



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Nombre del Proyecto:

“Producción de etanol empleando una cepa de levadura autóctona de *Agave americana* L, en un fermentador de tanque agitado”

PRESENTA:

GERARDO ALFREDO CULEJ VAZQUEZ

ASESORA:

M.C. LUCÍA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

REVISORES:

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas junio del 2012

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. JUSTIFICACIÓN.....	6
III. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo general.....	6
3.2 Objetivos específicos.....	6
IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ.....	7
V. PROBLEMAS A RESOLVER.....	7
VI. ALCANCE Y LIMITACIONES.....	8
VII. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	8
7.1 GENERALIDADES DE LAS LEVADURAS.....	8
7.1.1 Bioquímica de las levaduras.....	9
7.1.2 Citología.....	9
7.2 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE AGAVE.....	10
7.2.1 PRINCIPALES CARBOHIDRATOS.....	11
7.2.2 Agua miel.....	12
7.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL DE CAÑA Y LA PANELA.....	13
7.4 METABOLISMO DEL ETANOL POR LAS LEVADURAS.....	14
7.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN ETANÓLICA...16	
7.5.1 Fuentes de carbono y energía.....	16
7.5.2 Fuentes de nitrógeno.....	17
7.6. MEJORAMIENTO EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS.....	19
7.6.1 Instrumentación y control.....	20
7.7 ESTANDARIZACIÓN DE PROCESOS.....	22
7.8 DESTILACIÓN.....	22
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
8.1 Aislamiento de levaduras nativas del agua miel de agave.....	23
8.1.1 Obtención de la muestra.....	23

8.1.2. Medios de cultivo, obtención del aislamiento y caracterización bioquímica de las levaduras.....	23
8.2. Prueba de azúcares fermentables.....	24
8.3. Desarrollo del inóculo para la fermentación etanólica.....	24
8.4. Protocolos de estandarización.....	25
8.4.1 Tradicional.....	25
8.4.2 Sistema 1.....	25
8.4.3. Sistema 2.....	25
8.5. Estrategias de fermentación etanólica.....	25
8.5.1. Fermentación nivel matraz sin mezclado “sin sulfato de amonio..	25
8.5.2 Fermentación nivel matraz agitado con sulfato de amonio.....	26
8.5.3 Fermentación a nivel fermentador sin sulfato de amonio.....	26
8.5.4 Fermentación nivel fermentador con sulfato de amonio.....	26
8.6. Destilación.....	26
8.7. Elaboración de los manuales.....	27
IX. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
9.1. Aislamiento de levaduras autóctonas de la Agave americana L.....	27
9.1.1. Características morfológicas de las levaduras aisladas.....	27
9.2. Prueba de fermentación de azúcares.....	31
9.3. Protocolos estandarización del inóculo.....	32
9.3.1. Tradicional.....	32
9.3.2. Sistema 1.....	33
9.3.3. Sistema 2.....	33
9.4. Estrategias de fermentación etanólica.....	34
9.4.1. Fermentación nivel matraz si sulfato de amonio.....	34
9.4.2. Fermentación nivel matraz agitado.....	36
9.4.3. Fermentación nivel fermentador sin sulfato de amonio.....	36
9.4.4. Fermentación nivel fermentador con sulfato de amonio.....	36
9.5. Destilación.....	39

9.6. Elaboración de manuales durante la estandarización del inóculo y uso del fermentado.....	41
X. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	61
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	62
XII. ANEXOS.....	64

I. INTRODUCCION

Desde que el hombre aplica tecnologías que le permiten aprovechar a los microorganismos existentes, ha realizado una serie de procesos con la finalidad de obtener productos de gran importancia, entre esos microorganismos podemos encontrar a las levaduras, organismos unicelulares capaces de degradar el azúcar hasta la producción de etanol y CO₂. En la actualidad se realizan diversos tipos de fermentaciones con las levaduras para la producción de alcohol, dirigido a la elaboración de diferentes bebidas, entre ellas encontramos a las bebidas no destiladas, como la cerveza, el vino, la sidra y el saque, y destiladas, como el whisky y el ron que se obtienen a partir de melazas fermentadas, entre las levaduras más utilizadas encontramos a *Saccharomyces cerevisiae*.

Diversos estudios se han realizado con las levaduras para su mejoramiento, llegando incluso a la alteración genética con la finalidad de desarrollar cepas altamente capaces de metabolizar y soportar altas concentraciones de azúcares, y altas concentraciones de etanol durante la fermentación, con esa estrategia se obtuvieron cepas seleccionadas que en la actualidad son empleadas para mejorar la calidad de los vinos y evitar de esta forma, variaciones debidas al crecimiento de microorganismos silvestres no deseables. Sin embargo durante la fermentación debe ser controlado en su totalidad las condiciones ambientales, pH, temperatura, composición del mosto fermentativo, ya que la mínima variación o contaminación de estos la levadura podrá mutar (Delfini y Bardi, 1990). Esta desventaja es lo que en la actualidad exige la búsqueda de nuevas levaduras capaces de tener la misma o mejor capacidad fermentativa (Querol, *et al.*, 1994), algunas características deseables, son:

- Totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona.
- Totalmente adaptadas a la materia prima, es decir al mosto a fermentar.
- Responsables, al menos parcialmente, de las características únicas en la obtención de etanol.

Las características propias de una zona (mostos con alto o bajo contenido en azúcares, grado alcohólico, temperatura de fermentación, etc.) pueden ser, por tanto, aspectos interesantes a la hora de seleccionar una levadura. Por tanto, la selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación es una estrategia muy importante para garantizar una fermentación.

