio de un análisis de regresión lineal múltiple. El modelo empieza con un modelo cuadrático incluyendo linear, cuadrado y términos de interacción. El término significativo en el modelo fue encontrado por el análisis de varianza *ANOVA* para cada respuesta. La significancia fue juzgado por la determinación del nivel de probabilidad que el estadístico F calculado a partir de los datos, es inferior al 5%. El modelo ha sido verificado por  $R^2$ , ajustado a  $R^2$ , predicha  $R^2$  y la suma de cuadrados del error de predicción *PRESS* (Raissi, 2009).

### 1.6.1. Diseño compuesto central (CCD)

El diseño experimental más utilizado en RSM es CCD que tiene previsibilidad de igualdad en todas las direcciones desde el centro.

El diseño compuesto central (CCD) es creado a partir de un diseño factorial de nivel 2, aumentado con los puntos centrales y puntos axiales. Tiene 5 niveles para cada factor, aunque esto puede ser modificado por la elección de  $\alpha = 1.0$ . Y fue creado para la estimación de un modelo cuadrático.

Un CCD tiene tres grupos de puntos de diseño, *figura 1.2*:

1. Factoriales de dos niveles o puntos de diseño factorial fraccional: se compone de todas las combinaciones posibles de los niveles 1 y -1 de los factores. Para el caso de dos factores, hay cuatro puntos de diseño: (-1, -1) (1, -1) (-1, 1) (1, 1)
2. Puntos axiales (a veces llamada puntos *estrella*): los puntos estrellas de todos los factores establecidos en 0, el punto medio, salvo un factor que tiene el valor +/- $\alpha$ . Para un problema de dos factores, los puntos estrella son: (- $\alpha$ , 0) ( $\alpha$ , 0) (0, - $\alpha$ ) (0,  $\alpha$ )

El valor de alfa se calcula en cada diseño, tanto para rotatabilidad y ortogonalidad de los bloques. Otra de las posiciones de los puntos estrella es la cara de la porción de cubo en el diseño. Esto se conoce comúnmente como una cara centrada en el diseño compuesto central.

3. Puntos centrales: como lo implica el nombre, son los puntos con todos los niveles, con el nivel codificado 0, el punto medio de cada rango de factores: (0, 0)

Los puntos centrados se suele repetir 4-6 veces para obtener una buena estimación del error experimental (error puro). Por ejemplo, con dos factores en el diseño se creará cinco puntos centrales de forma predeterminada. El punto central replicado proporciona una excelente capacidad de predicción cerca del centro del espacio de diseño (en el que se presume es óptima).

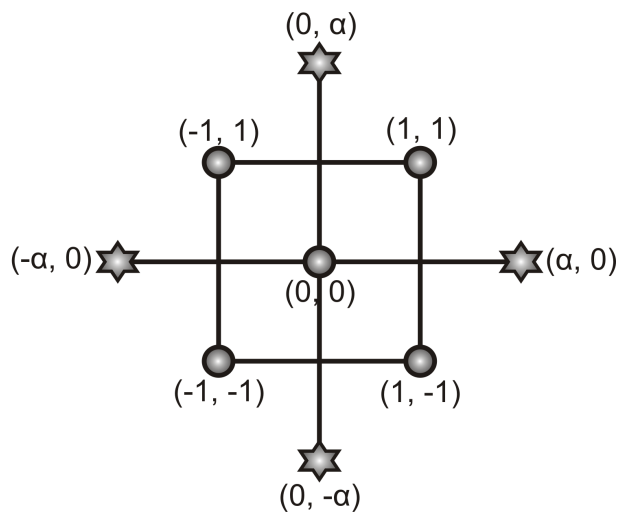


Figura 1.2: Diseño compuesto central.

En *resumen*: el diseño compuesto central requiere 5 niveles de cada factor:  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $1$  y  $\alpha$ .

Uno de los atributos recomendables del diseño compuesto central es que su estructura se presta a la experimentación secuencial. (Software *Design Expert* Versión 8.0.3, Stat-Ease, Inc.)

---

# Capítulo 2

## Objetivos

---

### 2.1. Objetivo general

Evaluar y analizar el proceso de fermentación de azúcares para la producción de Bioetanol a partir derivados de caña de azúcar.

#### 2.1.1. Objetivos específicos

- Establecer un proceso de fermentación para la producción de bioetanol.
- Determinar la presencia de bioetanol en fermentado de jugo y melaza de caña de azúcar.
- Optimizar el proceso de fermentación.

#### 2.1.2. Hipótesis

Si se incrementa la concentración de biomasa y la concentración de azúcares reductores en los sustratos, es posible obtener la máxima concentración de bioetanol y optimizar el sistema.



---

## Capítulo 3

# Metodología general

---

### 3.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental para este estudio se realizó de acuerdo a los objetivos planteados en el *capítulo 2*.

Para evaluar el sistema de producción primero se necesita establecer el proceso de fermentación con la ayuda de técnica analíticas; luego determinar la concentración de Bioetanol y optimizar el sistema usando un software de diseño (*figura 3.1*).

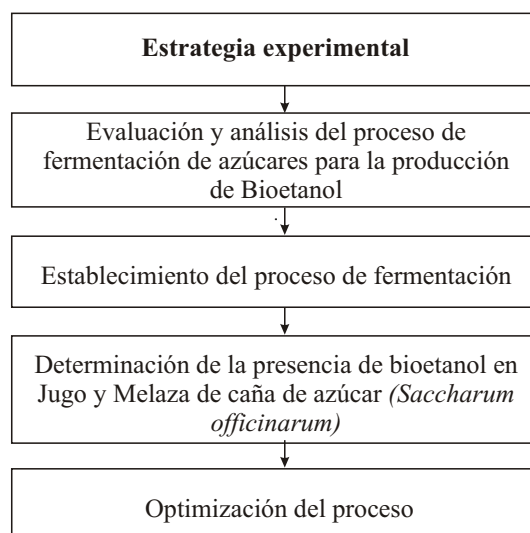


Figura 3.1: Estrategia experimental

## 3.2. Técnicas analíticas

### 3.2.1. Preparación del Inóculo

Con el objetivo de favorecer el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobre un medio rico en nutrientes, se realizó la preparación de cajas petri y tubos inclinados con medio de cultivo *YPD* el cual contiene peptona de caseína al 2%, agar bacteriológico al 2%, dextrosa al 2% y extracto de levadura al 1%. Para ello se tomó una colonia de *S. cerevisiae* y se sembró en cajas y tubos, las cuales se incubaron a 28°C por 48 horas. El mismo procedimiento se uso para el medio *YPD* líquido pero sin agregar agar bacteriológico.

- *Acopio e incubación de la levadura*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* Y2034 fue obtenida del laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

- *Siembra de la levadura*

### 3.2.2. Conteo de células viables

Para determinar la densidad de células se empleó una cámara de conteo celular. *Cámara de Neubauer*: es un portaobjetos cuadrado de 3 x 3 mm adaptada a un microscopio óptico, con una separación entre líneas consecutivas de 0.25 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie de 1 x 1 mm, de forma tal que cuando se cubre con un cubreobjetos el volumen comprendido entre la superficie central y el cubreobjetos es de 0.1 mm<sup>3</sup> equivalenante a 0.1  $\mu$ l (*figura 3.3*).

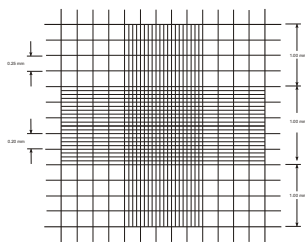


Figura 3.2: Cámara de Neubauer



Figura 3.3: Colonias de *S. cerevisiae* (Objetivo de 40X).

Existen varios métodos para diferenciar entre células vivas y muertas en las suspensiones.

El procedimiento más utilizado es la prueba de exclusión del colorante. Este método se basa en el supuesto de que determinados colorantes, por ejemplo: azul de tripano, azul de metileno, naranja de acridina, eosina, nigrosina safranina, etc. manchan sólo

las células muertas, mientras que las células vivas permanecen sin teñir cuando está expuesto a estas sustancias en las suspensiones. Para este trabajo se utilizará azul de tripano, las técnica de preparación de azul de tripano y conteo de células viables se describen en los *apéndices I y A en las páginas 59 y 41* respectivamente. (Tolnai, 1975)

Se utilizó *la ecuación 4.1* de concentración para agregar la cantidad de células iniciales al sustrato a fermentar.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (3.1)$$

Donde:

$C_1$  = Concentración de células

$V_1$  = Volumen de inóculo

$C_2$  = Concentración de células deseada

$V_2$  = Volumen de sustrato a fermentar

### 3.2.3. Fermentación

A los sustratos utilizados como base para la preparación del medio de fermentación, se les adicionaron sales sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y extracto de levadura, a concentraciones de 0.02 g/L, 0.2 g/L y 2 g/L, respectivamente (*veáse apéndice F en la página 53*).

El proceso de fermentación se realizó por triplicado con los dos sustratos en matraces de 250 mL con agitación constante a temperatura ambiente. El volumen final empleado para las fermentaciones fue de 150 mL durante 24 horas, monitoreando biomasa, azúcares reductores, temperatura y pH (*veáse apéndice D en la página 49*).