Chiapas es uno de los estados más ricos en biodiversidad ecológica, entre la gran diversidad de plantas, citaremos a las Agaves, especialmente *Agave americana* L. se sabe que en el 50% de las fabricas dedicadas a la producción de bebidas alcohólicas a base de la agave, el proceso de la fermentación se desarrolla con las levaduras silvestres presentes en el jugo (Arrazola, 1969).

Por otra parte los avances tecnológicos juegan un papel muy importante en los bioprocesos, en la actualidad se cuentan con equipos sofisticados llamados

fermentadores, que permite el control de las variables influyentes durante la fermentación de la levadura, tales como pH, temperatura, velocidad de agitación, entre otras. Durante la evolución de la fermentación se generan datos que son almacenados y analizados en un software Bio-xpert lite enlazado a una computadora con la finalidad de optimizar la producción del metabolito microbiano de interés (Owen, 1989).

El presente trabajo tiene la finalidad de evaluar la capacidad fermentativa de una cepa de levadura autóctona de *Agave americana* L., en un fermentador de tanque agitado marca Applikon de 3L.

II. Justificación

El trabajo desarrollado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, tiene la finalidad de aislar una cepa de levadura autóctona de la *Agave americana* L. y evaluar su capacidad fermentativa en un fermentador Applikon, empleando de miel de agave como substrato principal, con la finalidad de ser utilizada por la empresa “Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C. V.”, dedicada a la elaboración de bebidas alcohólicas.

La estandarización y desarrollo de protocolos permitirá seguir un orden durante el desarrollo del inóculo que se empleará en la fermentación alcohólica.

La fermentación desarrollada en el fermentador Applikon tiene la finalidad de mejorar la producción, gracias a que se pueden controlar todas las variables que requiere la levadura para su óptimo crecimiento, y máxima producción alcohólica.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad productora de etanol de una cepa autóctona de levadura aislada de *A. americana* L, a nivel matraz y fermentador de tanque agitado.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar levaduras nativas provenientes de *A. americana* L.
- Comparar el desempeño del inóculo generado mediante el método tradicionalmente empleado por la empresa y el generado mediante un proceso por lote alimentado
- Evaluar la cinética de crecimiento y producción de etanol de la cepa aislada, empleando un fermentador Marca eZ – control, Modelo “Z31011011”, bajo el control del pH, T y agitación.

- Cuantificar la concentración del etanol en los destilados, empleando un densímetro marca Anton Par, modelo “DMA 4500”.
- Elaborar manual de procedimientos para aislamiento, estandarización y fermentación.

IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

El proyecto se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez; en el laboratorio de investigación ubicado en el edificio D, en el cual se realizó el aislamiento de la cepa. La etapa de fermentación y cuantificación de etanol se desarrolló en las instalaciones del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas y Biocombustibles.

En ambos laboratorios se desarrollan proyectos pertenecientes a las líneas de investigación “Ingeniería de procesos biotecnológicos y alimentarios” y “Biocombustibles y desarrollo sustentable”, mismas que pertenecen al programa de Maestría en ciencias en Ingeniería Bioquímica.

V. PROBLEMAS A RESOLVER

Con la realización del presente proyecto se pretende evaluar la capacidad de producción de etanol, utilizando en la fermentación el protocolo original que es empleado en la empresa Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C. V. y dos sistemas propuestos que permita describir el potencial de fermentación de las cepas en base a su producto de fermentación.

A fin de mejorar la estandarización y la fermentación alcohólica se realizarán protocolos en los que se detallarán paso a paso las actividades a desarrollar para su posterior reproducibilidad, la elaboración de un protocolo de instructivo del fermentador proporcionará ayuda sin riesgos de accidentes al momento de su operación. El software bioxpert lite es un programa que tiene grandes ventajas ya que permite controlar, almacenar y graficar los datos, los cuales posteriormente pueden ser optimizados.

VI. ALCANCE Y LIMITACIONES

Las actividades que se alcanzaron en su totalidad durante este trabajo de residencia fueron, el aislamiento de las cepas, pruebas bioquímicas que permitieron conocer su capacidad para degradar diferentes azúcares y su capacidad fermentativa en producción de etanol. Los datos obtenidos dieron lugar al análisis que permitió establecer una elección del método de

estandarización del inóculo y además elaborar protocolos del procedimiento de fermentación.

Dentro de las limitaciones encontradas del proyecto, fue la realización de tres pruebas bioquímicas, identificación de las levaduras mediante la fermentación de azúcares por el sistema API, la osmotolerancia de las levaduras y su capacidad de tolerancia al etanol.

VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

7.1 GENERALIDADES DE LAS LEVADURAS

El término levadura, al igual que sucede con el término moho, se emplea de forma habitual, si bien su definición resulta difícil de precisar. Se puede referir a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, y que se reproducen por gemación o por fisión (Mossel *et al.*, 1985). La mayoría de las levaduras son hongos microscópicos que no forman micelio, y por lo tanto se presentan como células sencillas. Con respecto a la morfología de estos microorganismos, pueden presentar forma redondeada, ovoidea o alargada, siendo relativamente constante para la misma especie. No obstante, en numerosas ocasiones, para describir la forma vegetativa de las levaduras se emplean los términos de esférica, ovoide, alargada, cilíndrica, triangular e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelio o un falso micelio. Por lo que respecta al tamaño de las células, éste puede variar mucho según las distintas especies. De esta forma, por lo que respecta a la anchura el rango oscila de 1 a 10 micrómetros, mientras que el mismo es de 2-3 micrómetros a 20-50 micrómetros para la longitud. Las levaduras se encuentran encuadradas dentro de las eucariotas puesto que presentan un núcleo diferenciado y orgánulos subcelulares como pueden ser el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Dentro de su estructura, las partes que pueden ser observadas son la pared celular, el cito plasma, las vacuolas de agua, los glóbulos de grasa, y los gránulos (metacromáticos, de albúmina o de almidón). Para la observación del núcleo son necesarias técnicas de tinción especiales (Martín-Lagos, 1999).

7.1.1 Bioquímica de las levaduras

Osmotolerancia

La disminución en la velocidad de consumo de azúcares está correlacionada con la disminución en la capacidad de la levadura de tomarla del medio, a pesar de que el resto de la vía glicolítica se mantiene intacta y activa. La inhibición por el azúcar se explica por un fenómeno de ósmosis: si una célula de levadura está situada en una disolución de azúcar de presión osmótica más fuerte que la del contenido de sus vacuolas, la célula será más o menos plasmolizada. Cuando la concentración de azúcar inicial es elevada, la fase lag se prolonga, la viabilidad celular durante la fase lag disminuye y los recuentos de células viables durante la fermentación dan valores bajos. En síntesis, la fermentación se retarda y quedan elevados niveles de azúcar residual (Nishino *et al.*, 1985)

7.1.2 Citología

En la figura 1, se puede apreciar la estructura de una levadura. La morfología celular, la formación de una cápsula de polisacáridos, la ausencia o presencia de vacuolas, de glóbulos lipídicos y el desarrollo de mitocondrias, dependen de las condiciones físico-químicas y de la edad del cultivo. En el citoplasma, pueden encontrarse ribosomas, enzimas, polifosfatos, glucógeno y trealosa. El glucógeno, que puede constituir hasta un 12% en peso seco de las células, se acumula durante la fase estacionaria, cuando el nitrógeno se vuelve limitante y aún queda glucosa en el medio. La trealosa es otro hidrato de carbono de reserva que puede representar hasta el 16% del extracto seco de las células, proporcionando energía a la misma durante la fase de adaptación o de esporulación así como, presentan un importante papel en la osmotolerancia. (Martín-Lagos, 1999).

La envoltura de la célula de la levadura incluye una membrana plasmática, un espacio periplásmico y una pared celular constituida principalmente por polisacáridos y una pequeña cantidad de péptidos. La pared tiene una estructura semirrígida permeable al soluto que proporciona a las levaduras una considerable fuerza comprensional y tensil. Los grupos carboxilo de los péptidos de la pared celular confieren a las levaduras utilizadas en la elaboración de cerveza una capacidad de floculación importante, lo que facilita la separación sólido-líquido después de la fermentación. (Owen, 1989).

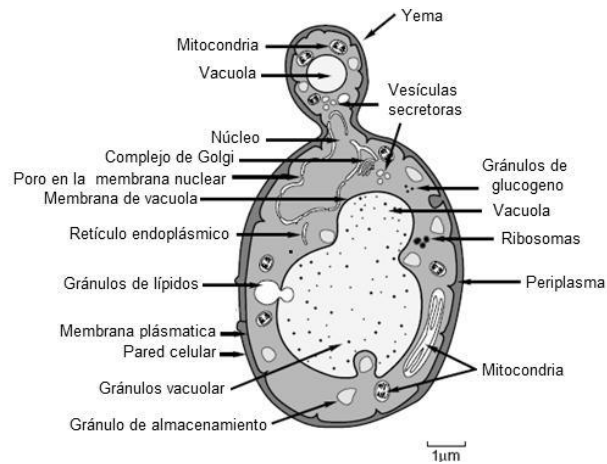


Figura 1. Principales características de una célula de levadura (Russell, 1995).

7.2 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE AGAVE

En México, el género *Agave* tiene una amplia distribución, se encuentra en más de 75% del territorio; sin embargo, su distribución es altamente asimétrica, hay regiones que poseen más especies que otras. Son muy diversos en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, pero su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo.

El género *Agave* es el más grande de esta familia, comprendiendo aproximadamente, doscientas setenta y cinco especies (Lawrence, 1951). Sin embargo, Hutchinson (1934) lo ubicó dentro del orden Agavales y específicamente en la familia Agavaceae, en donde se incluye el género *Agave*. Este género incluye, de la nomenclatura tradicional, géneros que pertenecen a la familia Liliacea y otros a la Amaryllidacea (Lawrence, 1951; Gómez, 1963). En esta nomenclatura, el subgénero *Agave* lo integran 12 secciones con 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades y un total de 197 taxas (García, 2007).

El *Agave tequilana* Weber es una planta xerófila (que crece en zonas áridas y cálidas) de hojas color azul-verdoso, delgadas casi planas; mide aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tienen una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm (Granados, 1993). La figura 2, muestra la planta *Agave americana* L.



Figura 2. Planta de *Agave americana* L.

En una hectárea de cultivo se tienen aproximadamente de 2500 a 2800 plantas que dependiendo del clima alcanzan su madurez en periodo de seis a diez años (Guzmán, 1997). Los terrenos más aptos para el cultivo del *Agave americana* L. son los resecos, de tipo arcilloso, ricos en sílice de color rojiza, altos y pedregosos (Luna, 1991 citado por Morales, 1997).

Se sabe que en más del 50% de las fabricas dedicadas a la producción de bebidas alcohólicas a base de agave, el proceso de la fermentación se desarrolla con las levaduras silvestres presentes en el jugo de las diversas plantas de agave (Arrazola, 1969).

7.2.1 PRICIPALES CARBOHIDRATOS

El principal carbohidrato de reserva de las plantas del genero agave es la inulina (fig.3), un polisacárido que después de ser sometido a una hidrólisis térmica libera fructosa y glucosa, estos son los principales azúcares utilizados por los microorganismos para la producción de alcohol. El contenido de carbohidratos en los jugos de maguey determina el rendimiento y la calidad del producto terminado, lo cual puede depender de factores como el estado de madurez y condiciones de la hidrólisis térmica.