### 3.2.4. Concentración de azúcares reductores

DNS o ácido 3,5 dinitrosalicílico: es una técnica de óxido-reducción en la que el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido mientras que el grupo aldehído del monosacárido es oxidado. La reducción del reactivo genera una coloración amarilla la cual es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes, esto se evidencia por medio de la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro (Miller, 1959). (*Veáse apéndice B en la página 43*)

### 3.2.5. Determinación de Bioetanol

Para determinar la concentración de etanol, se tomó una muestra de 1000  $\mu\text{L}$  en fase acuosa, se centrifugó a 3000 x  $g$  durante 15 minutos a 5 °C, el sobrenadante se cambió a un tubo nuevo (Navarro et al., 2000) y se desechó el precipitado.



Posteriormente se analiza por cromatografía de gases *CG*, (*Agilent technologies 6850* y sistema de adquisición de datos con software de computadora *Agilent Curity A.02.01.*) *Veáse apéndice H en la página 57.*

---

## Capítulo 4

# Establecimiento del proceso de fermentación

---

### 4.1. Introducción

En este capítulo se describe el proceso de fermentación y su establecimiento como sistema de producción de Bioetanol, se usó la metodología experimental del *capítulo 3* y se elaboró un diseño experimental.

### 4.2. Diseño experimental

El diseño se realizó basado en el estado del arte de biocombustibles y la tecnología disponible. Se utilizó el software *Design Expert* (Versión 8.0.3, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, EE.UU.) que se fundamenta con la metodología de respuesta de superficie (RSM) basado en el diseño compuesto central  $2^2$  factorial (CCD), aplicado para optimizar la fermentación de bioetanol.

Para el diseño se tomaron en cuenta dos variables de entrada y una de salida; concentración de Biomasa inicial, concentración de azúcares reductores iniciales y concentración de etanol respectivamente, cada variable varía en cinco niveles (alfa ( $\alpha$ ) = 1).

### 4.3. Design Expert

Para hacer diseño se asignan las variables, unidades de medida, rango de valores y parámetro  $\alpha$ .

El resultado fue 13 corridas, este diseño se utilizó para A) jugo y B) melaza de caña de azúcar *tabla 4.2*

Tabla 4.1: Diseño experimental (rango de parámetros).

Variables	Unidades	Bajo	Alto	$-\alpha$	$\alpha$
Concentración de Inóculo	ufc/ml	1E+07	3E+07	-1	1
Concentración de azúcares reductores	g/l	50	200	-1	1

Tabla 4.2: Resultado de diseño experimental para jugo y melaza de caña de azúcar usando software *Design expert*.

Concentración del Biomasa (ufc/ml)	Concentración de Azúcares reductores (g/L)	Concentración de Bioetanol (g/L)
$3.0 \times 10^7$	200	
$2.0 \times 10^7$	125	
$1.0 \times 10^7$	50	
$3.0 \times 10^7$	50	
$2.0 \times 10^7$	50	
$2.0 \times 10^7$	125	
$3.0 \times 10^7$	125	<i>Variable de salida</i>
$2.0 \times 10^7$	125	
$2.0 \times 10^7$	200	
$1.0 \times 10^7$	200	
$2.0 \times 10^7$	125	
$1.0 \times 10^7$	125	
$2.0 \times 10^7$	125	

*Variable de salida*, los resultados de C. de Bioetanol se presentan en el *Capítulo 5*

### 4.4. Descripción del sistema

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó un agitador orbital para 9 matraces de 250 mL a una velocidad de 180 rpm.

Por ser un diseño *CCD*, el programa arrojó 13 corridas repitiéndose 4; es por eso que se acotó a 9 experimentos, y utilizar un agitador con esa capacidad y disponibilidad. El experimento se hizo por triplicado, cada matraz tuvo un volumen de sustrato de 150 mL en condiciones anaerobias con temperatura y pH constantes.



Figura 4.1: Agitación orbital de 9 matraces con dos diferentes sustratos (Jugo y Melaza).

#### 4.4.1. Acondicionamiento de la levadura y sustratos

Para que la levadura *S. cerevisiae* pueda ser utilizada en el proceso de fermentación se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Preparación del medio *YPD* (véase apéndice E en la página 51)  
Preparar los medios es un requisito básico para cualquier fermentación, ya que una vez sembrada la levadura favorece su crecimiento.
- Siembra de la levadura (véase apéndice G.1 en la página 56)  
Se llevó a cabo con el objetivo de propagar la levadura en medio *YPD* sólido y líquido.
- Preparación del medio de fermentación (véase apéndice F en la página 56)  
La levadura necesita de un medio de cultivo óptimo que cuente con los nutrientes necesarios para su crecimiento y producción de bioetanol durante el proceso de fermentación.

Se hicieron diluciones debido a que la concentración de azúcares reductores contenidos en los sustratos es mayor a la concentración de azúcares inicales propuestos en este trabajo.

En la *tabla 4.3* se muestran las diluciones de jugo y melaza de caña de azúcar usadas en el proyecto.

Tabla 4.3: Acondicionamiento de la concentración de azúcares reductores en los sustratos.

	Dilución		% SST	Concentración de azúcares reductores
	Sustrato	Agua		
Jugo de caña	1	1.11 ± 0.071	20 °B	200 g/L
	1	1.20 ± 0.068	14 °B	125 g/L
	1	3.20 ± 0.234	5 °B	50 g/L
Melaza de caña	1	5.25 ± 0.35	20 °B	200 g/L
	1	7.25 ± 0.35	14 °B	125 g/L
	1	13 ± 1.41	5 °B	50 g/L

## 4.5. Cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y cinética de reducción de azúcares reductores

En esta sección se muestran los resultados de los ciclos de fermentación realizados, se presentó una fermentación sin problemas, se produce la ebullición del mosto tornándose turbio y espumoso por el  $CO_2$  que se desprende, resultado similar a lo presentado en otras investigaciones.

En las *figuras 4.2 y 4.3* el máximo número de células se observa cuando se utiliza  $3e+7$  ufc/mL iniciales. La reducción de azúcares reductores finales promedio fue de 5 g/L, 15 g/L y 19 g/L para caña (A); para melaza (B) fue de 4 g/L, 12 g/L y 18 g/L. En las dos figuras se observa claramente la fase lag en los intervalos de tiempo de 0 a 6 h, la fase exponencial tiene una duración de 12 h (6 a 18 h) y no se aprecia fase estacionaria debido a los intervalos de tiempo largos.

Entre 18 a 24 h se observa la fase de muerte en concentraciones de Biomasa de  $1e+7$  ufc/mL y  $2e+7$  ufc/mL.

## 4.6. Cálculo de parámetros cinéticos

### 4.6.1. Velocidad de crecimiento

La relación de la tasa de crecimiento específico a la concentración de sustrato a menudo toma la forma de la cinética de saturación. Aquí se supone que una sola especie química,  $S$ , es la tasa de crecimiento limitante (un aumento de  $S$  influye en la tasa de crecimiento, mientras que los cambios en las concentraciones de otros nutrientes no tienen efecto). En la cinética química tradicional o cinética Michaelis-Menten para

reacciones enzimáticas. Cuando se aplica a los sistemas celulares, estas cinéticas pueden ser descritas por la ecuación Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (4.1)$$

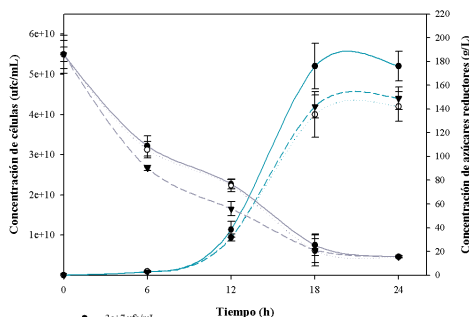
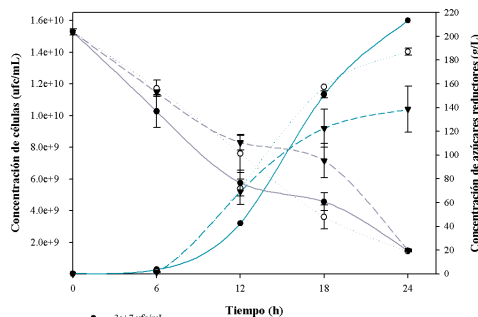
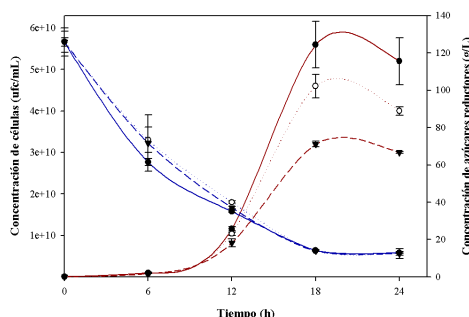
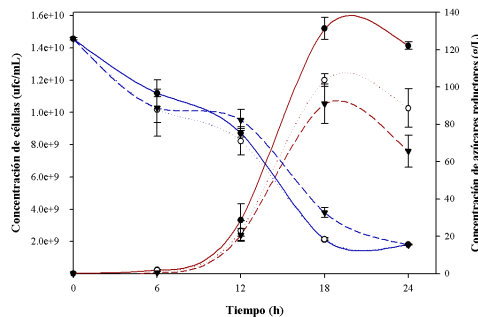
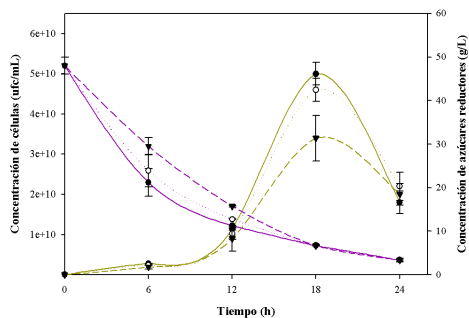
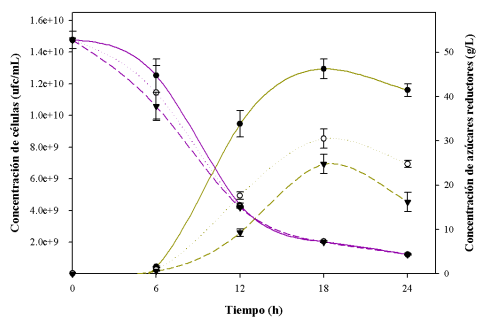
Donde  $\mu_m$  es la máxima tasa de crecimiento específico cuando  $S \gg K_s$ . Si el metabolismo endógeno es importante, entonces  $\mu = \mu_m$ . La constante  $K_s$  es conocida como la constante de saturación o la velocidad media constante y es igual a la tasa de crecimiento del sustrato limitante cuando la tasa de crecimiento es igual a la mitad del máximo (Shuler and Kargi, 2002).