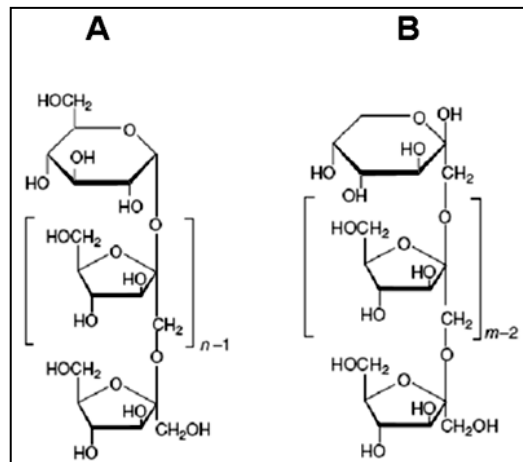


Figura 3. Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (b-D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (b-D-fructopiranosil) (B).

Por su alto contenido de carbohidratos de reserva, el maguey maduro es aprovechado como materia prima en la producción de mezcal. En las fábricas se utilizan únicamente las piñas o cabeza de maguey, estructuras formadas por el tallo y la base de las pencas; el resto de la planta se desecha en el campo. Después de someter al maguey a una hidrólisis térmica, la concentración de fructosa aumenta considerablemente en comparación con la concentración en jugos crudos, mientras que la concentración de glucosa aumenta ligeramente, pues la inulina además de fructosa, contiene dos unidades de glucosa por molécula (Michel, 2007).

7.2.2 Agua miel

La miel de agave se destaca por tener el doble poder endulzante que el azúcar convencional, con lo cual se requiere mucho menos de uso para la cantidad que se desea endulzar. Su composición, se estima, es de un 90 por ciento de fructosa, con un muy bajo nivel de glucosa. La fructosa tiene el índice glucémico de 20, y al representar la fructosa el 75 % de los componentes de la miel de agave, salta a la vista que tiene un bajo índice glucémico y que por lo tanto es apta para ser digerida por diabéticos (Zudaire, 2009).

La miel de agave se obtiene del jugo que se extrae del penca madura (figura 4), este jugo contiene (aparte de otros componentes) un 80% de inulina, la cual se obtiene por hidrólisis enzimática para transformar parcialmente la inulina con una

molécula terminal de fructuosa en glucosa, de modo que sea un producto dulce. El jugo que por lo tanto se obtiene contiene un 72% de agua se pone bajo tratamiento de purificación. Finalmente el agua del jugo por la evaporación se extrae hasta la obtención del la miel de agave (Bautista, 2001).



Figura 4. Jugo de de la penca madura de *Agave americana L.*

7.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL DE CAÑA Y LA PANELA

La miel de caña tiene una textura parecida a la miel de abeja y de sabor muy agradable que a muchas personas les recuerda el regaliz. Durante la evaporación del agua salen hasta la superficie las impurezas que contienen ese jugo. Hay que sacar toda esa impureza, llamada cachaza, para que nos quede una melaza clara, transparente y homogénea y sobre todo ya que las impurezas pueden servir de materia a una fermentación futura. La miel o melaza de caña cuanto más oscura sea, más sabor y nutrientes tendrá. La composición de la miel de caña se muestra en la tabla 1 (James, 1991).

Tabla 1. Composición promedio de la miel final de caña

COMPONENTES	SÓLIDOS SOLUBLES (%)
Azúcares	75-92

Sacarosa	70-88
Glucosa	2-4
Fructosa	2-4
Sales	3.0-4.5
Ácidos inorgánicos	1.5-4.5
Ácidos orgánicos	1.0-3.0
Ácidos orgánicos	1.5-5.5
Ácidos carboxílicos	1.1-3.0
Aminoácidos	0.5-2.5
Proteínas	0.5-0.6
Almidón	0-0.01-0-0.050
Gomas	0.30-0.60
Ceras, grasas, fosfátidos	0.05-0.15
Otros	3.0-5.0

Mediante la evaporación abierta de los jugos de la caña de azúcar se obtiene la panela. Durante el proceso de elaboración se presentan cambios significativos de composición que comienzan desde la molienda de la caña, presentando incrementos o disminuciones de los constituyentes dependiendo de las reacciones químicas y cambios físicos ocurridos. La composición cualitativa de la panela es muy similar a las mieles, variando solamente a nivel de minerales, donde la panela registra cantidades notablemente mayores.

7.4 Metabolismo del etanol por las levaduras

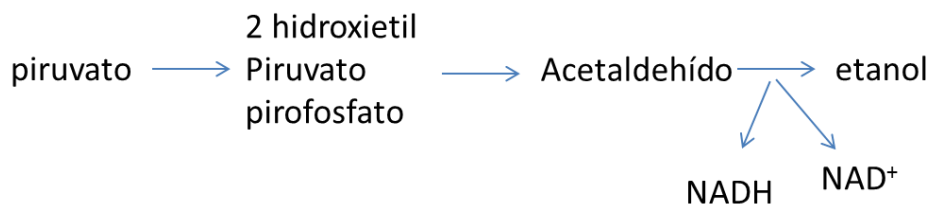
La producción de etanol es un proceso industrialmente viejo. El etanol por su uso como materia primera química se produce por fermentación desde los inicios de la microbiología industrial, y para la producción de bebidas alcohólicas desde hace miles de años. Pero durante muchos años se ha obtenido por procedimientos químicos, mediante la hidratación de etileno. Últimamente se ha retomado la producción de etanol para su uso químico a través de la fermentación. El etanol se produce por fermentación para fabricar bebidas alcohólicas y alcohol industrial,

pero el uso del etanol como combustible no es rentable, ya que es más económico comprar petróleo que producir etanol. Tan solo lo producen algunos países subdesarrollados (Badui, 2006).