En la *figura 4.4* se observan tres curvas correspondientes a la concentración inicial de Biomasa;  $1e+7$ ,  $2e+7$  y  $3e+7$  ufc/mL. La curva más pronunciada es la que comenzó con  $1e+7$  ufc/mL, por lo tanto el rendimiento en la producción de etanol es mayor.

## 4.7. Medición de pH y temperatura durante el proceso

Estas mediciones de llevaron a cabo para las dos series de fermentaciones *figura 4.5*.

El pH se mantuvo en  $5 \pm 0.5$  para cada una de las condiciones iniciales en las fermentaciones. Para la medición de temperatura el promedio fue de  $29.7$  °C y  $29.2$  °C.



● 3e+7 ufc/mL  
 ○ 2e+7 ufc/mL  
 ▼ 1e+7 ufc/mL

● 3e+7 ufc/mL  
 ○ 2e+7 ufc/mL  
 ▼ 1e+7 ufc/mL

Figura 4.2: Sustrato A): 50, 125 y 200 g/L.

Figura 4.3: Sustrato B): 50, 125 y 200 g/L

Tabla 4.4: Parámetros cinéticos calculados.

		A)				B)			
X (ufc/ml)	S (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	td (h)	$K_s$	$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	td (h)	$K_s$	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
$3.0 \times 10^7$	50	0.254	2.719			0.281	2.190		
$3.0 \times 10^7$	125	0.251	2.551	4.715	0.279	0.308	2.188	8.795	0.330
$3.0 \times 10^7$	200	0.271	2.558			0.317	2.010		
$2.0 \times 10^7$	50	0.251	2.752			0.283	2.190		
$2.0 \times 10^7$	125	0.295	2.549	11.508	0.309	0.317	2.170	10.443	0.342
$2.0 \times 10^7$	200	0.297	2.370			0.324	2.070		
$1.0 \times 10^7$	50	0.262	2.644			0.290	2.650		
$1.0 \times 10^7$	125	0.302	2.295	12.069	0.326	0.335	2.650	12.848	0.365
$1.0 \times 10^7$	200	0.303	2.281			0.340	2.450		

X Concentración de células, S Concentración de azúcares,  $\mu$  Velocidad

de crecimiento, td tiempo de duplicación,  $K_m$  Constante de saturación

$\mu_m$  Velocidad de crecimiento máxima

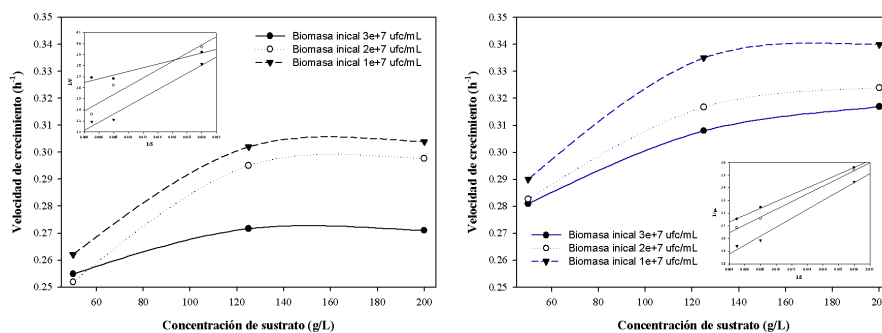


Figura 4.4: Efecto de la concentración de azúcares sobre la velocidad de crecimiento neto de la levadura *S. cerevisiae*.



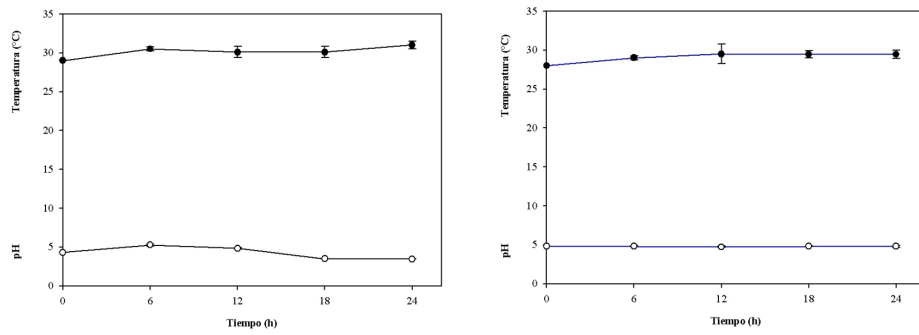


Figura 4.5: Medición de pH y temperatura para cada corrida de jugo y melaza

---

# Capítulo 5

## Determinación de la presencia de Bioetanol

---

### 5.1. Introducción

En este capítulo se presenta los resultados de los análisis de la cuantificación de bioetanol mediante cromatografía de gases y se calculó el rendimiento para cada uno de los sustratos utilizados.

### 5.2. Características del equipo

El cromatógrafo de gases utilizado fue un equipo *Agilent technologies 6850 Series* con sistema de adquisición de datos *Agilent Cerity A.02.01.*. Detector de flama de ionización (FID), utilizó helio como gas acarreador. La columna empleada para la separación de compuestos fue la columna *Agilent technologies INNOWAX*, con dimensiones, 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Metodología

#### Curva de calibración estándar de etanol absoluto

Para conocer la proporción de bioetanol en las muestras se hizo la cuantificación en un cromatógrafo de gases en el Instituto de Biotecnología-UNAM.

### Preparación de las muestras

- Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos.
- Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  del estándar externo (1-butanol, 10 g/L) en un vial de inyección.
- Los viales se colocaron en el inyector automático con 0.2  $\mu\text{L}$ .

### Análisis de resultados

- Se tomaron las áreas de los picos correspondientes al bioetanol y al estándar externo.
- Se consideró la relación de áreas para la transformación de resultados; Área del pico de bioetanol / Área del pico de 1-butanol.
- La cuantificación de la concentración de bioetanol en cada muestra se realizó utilizando una curva estándar de relación de áreas y la concentración de etanol absoluto en solución acuosa (*Figura 5.1*).

### Curva estándar de etanol absoluto

- Se realizó una curva estándar de etanol en concentraciones de 0 a 100 g/L, contra la relación de áreas pico.
- Se preparó la solución stock de etanol y 1-butanol; pesando 100 g y 10 g respectivamente. Se aforaron a 1 L con agua destilada cada uno.

Tabla 5.1: Los resultados obtenidos en el cromatógrafo de gases para la construcción de la curva estándar.

EtOH (g/L)	Área EtOH	Área 1-Butanol	$A_{EtOH}/A_{1-But}$
0	0	6634.43	0
20	9292.46	6400.48	1.45
40	18997.72	6627.96	2.84
60	28354.86	6622.46	4.28
80	38176.22	6687.6	5.71
100	47361.72	6716.5	7.05

## 5.4. Resultados cromatografía de gases

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del análisis por cromatografía de gases de las muestras de fermentado de jugo y melaza.

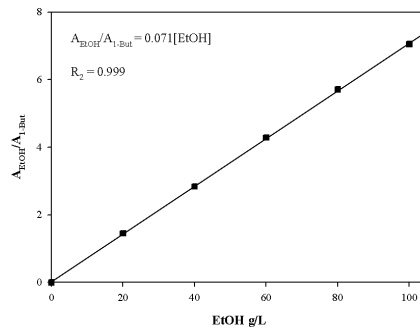


Figura 5.1: Curva de calibración estándar de etanol absoluto.

## 5.5. Rendimiento

Se usó la *ecuación 5.1* para calcular el rendimiento de las tres diferentes concentraciones de azúcar:

$$REtOH = \frac{P}{S_i - S_f} \quad (5.1)$$

Donde:

$R EtOH$  es el rendimiento de la conversión de bioetanol,  $P$  es la máxima concentración de etanol producida y  $S_i - S_f$  es la diferencia entre la concentración de glucosa inicial y residual.

Tabla 5.2: Áreas obtenidas del análisis de Bioetanol con cromatografía de gases.

Muestra	Área Etanol (U <sup>2</sup> )	Área Butanol (U <sup>2</sup> )	$A_{EtOH}/A_{But}$	Bioetanol (g/L)
A)				
1	28038.57 ± 552.78	7071.20 ± 87.98	3.96 ± 0.03	55.83 ± 0.46
2	20854.60 ± 1195.98	7085.80 ± 400.25	2.94 ± 0.01	41.43 ± 0.15
3	10958.40 ± 268.42	7113.87 ± 238.42	1.54 ± 0.02	21.73 ± 0.24
4	11165.20 ± 214.77	7149.07 ± 146.94	1.56 ± 0.00	22.03 ± 0.05
5	11317.07 ± 195.07	7402.27 ± 181.75	1.53 ± 0.01	21.53 ± 0.19
6	20854.60 ± 1195.98	7085.80 ± 400.25	2.94 ± 0.01	41.43 ± 0.15
7	21590.77 ± 3098.61	7166.90 ± 305.29	3.01 ± 0.38	42.42 ± 5.39
8	20854.60 ± 1195.98	7085.80 ± 400.25	2.94 ± 0.01	41.43 ± 0.15
9	27209.30 ± 793.55	7074.17 ± 215.15	3.85 ± 0.02	54.16 ± 0.23
10	26807.23 ± 125.53	7145.13 ± 133.63	3.75 ± 0.08	52.83 ± 1.19
11	20854.60 ± 1195.98	7085.80 ± 400.25	2.94 ± 0.01	41.43 ± 0.15
12	21031.10 ± 776.27	7264.97 ± 330.75	2.90 ± 0.04	40.76 ± 0.61
13	20854.60 ± 1195.98	7085.80 ± 400.25	2.94 ± 0.01	41.45 ± 0.15
B)				
1	27069.55 ± 709.16	6963.70 ± 186.82	3.89 ± 0.00	54.75 ± 0.03
2	18118.75 ± 106.99	6908.05 ± 55.79	2.62 ± 0.04	36.94 ± 0.52
3	9910.45 ± 331.56	6964.60 ± 181.02	1.42 ± 0.01	20.04 ± 0.15
4	9871.55 ± 619.78	6851.80 ± 464.14	1.44 ± 0.01	20.30 ± 0.10
5	10178.05 ± 102.60	7098.70 ± 54.31	1.43 ± 0.00	20.19 ± 0.05
6	18118.75 ± 106.99	6908.05 ± 55.79	2.62 ± 0.04	36.94 ± 0.52
7	18044.95 ± 739.85	6764.40 ± 327.25	2.67 ± 0.02	37.58 ± 0.28
8	18118.75 ± 106.99	6908.05 ± 55.79	2.62 ± 0.04	36.94 ± 0.52
9	26766.25 ± 1941.79	6889.60 ± 471.92	3.88 ± 0.02	54.71 ± 0.22
10	28437.55 ± 413.30	7411.90 ± 112.01	3.84 ± 0.11	54.05 ± 1.60
11	18118.75 ± 106.99	6908.05 ± 55.79	2.62 ± 0.04	36.94 ± 0.52
12	17828.60 ± 622.68	6957.85 ± 214.32	2.56 ± 0.01	36.09 ± 0.15
13	18118.75 ± 106.99	6908.05 ± 55.79	2.62 ± 0.04	36.94 ± 0.52

---

## Capítulo 6

# Optimización del proceso de fermentación

---

### 6.1. Introducción

Se presenta la disposición de diseño con los resultados del *capítulo 5*, para la producción de Bioetanol a partir de derivados de caña con un máximo rendimiento, se optimizó por RSM basado  $2^2$  factorial diseño central compuesto. Dos series de 13 experimentos se llevaron a cabo con dos variables, cada variable varía en cinco niveles ( $\alpha = 1$ ).

El modelo polinomial de segundo orden se ajustó para la producción de Bioetanol a partir de jugo ( $Y_A$ ) y melaza ( $Y_B$ ).

### 6.2. Disposición del diseño

La serie de experimentos diseñados y realizados se muestra en la *tabla 6.1*

### 6.3. Análisis ANOVA

La significación estadística de la ecuación del modelo correspondiente se comprobó mediante la prueba F de análisis de varianza (*ANOVA*, *Tabla 6.2*).

La idoneidad de los modelos fue expresada por el coeficiente de determinación,  $R^2$ , que resultó ser 1 y 0.9998 para producción de Bioetanol del sustrato A y B, respectivamente. Estos valores indican 100 % de la variabilidad de la respuesta en la producción de Bioetanol de A y 99.98 % de la variabilidad de la respuesta en producción de Bioetanol

de B. Cabe mencionar que entre más cerca de 1 esté  $R^2$ , será mejor la predicción de la respuesta. Cuanto menor sea el valor del coeficiente de variación (CV) (0.12% para la producción de Bioetanol de A y 0.62% para B), mayor es la precisión y la fiabilidad de los experimentos llevados a cabo. La probabilidad Prob para los modelos de menos de 0.0001 indicó también que los modelos eran muy significativos y Prob no significativo de la falta de ajuste para los modelos, indican que los datos experimentales obtenidos están en buen acuerdo con el modelo. Si el valor de Prob de la falta de ajuste para el modelo es significativo (Prob < 0.05), entonces se debe ajustar con otro modelo.

Las respuestas tomadas de la *Tabla 6.3* reveló que  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_1^2$ ,  $A_2^2$  son términos significativos del modelo con los valores de Prob menor de 0.05 Por otro lado,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_2^2$  son términos significativos del modelo.

## 6.4. Parámetros estimados para la producción de etanol

En la *figura 6.1* se muestra que los gráficos en 3-D de las superficies de respuesta representan gráficamente la ecuación de regresión. Usando gráficos de superficie de respuesta, la interacción entre dos variables y su nivel óptimo son fáciles de comprender y localizar. El gráfico A y B se ilustra la interacción entre las concentraciones de Biomasa, Azúcares y producción de bioetanol de jugo y melaza, respectivamente.

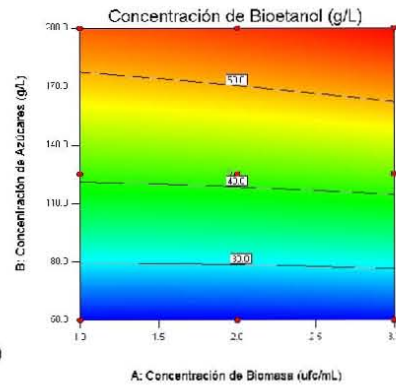
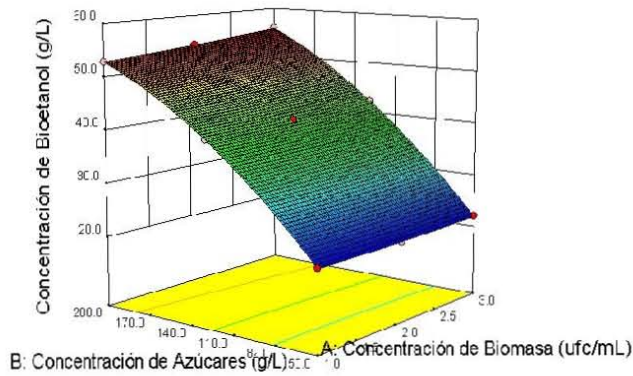
Los rendimientos de conversión de azúcar a Bioetanol se presentan en la *figura 6.2*, los resultados mostraron que un nivel óptimo (*tabla 6.4*) se observa cerca del valor inicial de concentración de biomasa y cerca del valor central de concentración azúcares reductores.

Myers y Montgomery (Metodología de Superficie de Respuesta) describen un método de respuesta múltiple llamado conveniencia (desirability). El método hace uso de una función objetivo D (*ecuación 6.1*), llamada la función de conveniencia. Que refleja los límites convenientes para cada respuesta ( $d_i$ ). Los límites convenientes son de cero a uno (de menos a más deseable, respectivamente).

$$D = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (6.1)$$

Donde n es el número de respuestas en la medida. Para la optimización simultánea de cada respuesta debe tener un valor bajo y alto asignado a cada objetivo. El campo Objetivo de las respuestas debe ser una de las cinco opciones: ninguna, máximo, mínimo, blanco, o rango. El significado de los parámetros objetivo son:

A)



B)

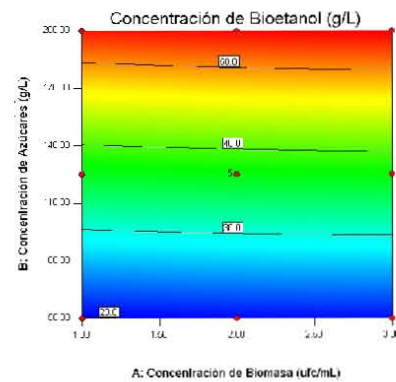
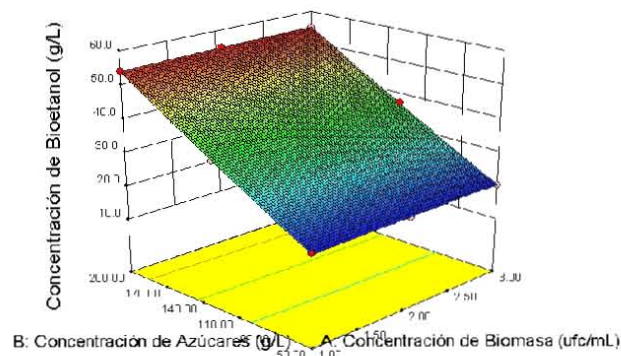