Las bebidas alcohólicas se producen a partir de diversas materias primas, pero principalmente a partir de cereales, frutas y productos azucarados. Entre las bebidas alcohólicas hay bebidas no destiladas, como la cerveza, el vino, la sidra y el sake, y otras obtenidas por destilación como el whisky y el ron, que se obtienen a partir de cereales y melazas fermentadas, y el coñac, que se obtiene por destilación del vino. Otras bebidas destiladas, como el vodka o la ginebra se obtienen a partir de bebidas alcohólicas neutras, obtenidas por destilación de melazas, cereales, patatas o suero láctico fermentado, un detalle común muy importante en estas fermentaciones es que en todos los casos se usan levaduras para la conversión de azúcares en etanol (Owen, 1981)

La fermentación alcohólica (denominado también como fermentación etílica) es un proceso biológico en plena ausencia de aire (oxígeno- O_2), aproximadamente el 96% de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o especies relacionados. El etanol se produce en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) mostrado en fig.5, en la que el piruvato producido durante la glicólisis se convierte en acetaldehído y posteriormente a etanol (Howard y Piggot, 2003).

El rendimiento teórico de 1g de glucosa es de 0.51g de etanol y 0.49g de CO_2 . Sin embargo en la práctica, aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO_2 alcanzado el 90% del valor teórico. La reacción global está dada por la siguiente reacción (J. Bu'lock, 1981).



A pesar de la simplicidad de esta ecuación, la secuencia de transformación para degradar una molécula de glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso complejo que involucra dos etapas: (1) la formación en anaerobiosis de 2 moléculas de piruvato a través de la ruta metabólica glucolítica y (2) la descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para dar lugar a dos moléculas de acetaldehído que se reduce a etanol.

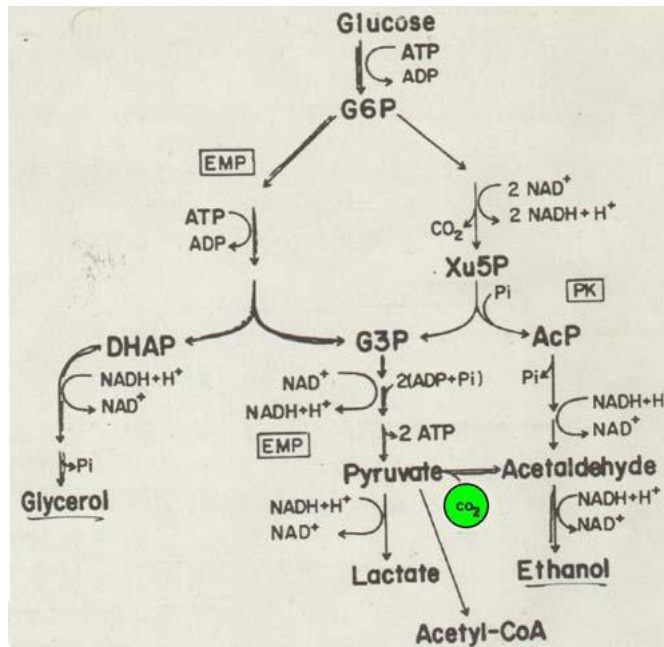


Figura. 5, Ruta metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaerobia a los microorganismos celulares (levaduras) en ausencia de oxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen energía necesaria para sobrevivir, produciendo alcohol y CO₂ (Yuan, 2006). Aunque las fermentaciones alcohólicas son en gran medida anaerobias, las levaduras necesitan algo de oxígeno para sintetizar algunos esteroides y ácidos grasos insaturados componentes de la membrana (Owen, 1989).

7.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN ETANÓLICA

7.5.1 Fuentes de carbono y energía

En la fermentación las levaduras utilizadas para la elaboración de alcohol utilizan los azúcares sacarosa, fructosa, maltosa y maltotriosa en este orden. La sacarosa es hidrolizada primeramente por la invertasa localizada en el espacio periplásmico extracelular. Los azúcares son transportados a través de la membrana celular por transporte activo o pasivo, mediado por permeasas producidos constitutivamente o inducibles. La composición en fosfolípidos de la membrana plasmática es importante para la tolerancia del etanol, observándose un incremento de ésta

cuando el contenido de ácidos grasos insaturados aumenta. La tolerancia alcohólica puede elevarse suplementando el medio de crecimiento con ácidos grasos insaturados, vitaminas y proteínas. Los factores fisiológicos tales como la forma de aporte del sustrato, la acumulación de etanol intracelular, la presión osmótica y la temperatura influyen en la tolerancia de las levaduras al etanol. Esto es porque las enzimas glicolíticas de las levaduras, hexoquinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa son sensibles a la concentración de etanol (Owen, 1989).

En la fermentación de las levaduras, las cosechas de energía más fácilmente utilizables pueden ser agrupadas en tres categorías básicas:

Jugos azucarados

Los jugos azucarados, sean de azúcar de caña, de remolacha o de tallos de sorgo son productos agrícolas interesantes ya que proporcionan inmediatamente un suministro de sustratos fácilmente fermentables, aunque esto también puede tener sus inconvenientes.

Cereales

En base a peso seco el maíz, el trigo, el sorgo y otros granos contienen alrededor de 60-75% p/p de almidón hidrolizable a hexosas con un significativo aumento de peso y constituyen una fuente de alto rendimiento en etanol.

Tubérculos

Las cosechas de raíces de las zonas templadas tienen poca o ninguna aplicación en la producción de alcohol industrial a causa de su mayor valor en los usos, bien establecidos, como alimento.

Sin embargo, comparada con la caña de azúcar, la mandioca tiene un potencial de producir hasta 2 1/2 veces la cantidad de alcohol por tonelada de cosecha recogida y es mucho más barata de crecer (Álvarez, 2009 y Owen, 1981).