Figura 6.1: Gráficos de superficie de respuesta y contorno que muestran el efecto de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores y Bioetanol

Máximo:

$d_i = 0$  si la respuesta < Valor bajo  
 $0 \leq d_i \leq 1$  como respuesta varía de bajo a alto  
 $d_i = 1$  si la respuesta > Valor alto

Mínimo:

$d_i = 0$  si la respuesta < Valor bajo  
 $0 \geq d_i \geq -1$  como respuesta varía de bajo a alto  
 $d_i = -1$  si la respuesta > Valor alto

Blanco:

$d_i = 0$  si la respuesta < Valor bajo  
 $0 \leq d_i \leq 1$  como respuesta varía de bajo a blanco  
 $1 \geq d_i \geq 0$  como respuesta varía de blanco a alto  
 $d_i = 0$  si la respuesta > Valor alto

Rango:

$d_i = 0$  si la respuesta < valor bajo  
 $d_i = 1$  como respuesta varía de bajo a alto  
 $d_i = 0$  si la respuesta > valor alto

En este trabajo se obtuvo una conveniencia de 0.952 para el sustrato A y para el sustrato B de 0.943 como se observa en la *figura 6.3*.



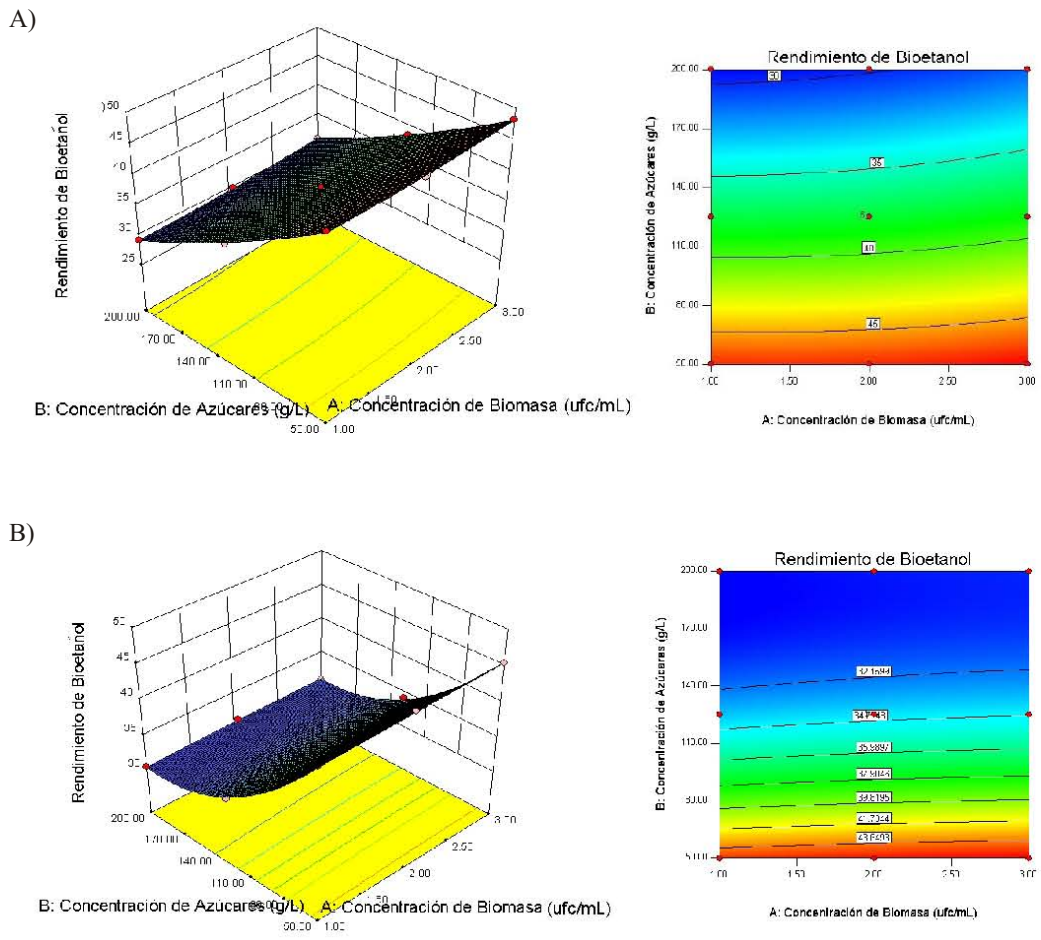


Figura 6.2: Gráficos de superficie de respuesta y contorno que muestran el efecto de las concentraciones de biomasa, azúcares reductores y rendimientos.

Tabla 6.1: Disposición de diseños.

Corrida	Factor 1		Factor 2		Respuesta 1		Respuesta 2	
	Biomasa ufc/mL		Azúcares reductores (g/L)		Bioetanol (g/L)		Rendimiento %	
	A)	B)	A)	B)	A)	B)	A)	B)
1	$3.0 \times 10^7$		200		55.833	54.750	30.929	30.839
2	$2.0 \times 10^7$		125		41.433	36.944	37.812	33.749
3	$1.0 \times 10^7$		50		21.733	20.040	47.577	44.870
4	$3.0 \times 10^7$		50		22.033	20.295	48.241	45.440
5	$2.0 \times 10^7$		50		21.533	20.194	47.103	45.247
6	$2.0 \times 10^7$		125		41.433	36.944	37.812	33.749
7	$3.0 \times 10^7$		125		42.433	37.579	38.788	34.311
8	$2.0 \times 10^7$		125		41.433	36.944	37.812	33.749
9	$2.0 \times 10^7$		200		54.167	54.711	29.928	30.828
10	$1.0 \times 10^7$		200		52.833	54.051	29.318	30.441
11	$2.0 \times 10^7$		125		41.433	36.944	37.812	33.749
12	$1.0 \times 10^7$		125		40.767	36.087	37.194	33.068
13	$2.0 \times 10^7$		125		41.433	36.944	37.812	33.749

A), Jugo

B), Melaza

Tabla 6.2: Análisis de varianza para la producción de Bioetanol de jugo y melaza de caña.

Fuente	SC <sup>a</sup>	gl <sup>b</sup>	MC <sup>c</sup>	Valor de F	Prob >F
Bioetanol de Jugo [ $R^2 = 1$ , $R^2_{\text{mod}} = 1$ , $R^2_{\text{pred}} = 0.9999$ , CV=0.12 %]					
Modelo	1630.16	5	326.03	1.34e+005	<0.0001
Residual	0.02	7	2.44e-003		
Falta de ajuste	0.02	3	5.70e-003		
Error puro	0	4	0		
Total	1630.18	12			
Bioetanol de melaza [ $R^2 = 0.9998$ , $R^2_{\text{mod}} = 0.9996$ , $R^2_{\text{pred}} = 0.9979$ , CV=0.62 %]					
Modelo	1769.26	5	353.85	6657.72	<0.0001
Residual	0.37	7	0.05		
Falta de ajuste	0.37	3	0.012		
Error puro	0	4	0		
Total	1769.64	12			

---

<sup>a</sup>SC, suma de cuadrados

<sup>b</sup>gl, grados de libertad

<sup>c</sup>MC, media cuadrada

Prob >F, Probabilidad de la falta de ajuste

CV, coeficiente de variación

Tabla 6.3: Coeficientes estimados de múltiples determinaciones de la producción de etanol de jugo y melaza utilizando valores codificados

Factor	Coeficiente estimado	Error estándar	95 % IC		Valor de F	Prob >F
			Bajo	Alto		
A) Producción de Bioetanol de jugo						
Intercepción	41.42	0.021	41.37	41.47		
A <sub>1</sub>	0.83	0.020	0.78	0.88	1683.84	<0.0001
A <sub>2</sub>	16.26	0.020	16.21	16.3	6.49e+005	<0.0001
A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	0.67	0.025	0.62	0.73	746.43	<0.0001
A <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.21	0.030	0.14	0.28	50.32	0
A <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-3.54	0.030	-3.610	-3.47	14168.12	<0.0001
$Y_A = 41.42 + 0.83A_1 + 16.26A_2 + 0.67A_1A_2 + 0.21A_1^2 - 3.54A_2^2$						
B) Producción de Bioetanol de melaza						
Intercepción	36.95	0.1	36.73	37.18		
B <sub>1</sub>	0.41	0.09	0.19	0.63	18.77	0.0034
B <sub>2</sub>	17.16	0.09	16.94	17.39	33256.75	<0.0001
B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	0.11	0.12	-0.16	0.38	0.928	0.3674
B <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0.14	0.14	-0.47	0.19	0.995	0.3517
B <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.48	0.14	0.15	0.81	12.02	0.0105
$Y_B = 36.95 + 0.41B_1 + 17.16B_2 + 0.11B_1B_2 - 0.14B_1^2 - 0.48B_2^2$						

IC, Intervalo de confianza

A<sub>1</sub> B<sub>1</sub>, concentración de Biomasa

A<sub>2</sub> B<sub>2</sub>, concentración de azúcares

Y<sub>A</sub>, concentración de Bioetanol apartir de jugo

Y<sub>B</sub>, concentración de Bioetanol apartir de melaza

Tabla 6.4: Parámetros óptimos.