7.5.2. Fuentes de nitrógeno

Durante los últimos 20 años, varios estudios han demostrado que el nitrógeno tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y la actividad fermentativa de la levadura (Bell *et al.*, 1979). El nitrógeno es de todos el más importante, siendo necesario que el mosto contenga inicialmente nitrógeno amoniacal y en forma de aminoácidos por encima de 130-150 ppm.

La deficiencia de nitrógeno en el mosto de fermentación puede causar una disminución de la velocidad de fermentación, así como la producción de sulfuro de hidrógeno. De hecho, el déficit de nitrógeno en el mosto reduce la eficacia del crecimiento de las levaduras y por consiguiente, reduce la velocidad de fermentación (Bely et al. 1990). Cuanto menor es la concentración de nitrógeno en el mosto, mayor es el riesgo de fermentaciones lentas. La concentración de nitrógeno en el mosto puede variar de 80 a 400 mg/L. La deficiencia de nitrógeno también provoca un incremento de la producción de H₂S por parte de la levadura. Los dos tipos de nitrógeno disponibles para las levaduras son nitrógeno amoniacal y nitrógeno alfa amínico (aminoácidos libres excluyendo la prolina que no puede ser asimilada por las levaduras) (Henschke y Jiranek 1993).

El amonio (nitrógeno mineral) es "preferido" por la levadura, es asimilado muy rápidamente y tiene una influencia directa sobre la biomasa al producir un crecimiento significativo de la población de levaduras durante la fase de crecimiento (O. Pillet, 1999)

Algunas vitaminas y minerales

El rol de la biotina tiene influencia en el metabolismo de algunos aminoácidos y lípidos. La biotina es involucrada en el metabolismo de la levadura, actuando como un cofactor para la enzima piruvato descarboxilasa que cataliza la transformación de piruvato a oxalacetato, precursor intermedio para la asimilación del nitrógeno y la síntesis de otros compuestos nitrogenados. Algunos minerales como metales pueden funcionar como cofactores para algunos enzimas del metabolismo de la levadura.

pH

El efecto de pH en una fermentación es importante no sólo en relación con el desarrollo de la levadura sino con la tasa de fermentación y con la formación de subproductos. En estudios realizados con cepas aisladas de ponches azucarados, se encontró que la máxima producción de alcohol se obtiene a pH 4.25 y la menor a pH 3.7, probablemente porque este último es demasiado bajo para lograr una activación eficiente de las enzimas necesarias para la fermentación y el intercambio iónico al interior de la célula sufre un descontrol tal, que ésta concentra su energía, en regular sus sistemas y no en fermentar el azúcar presente en el sustrato (Calderón, 2007).

Temperatura

La temperatura constituye un factor primordial tanto en la producción de biomasa como de etanol. Usualmente, la fermentación alcohólica incrementa cuando la temperatura se encuentra en un rango de 30-35°C con una óptima de 32°C, dependiendo de la cepa de levadura utilizada (Calderón, 2007). La velocidad de la fermentación aumenta generalmente con la temperatura entre los 15 y los 35 °C y los niveles de glicerol, acetona, buteno-2,3-diol, acetaldehído, piruvato y 2-cetoglutarato se elevan en los caldos de fermentación. La formación de niveles elevados de alcohol también depende de la temperatura, y el riesgo de contaminación bacteriana y de producción de ácidos volátiles como resultados es reducido (Owen, 1989).

7.6. Mejoramiento en los procesos fermentativos

Durante muchos siglos es llevado a cabo la fermentación en tanques donde no se lleva un control del proceso. No obstante hace pocos años la tecnología ha sido un factor en los bioprocesos gracias a la invención de tecnologías desarrolladas para el control y manipulación de los procesos. Tal es el caso de los fermentadores también conocidos como biorreactores.

Un biorreactor (fermentador) es un aparato en el que son tratados los materiales para facilitar las transformaciones bioquímicas por la acción de células vivas o por componentes celulares. Generalmente son empleados ampliamente en las industrias de alimentación y fermentación, en el tratamiento de residuos y en muchas instalaciones biomédicas (j. bu'lock y B.kristiansen 1991).

La función principal de un fermentador es la de proporcionar un medio ambiente controlado que permita el crecimiento eficaz de las células y la formación de producto (j. bu'lock y B.kristiansen 1991).

Monitoreo y control de biorreactores

Diversos parámetros como la temperatura, el pH, la concentración del oxígeno disuelto, la velocidad de agitación (rpm), tienen un importante efecto sobre el rendimiento de la fermentación. Para proporcionar un ambiente adecuado, las propiedades del sistema deben estar monitorizadas. La monitorización y el control de la fermentación es un área de investigación que ayuda a mejorar el rendimiento de los bioprocesos y así alcanzar en el fermentador una operación uniforme y satisfactoria.

7.6.1. Instrumentación y control

Los fermentadores están equipados con instrumentos que se utilizan para facilitar el análisis y registro de parámetros específicos, para establecer las condiciones óptimas del proceso de fermentación y para su optimización en la formación del producto. (Owen, 1989). El desarrollo de proceso de fermentación completamente automatizado, controlado por ordenadores, depende de la existencia de sensores que produzcan señales significativas que puedan ser trasladados a un control de acción, el control de un parámetro particular se lleva a cabo con un sensor que mide la propiedad y un controlador que compara esta medida de con un valor fijo predeterminado y que activa el equipo hasta ajustar el valor de la propiedad a ésta (B. Kristiansen, 1991).