	Concentración		Rendimiento	Conveniencia	
	Biomasa (ufc/mL)	Azúcares (g/L)	Bioetanol (g/L)	de Bioetanol %	
<sup>a</sup>	1.2	120.79	40	37.97	0.952
<sup>b</sup>	1.2	140.13	40	32.12	0.943

<sup>a</sup> Solución para jugo

<sup>b</sup> Solución para melaza

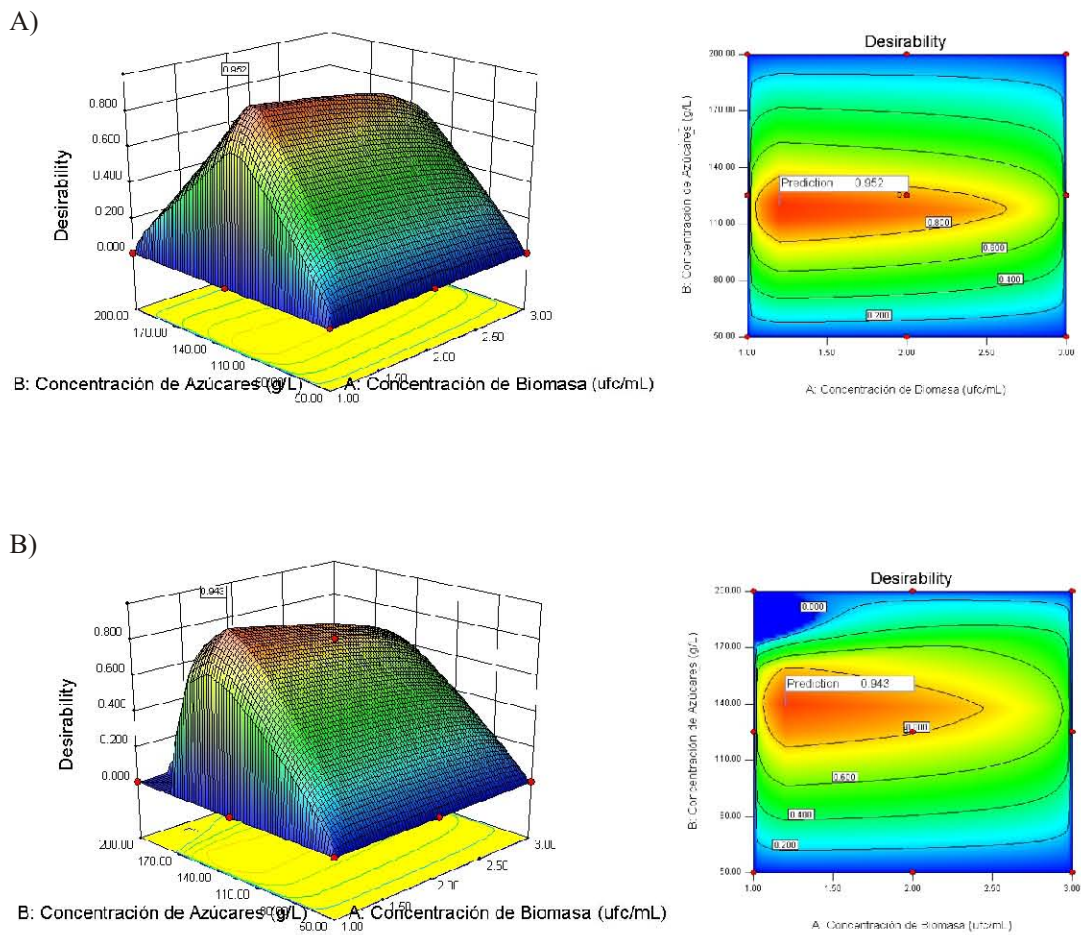


Figura 6.3: Gráficos de superficie de respuesta y contorno que muestran el efecto de las concentraciones de biomasa, azúcares y la función de conveniencia

---

## Conclusiones

---

Con base a lo estipulado en los capítulos de este trabajo investigación se puede concluir lo siguiente:

- Se estableció un proceso de fermentación para la producción de bioetanol, así como también se determinó la presencia de bioetanol de jugo y melaza de caña de azúcar por medio de cromatografía de gases.
- El principal aporte de esta tesis fue el estudiar la cinética de crecimiento para encontrar las mejores condiciones en el proceso de fermentación de jugo y melaza de caña de azúcar en el estado de Chiapas. Esto se hizo maximizando el rendimiento de conversión de azúcar a Bioetanol y la producción de este; minimizando la concentración de azúcares reductores y biomasa.
- Como se planteó en la hipótesis, si se incrementa la concentración de biomasa y la concentración de azúcares reductores en los sustratos es posible obtener la máxima concentración de bioetanol, esto se cumple pero se obtiene un mínimo rendimiento de conversión de azúcar.
- El resultado de análisis estadístico nos arrojó que la mejor condición para obtener bioetanol es usando jugo de caña de azúcar con  $1.2 \times 10^7$  ufc/mL de levaduras, 120.79 g/L de azúcares, produciéndose 40 g/L de bioetanol con un rendimiento de 37.97%.
- Por medio de la cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Y2034 y la cinética de reducción de azúcares reductores, se pudo determinar que el mejor sustrato para producir biomasa es melaza de caña de azúcar.



---

# Apéndice A

## Conteo de células viables

---

*Fundamento:* Para la realización de este proceso es necesario contar con el equipo necesario.

*Objetivo:* Determinar células viables.

Símbolos y abreviaturas	
mL	mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
min	minutos

Reactivos	
Azul de tripano	

Materiales	
Micropipeta de 100 $\mu\text{L}$	1
Micropipeta de 1000 $\mu\text{L}$	1
Piseta	1
Puntas de micropipeta de 100 $\mu\text{L}$	3
Puntas de micropipeta de 1000 $\mu\text{l}$	1
Cámara de Neubauer	1

Equipos e instrumentos	
Microscopio óptico	

*Procedimiento:*

1. Se prepara una solución de 100  $\mu\text{L}$  de medio fermentado y 1000  $\mu\text{L}$  de agua destilada (1:10).
2. Se extraen 10  $\mu\text{L}$  y se descargan sobre la cámara de Neubauer.
3. Añadir 1 gota de azul de tripano.
4. Dejar reposar durante 1 min.
5. Colocar por encima un cubreobjetos y enfocar el microscopio óptico con el objetivo a 40x.
6. Se cuenta el número de células de la siguiente forma:

$$\text{Células viables} = \frac{\text{cel}}{\text{vol}} \frac{1\text{mm}^3}{0,001\text{mL}}$$

Donde:

cel = Número de células contadas

vol = Volumen de la cámara de Neubauer





---

# Apéndice B

## DNS

---

*Fundamento:* Para la realización de este proceso es necesario preparar varias soluciones, descritas a continuación.

*Objetivo:* Determinar la concentración de azúcares reductores en tres diferentes sustratos.

Reactivos	
Ácido acético glacial	
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	
Alcohol etílico al 96 %	
Fenol estabilizado USP 89.4 %	
Agua destilada	H <sub>2</sub> O
Fructosa	
Hidróxido de sodio	
Sílica gel	
Sulfito de sodio	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>

Símbolos y abreviaturas	
%	porcentaje
mL	mililitro
μL	microlitro
°C	grados centígrados
ηm	nanómetros

Materiales	
Barra magnética	1
Celdas	3
Frascos ámbar con tapa	1
Gradilla	1
Hielo	1
Espátula	1
Vidrio de reloj	1
Matraz volumétrico de 100 mL	1
Matraz volumétrico de 250 mL	1
Micropipeta de 100 $\mu\text{L}$	1
Micropipeta de 1000 $\mu\text{L}$	1
Piseta	1
Puntas de micropipeta de 100 $\mu\text{L}$	5
Puntas de micropipeta de 1000 $\mu\text{L}$	5
Termómetro	1
Tubos de ensayo	25
Vaso de precipitado de 100 ml	1

Equipos e instrumentos	
Espectrofotómetro UV-Vis	
Balanza analítica	
Campana de extracción	
Placa de calentamiento con agitación	
Baño maría	

#### Soluciones:

##### 1. Solución de Fructosa 15 mM

- a) Pesar 0.27 g de Fructosa
- b) Aforar a 100 ml con agua destilada.

##### 2. Solución de DNS

- a) Pesar 1 g de DNS, 0.1315 mL de fenol estabilizado USP al 89.4 %, 0.05 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y 1 g de NaOH.
- b) Disolver el NaOH con el DNS con agitación constante y calentamiento; dejar enfriar y

adicionar fenol y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  hasta disolución total.

- c) Aforar a 100 mL con agua destilada.
- d) Guardar la solución en un frasco oscuro.

##### 3. Solución Patrón

- a) Medir 300  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción.
- b) Mezclar con 3 mL del reactivo DNS.