Los sensores pueden estar “on-line”, es decir, conectados a las instalaciones del fermentador o en contacto con la corriente, “of-line”, de los cuales se toma asépticamente una muestra para analizar. Los sensores on-line de los fermentadores comunes se utiliza para medir propiedades físicas como la temperatura, presión, las rpm, del agitador, las velocidades del flujo del líquido y gases y para las medidas fisicoquímicas como el pH. Estos sensores on-line en contacto con el medio del fermentador, incluyendo electrodos de pH y sondas medidoras de gas disuelto (oxígeno disuelto, OD) deben ser esterilizables con vapor de agua, fácilmente calibrables y dar una lectura fiable. En la tabla 2, se describe algunos de los sistemas de medidas on-line más importantes

Tabla 2. Sistemas de medida de fermentación on-line.

Parámetro	Equipo de medida	Fundamentos de la medida
Temperatura	Termómetros y termistores de resistencia eléctrica	Cambios de resistencia eléctrica con la temperatura
Espuma	Sondas metálicas de espuma aisladas en el extremo colocados a diferentes niveles	La espuma toca el extremo de la sonda, completa un circuito eléctrico que actúa como un dispositivo de alimentación antiespuma
rpm del agitador	Tacómetro	Mecanismo de detección mediante inducción, generación de voltaje, sensores de luz o fuerzas magnéticas
Velocidad de flujo	Rotámetro	La posición de un flotador que se mueve libremente

gaseoso		en un tubo con diámetro creciente montado verticalmente indica la velocidad del flujo
pH	Electrodo de referencia de vidrio combinado	Medidas potenciométricas de la concentración de iones de hidrogeno.
O₂ disuelto	Electrodo de O ₂	Los electrodos producidos por la interacción del oxígeno con una superficie metálica genera una corriente. La sonda contiene una membrana a través de la cual puede difundirse el Oxígeno.

Toma de muestras: La toma de muestras es un dispositivo que permite recoger una muestra del medio para analizarla en el laboratorio. Esto implica un riesgo de contaminación, pero es necesario debido a la necesidad de monitorizar el proceso. La toma de muestras ha de impedir siempre la contaminación en ambos sentidos. La contaminación hacia dentro se evita, impidiendo el contacto entre la parte interna del fermentador y la externa, mientras que la contaminación hacia fuera se impide mediante sobrepresión

Existen tres objetivos para el control del proceso

1. Mantener una variable constante a lo largo del tiempo
2. Forzar a una variable a seguir el camino prescrito a lo largo del tiempo
3. Optimizar algunas funciones de las variables del sistema

Los primeros son conseguidos mediante la regulación, lo segundo mediante mecanismos auxiliares y lo tercero mediante controladores óptimos, todos estos aparatos de instrumentación son generalmente llamados denominados controladores automáticos.

En un sistema de control de procesos, tenemos cuatro clases de variables:

- 1) Variables controlados
- 2) Variables de disturbancia
- 3) Variables manipulables
- 4) Variables de referencia

La variable controlada es la variable de salida que deseamos controlar y la variable manipulada es la variable de entrada con la que estamos controlando. Una variable de disturbancia es una variable de entrada que afecta a la variable

controlada a través de la variación en otras entradas diferentes de la variable manipulada y la variable de la referencia es el valor deseado de la variable controlada (J. Bu'lock, 1989).

Las computadoras pueden utilizarse en los procesos de fermentación para procesar los datos suministrados por los sensores, pudiendo analizar los datos presentar el análisis en dispositivos al efecto, y almacenarlos o utilizarlos para controlar el proceso mediante señales que activen conmutadores, válvulas y bombas. El almacenamiento y organización de los datos relativos al proceso de fermentación mediante computadoras es un componente extremadamente importante en la mayoría de los procesos industriales de fermentación.

7.7. Estandarización de procesos

La estandarización es el desarrollo sistemático, aplicación y actualización de patrones, medidas uniformes y especificaciones para materiales, productos o marcas. No es un proceso nuevo, ha existido desde hace mucho tiempo y constituye un método excelente para controlar los costos de materiales de procesos.

7.9. Destilación

Es el proceso físico que separa, concentra, y/o purifica en mayor o menor grado los componentes de una mezcla líquida en base a sus diferentes puntos de ebullición o presiones de vapor. En esencia el proceso depende de la posibilidad de generar vía ebullición, una fase vapor de composición diferente a la de la fase líquida. La condensación de esta fase vapor produce una fase líquida enriquecida en el o los componentes más volátiles de la mezcla original (Íñiguez, 2010).

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Aislamiento de levaduras nativas del *Agave americana* L.

8.1.1 Obtención de la muestra

El agua miel fue recolectado de la planta *Agave americana* L, en el previo los riegos municipio de Comitán de Domínguez, Chiapas, el día 21 en el mes de abril del 2012. Un volumen de 500 ml de agua miel, fue transportado bajo condiciones controladas de temperatura (15 °C), en una hielera para evitar la fermentación vigorosa de la muestra, hasta las instalaciones del laboratorio de investigación del ITTG, donde se llevó a cabo el aislamiento.

8.1.2 Medios de cultivo, obtención del aislamiento y caracterización bioquímica de las levaduras

Durante el aislamiento se trabajo con dos medios de cultivo uno selectivo YMO+Oxitetraciclina (4g/L) (YMO) y uno diferencial WL+ cloranfenicol (0.1g/L) (WLC)

Fueron preparados 8 matraces Erlenmeyer de 250ml conteniendo 50 mL de caldo YMO (2 fueron control (-)). Los matraces se esterilizaron en autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 min.

Cinco mililitros de agua miel fueron depositados en cada uno de los 6 matraces. Tres matraces se mantuvieron a temperatura ambiente y tres a temperatura constante de 30°C, los 6 matraces se incubaron sin agitación.