#### Procedimientos:

##### 1. Construcción de curva estándar de fructosa

- a) Construir tabla especificando: número de tubos de ensayo, cantidad de agua destilada y disolución de fructosa 15 mM
- b) Construida la tabla, verter en 6 tubos de ensayo la solución de fructosa con agua destilada de acuerdo a la tabla.
- c) Hacer 6 diluciones por duplicado a partir de los tubos obtenidos, mezclando 300  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones de fructosa con 3 mL de DNS 1 % y someter a baño maría a 100°C por 10 min.
- d) Enfriar los tubos para detener las reacciones químicas.

##### 2. Análisis de las muestras

- a) Someter las diluciones de las muestras a baño maría a 100°C por 10 min.
- b) Enfriar los tubos introduciéndolos en hielo o agua helada.

- c) Homogeneizar la muestra para leer la absorbancia a  $546\text{ nm}$ .
3. Lectura de la absorbancia
- a) Encender el equipo, Espectrofotómetro-Computadora, y esperar 10 min.
- b) Seleccionar la longitud de onda ( $546\text{ nm}$ ).
- c) Introducir la muestra que funcionará como blanco.
- d) Se introduce la celda en el espectrofotómetro, se leen los datos.
- e) Continuar el mismo procedimiento con las demás diluciones, vertiéndolas de menor a mayor concentración.
- f) Enjuagar la celda con agua destilada.
- g) Concentrar datos en una tabla y hacer gráfico de calibración.
- h) Calcular azúcares reductores usando gráfica de absorbancia y fórmula.

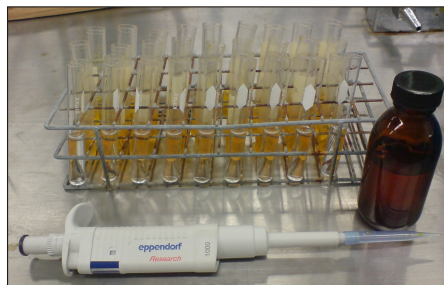


Figura B.1: Muestras con reactivo DNS.

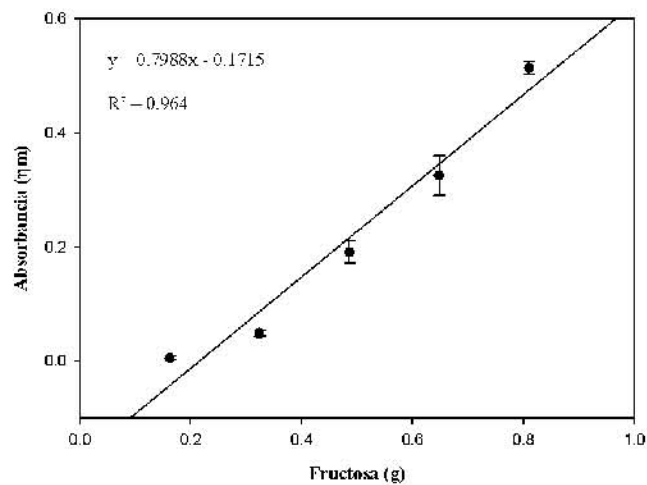


Figura B.2: Curva de calibración estándar de fructosa usada para medir azúcares reductores en jugo de caña de azúcar.

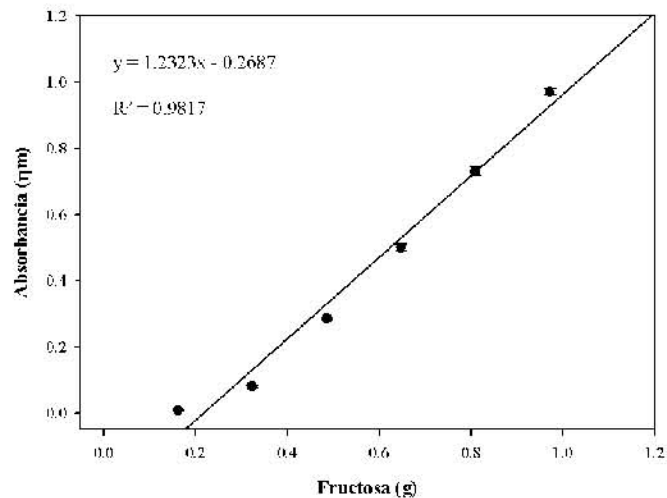


Figura B.3: Curva de calibración estándar de fructosa usada para medir azúcares reductores en melaza de caña de azúcar.

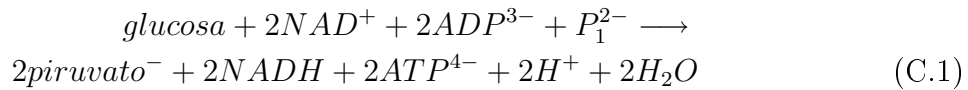
---

## Apéndice C

# Ruta completa de Embden-Meyerhof

---

Si comenzamos con una molécula de glucosa y añadimos todas las reacciones que participan en su conversión a dos moléculas de piruvato de acuerdo con el esquema *Embden-Meyerhof*, el resultado es:



Tres procesos acontecen simultáneamente: la glucosa es oxidada a piruvato, el NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) es reducido a NADH (NAD en su forma reducida), y el ADP (adenosín difosfato) es fosforilado para formar ATP (adenosín trifosfato). No se realiza la ruta *Embden-Meyerhof* sin los tres procesos, lo cual quiere decir que el ADP,  $P_1$  y NAD, así como la glucosa, deben estar presentes.

La velocidad de la ruta *Embden-Meyerhof* al igual que la velocidad de fosforilación oxidativa, es una parte controlada por la velocidad de utilización del ATP.

La conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato origina una producción neta de dos moléculas de ATP a partir de ADP y  $P_1$ , deteniéndose el proceso cuando todo el ADP o  $P_1$  acelerará la formación de piruvato y la generación de ATP hasta que las velocidades de utilización y producción alcancen el equilibrio. (McGilvery, 1977)



---

# Apéndice D

## Fermentación

---

*Fundamento:* Para la realización de este proceso es necesario asegurar que exista un ambiente anaeróbico.

*Objetivo:* Fermentar el sustrato con las condiciones óptimas para el proceso.

Símbolos y abreviaturas	
g	gramos
mL	mililitro
°C	grados centígrados
atm	atmósferas
min	minutos

Reactivos	
Acido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
hidróxido de potasio	KOH
Extracto de levadura	
Peptona de caseína	
Agua destilada	H <sub>2</sub> O

Materiales	
Cámara de neubauer	1
Termómetro	1

---

### Equipos e instrumentos

---

Potenciómetro

Refractómetro

Microscopio

Agitador magnético

---

### *Procedimiento:*

1. Inocular el medio con el cultivo de *Saccharomyces cerivisiae*.
2. Colocar en los agitadores magnéticos y agitar constantemente durante 12 o 24 h.
3. Mantener la temperatura a 30°C durante la fermentación.
4. Monitorear biomasa, azúcares reductores y pH.
5. Concentrar datos y elaborar gráficos.

*Nota:* Cuando el pH de la solución no se encuentra en las condiciones óptimas (pH 5) para el crecimiento de la levadura. Agregar 1 g/l de ácido -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- o base -KOH-, según sea el caso.





---

## Apéndice E

### Preparación del medio *YPD*

---

*Fundamento:* Preparar los medios es un requisito básico para cualquier fermentación, ya que una vez sembrada la levadura favorece su crecimiento.

*Objetivo:* Preparar medio sólido y líquido.

Símbolos y abreviaturas	
g	gramos
mL	mililitro
°C	grados centígrados
atm	atmósferas
min	minutos

Reactivos	
Agar bacteriológico	
Dextrosa	$C_6H_{12}O_6$
Extracto de levadura	
Peptona de caseína	
Agua destilada	$H_2O$

Materiales	
Tubos de ensayo (13x100)	5
Pipeta (10 mL)	1
Matraces erlenmeyer (125 mL)	2
Papel aluminio	
Cajas petri	5
Espátula	1
Algodón	
Alcohol etílico	
Papel estraza	
Barras magnéticas	2
Tubos falcon	5

Equipos e instrumentos
Autoclave
Balanza analítica
Campana de flujo laminar
Incubadora
Agitador magnético
Incubadora

*Procedimiento:*

1. Se utiliza alcohol etílico a 96° se limpia la mesa de trabajo antes de iniciar la práctica.

2. Preparar el medio sólido *YPD* en un matraz (Extracto de levadura 1% - Peptona 2% - Dextrosa 2% - Agar 2%).
3. Mezclar los reactivos con agua destilada y mantener en agitación.
4. Preparar el medio líquido *YPD* en un matraz (Extracto de levadura 1% - Peptona 2% - Dextrosa 2%)
5. Mezclar los reactivos con agua destilada y mantener en agitación
6. Con el autoclave se esteriliza el material y los medios a 121° C, 1 atm durante 15 min y dejar enfriar.
7. Dentro de la campana de flujo laminar vaciar el medio sólido en cajas petri y tubos de ensayo. Y el medio sólido en tubos falcón.
8. Dejar que se solidifique el medio sólido y conservar en refrigeración hasta su siembra.

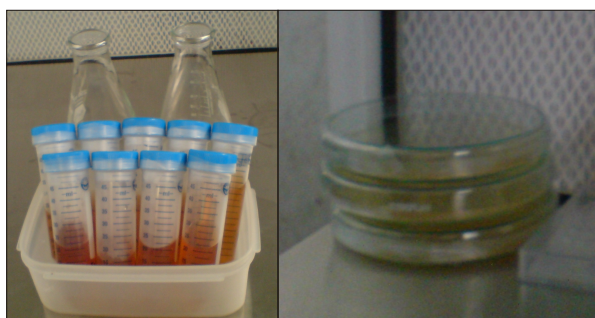


Figura E.1: Medio *YPD* líquido en tubos falcon y sólido en cajas petri.

---

## Apéndice F

# Preparación del medio de fermentación

---

*Fundamento:* La levadura necesita de un medio de cultivo óptimo que cuente con los nutrientes necesarios para su crecimiento y producción de bioetanol durante el proceso de fermentación.

*Objetivo:* Preparar el medio de fermentación.

Símbolos y abreviaturas	
g	gramos
L	litro
°C	grados centígrados
min	minutos

Reactivos	
Fosfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Extracto de levadura	

Materiales	
Matraz erlenmeyer	1
Probeta	1
Barra magnética	1
Papel aluminio	

---

### Equipos e instrumentos

Autoclave

Balanza analítica

---

### Procedimiento:

1. Adicionar a los matraces 100 mL de cada uno de los sustratos (jugo y mezcla de caña de azúcar) junto con las sales en las siguientes proporciones: 0.02 g/L de sulfato de magnesio, 0.2 g/L fosfato de amonio y 2 g/L de extracto de levadura.
2. Homogeneizar.
3. Colocar las moscas magnéticas a cada matraz y tapar. perfectamente con papel aluminio.
4. Esterilizar a 121°C por 15 min.
5. Enfriar el medio.



---

# Apéndice G

## Siembra de la levadura

---

*Fundamento:* En la siembra el contenido de nutrientes en condiciones de esterilidad, son ideales para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

*Objetivo:* Propagar la levadura en medio sólido y líquido para establecer la técnica de siembra de la levadura.

Símbolos y abreviaturas	
°C	grados centígrados
h	horas

Materiales	
Tubos inclinados (13x100)	5
Cajas petri con medio sólido	5
Tubos falcon con medio líquido	5
Asa	1
Mechero de alcohol	1
Palillos estériles	5

Equipos e instrumentos	
Campana de flujo laminar	
Incubadora	

*Procedimiento:*

1. Para evitar que el medio *YPD* se contamine se utiliza la campana de flujo laminar.
2. Se emplea un asa esterilizada, se toma una sola colonia del tubo de ensayo que contiene la levadura *S. cerevisiae*. Y2034 y se estria en el medio sólido *YPD*, esterilizar nuevamente el asa y repetir el procedimiento con el resto de las cajas y tubos inclinados.
3. Las cajas sembradas se introducen en la incubadora a una temperatura de 28°C durante 48 h.
4. Con un palillo, se toma una colonia de las cajas petri que contiene la levadura *S. cerevisiae*. Y2034 y se introduce en los tubos falcón que contienen medio líquido *YPD*, tomando otro palillo repetir el procedimiento con el resto de los tubos falcón.

5. La solución sembrada se introduce en la incubadora a una temperatura de 28°C durante 48 h para su crecimiento.
6. Conservar los tubos en refrigeración hasta preparar el medio de fermentación.

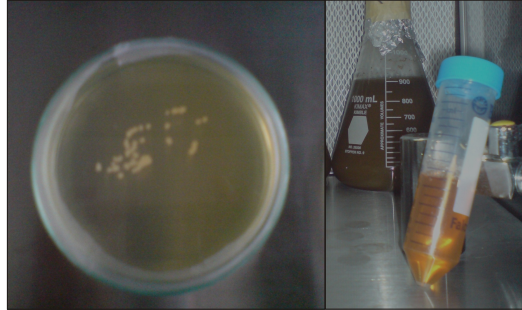


Figura G.1: Crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* en medio *YPD* líquido y sólido.

---

# Apéndice H

## Preparación de muestras

---

*Fundamento:* La determinación de Bioetanol, es muy importante para el estudio de fermentaciones ya que permite conocer la eficiencia de conversión de materia orgánica.

*Objetivo:* Determinar Bioetanol por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Símbolos y abreviaturas	
$\mu\text{L}$	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
h	horas
min	minutos
rpm	revoluciones por minuto

Materiales	
Tubos eppendorf	27
Puntas azules	27
Micropipeta de 1000 $\mu\text{L}$	1

Equipos e instrumentos	
Centrifuga	

*Procedimiento:*

1. Pipetear de uno de los matraces 1000  $\mu\text{L}$  de mosto y en el tubo eppendorf.
2. Centrifugar a 3000 rpm a 15  $^{\circ}\text{C}$  por 15 min.
3. Tirar el precipitado.
4. Analizar por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM).
5. Realizar los pasos anteriores para cada uno de los matraces utilizados en la fermentación.
6. Congelar a -20  $^{\circ}\text{C}$

*En caso de ser transportado:*

1. Transportarlo en hielo seco o en una hielera con bolsas de gel.
2. Antes de analizar por CG-EM descongelar.





---

# Apéndice I

## Dilución de azul de tripano

---

*Fundamento:* El reactivo azul de tripano se utiliza para teñir células muertas y poder contar con facilidad células viables.

*Objetivo:* Preparar azul de tripano.

Símbolos y abreviaturas	
g	gramos
mL	mililitros
Reactivos	
Acido láctico 85 %	$\text{CH}_3\text{COOH}$
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
Agua destilada	
Azul de tripano en polvo	
Materiales	
Matraz erlenmeyer de 250 mL	1
Barra magnética	1
Espátula	
Vidrio de reloj	1
Probeta de 100 mL	1
Pipeta de 10 mL	1
Papel aluminio	

Equipos e instrumentos
Agitador magnético
Balanza analítica

*Procedimiento:*

1. Medir 87.6 mL de ácido láctico
2. Pipetear 6 mL de glicerol
3. Mezclar todos los ingredientes en un matraz
4. Aforar a 100 mL
5. Pesar 0.05 g de azul de tripano, agregar a la solución y agitar.

Nota: A la mezcla de 6.4 % de glicerol, 87.6 % de ácido acético y 6 % agua se le conoce como lactoglicerol.



---

## Referencias

---

- Bakker, H. (1999). *Sugar Cane Cultivation and Management*, chapter 1, pages 1–2. Springer.
- Boden, T. A., Marland, G., and Andres, R. J. (2010). Global, regional, and national fossil-fuel co2 emissions. *Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy*.
- Cazetta, M., Celligoi, M., Buzato, J., and Scarmino, I. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Biotechnology Advances*, 15:2824–2828.
- CNIAA (2009). *Cámara Nacional de la Industria Azucarera y Alcoholera*. Cámara Nacional de la Industria Azucarera y Alcoholera, [www.camaraazucarera.org.mx](http://www.camaraazucarera.org.mx).
- FAO (2008). *El estado de la agricultura y la alimentación 2008. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades*. Food & Agriculture Org. FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, pages 275–279. AMV, segunda edition.
- Gutiérrez, M. and Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos caudantes del mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C.)*, (122).
- Julián, I., Saéz, R., and Martínez, S. (2003). *Química*, page 66. Complutense.
- Kim, S. and Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 4(26):361–375.
- Kwak, J.-S. (2005). Application of taguchi and response surface methodologies for geometric error in surface grinding process. *International Journal of Machine Tools & Manufacture*, 45:327–334.

- Lin, Y. and Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:627–642.
- McGilvery, R. W. (1977). *Conceptos Bioquímicos*, chapter 14, page 255. Reverté, S.A.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytic Chemistry*, 31:426–428.
- Navarro, A., Sepúlveda, M. d. C., and Rubio, M. (2000). Bio-concentration of vinasase from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*, 20:581–585.
- Olsson, L. and Ahring, B. K. (2008). Biofuels. *Advanced in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 108.
- Ostergaard, S., Olsson, L., and Nielsen, J. (2002). Metabolic pathway analysis of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Applied Microbiology*, 2.
- Pereira, F. B., Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., and Domingues, L. (2010). Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 101:7856–7863.
- RAE (2001). *Real Academia Española*. Vigésima segunda edition. Diccionario de la lengua española, [www.rae.es](http://www.rae.es).
- Raissi, S. (2009). Developing new processes and optimizing performance using response surface methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49:1039–1042.
- Ruiz, C. A. (2007). *La seguridad energética de América Latina y el Caribe en el contexto mundial*, chapter 5, pages 90–91. Naciones Unidas.
- SENER (2006). *Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México*. Secretaría de Energía. [www.energia.gob.mx](http://www.energia.gob.mx).
- SENER (2009). *Balance Nacional de Energía*. Subsecretaría de Planeación Energética y Desarrollo Tecnológico. Secretaría de Energía, [www.energia.gob.mx](http://www.energia.gob.mx).
- Shuler, M. L. and Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering: basic concepts*, pages 170–180. Prentice Hall, segunda edition.
- Tolnai, S. (1975). A method for viable cell count. *Methods in Cell Science*, 1:37–38.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., and Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*, chapter 10, page 290. Panamericana.