Pasadas 12 horas de incubación, se tomaron 5 mL de cada caldo y se inocularon respectivamente a 6 nuevos matraces conteniendo 50 ml de caldo YMO a pH 4.7, los matraces que se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

Concluidas 12 horas de incubación. Se tomaron asadas directamente de cada caldo YMO y se sembró por triplicado en sus respectivas cajas de Petri con agar YMO a pH 4.7, empleando la técnica de estría cruzada, se dejaron dos cajas sin inocular como control negativo. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y a 30°C (según el matraz de procedencia) durante dos días, con el fin de distinguir colonias de las levaduras.

De las colonias aisladas obtenidas, se sembraron en sus respectivos tubos inclinados con agar YMO (6 tubos fueron de los aislados a temperatura ambiente y 4 a 30 °C).

Para obtener una prueba confirmativa de cuantos aislados se consiguieron, de los 10 tubos, se tomaron 5 tubos, se realizó una suspensión microbiana con cada tubo y el contenido se empleó para resembrar respectivamente en 50 ml de caldo de cultivo YMO, con una proporción de inóculo del 10 % (V/V), los cultivos se

dejaron en incubación durante 6 horas a su respectiva temperatura, concluida la incubación. Se realizaron diluciones hasta el orden de 10^{-2} , se tomaron 0.1 ml de cada dilución y se sembró en un medio WLC agar a pH 4.7, mediante la técnica de vaciado en placa. Todas las cajas de Petri fueron incubadas a 30°C durante tres días. Lo anterior con el fin de poder identificar levaduras. La caracterización morfológica colonial de las levaduras aisladas (tanto en el medio de cultivo YMO agar y WLC) fueron observadas en un estereoscopio.

8.2 Prueba de azúcares fermentables

Para seleccionar las cepas de levaduras aisladas se prepararon tubos con 8 ml de caldo con 0.25% p/v de extracto de levadura y 0.75% p/v de peptona de caseína. Cada tubo fue provisto de una campana de Durham para la observación de gas al ser fermentado el azúcar añadido. Por separado se prepararon soluciones al 10% p/v de los siguientes azúcares: fructosa, glucosa, sacarosa, manitol y lactosa. Los tubos fueron esterilizados a 15 lb/pulg² durante 15 minutos. Las soluciones fueron esterilizadas por filtración, utilizando membranas cuyo poro era de 0.45 micrómetros) (Leveau y Bouix, 2000).

Posteriormente a cada tubo se le añadió 2 ml de la solución de azúcar, cada prueba se realizó por duplicado. La concentración final del azúcar fue de 2%. Cada tubo fue inoculado con una asada de la cepa proveniente del tubo inclinado respectivo. Los tubos se incubaron a 30°C durante cinco días (Leveau y Bouix, 2000) y monitoreados diariamente.

8.3 Desarrollo del inóculo para la fermentación etanólica

Se prepararon tres matraces con 70 ml de medio sintético YM, utilizando matraces Erlenmeyer de 2 L. Se hizo una suspensión densa agregando 5 ml de agua destilada estéril a pH 6 en tres tubos inclinados de la cepa autóctona aislada de *Agave americana* L, llamada por el momento Agave1, como es una unidad experimental de tres unidades se utilizaron 9 tubos, prácticamente 3 tubos para cada unidad (por matraz). Los matraces se incubaron a 30 °C en agitación a 100 rpm durante 8 horas en una agitadora LAB-LINE. Concluido el tiempo se tomó 1 ml de muestra para realizar un conteo al microscopio con la cámara Neubauer. Utilizando la Ecuación 1 es como se conoció la concentración celular alcanzada.

$$cel / ml = \frac{x \times 1000 \times fd \times 16}{Vc \times 0.5} \dots\dots\dots Ec. 1$$

Donde x es el promedio de células de 5 cuadros contados de la cámara, Vc es el volumen de un espacio de 4x4 cuadros de la cámara que equivale a 0.1mm³, fd es el factor de dilución, 16 es el número de cuadros que abarca el volumen, 1000

es la conversión de mm³ a ml y 0.5 se debe a la dilución que se hace con el azul de metileno y la muestra.

8.4 Protocolos de estandarización del inóculo

Esta etapa consistió en el crecimiento y adaptación de las levaduras bajo el sistema lote alimentado.

8.4.1 sistema tradicional

En la actualidad la empresa “Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C.V) sigue el esquema de lote alimentado. Se tomo un matraz proveniente de la preparación del inóculo, bajo la tabla 12 anexo B, muestra los tiempos de las alimentaciones conforme al descenso de los grados °Brix en el mosto de fermentación, con un refractómetro manual (53000-C); alimentando con miel de agave a 12 °Brix ó 14°Brix y miel de panela a 12 °Brix. La adición de sulfato de amonio fue a la primera hora y los finales. Esto con la finalidad de alcanzar una concentración máxima de la levadura en un tiempo definido.

8.4.2 sistema 1 “aireación”

Se tomo un matraz de la preparación del inóculo, la alimentación se realizo bajo el esquema de la tabla 13 y figura 13 anexo c, las mieles fueron en las mismas proporciones que el matraz tradicional, el sistema se abasteció con una bomba de aire marca Ecopet, a una velocidad de flujo 1vvm. La adición de sulfato de amonio se realizo en la segunda y última etapa de alimentación.

8.4.3 sistema 2 “agitación”

El matraz de 2L proveniente de la preparación del inóculo, se mantuvo a 100 rpm en una agitadora Orbital Shaker (Thermo Scientific modelo 4310) figura 14 anexo B. Bajo el mismo esquema de alimentación del sistema 1.

Estos dos sistemas de mezclado tuvieron la finalidad de alcanzar altas concentraciones de biomasa en menor tiempo que el proceso tradicional.

8.5 Estrategias de la fermentación etanólica

8.5.1 Fermentación a nivel matraz sin mezclado y sin sulfato de amonio

La fermentación se realizó en tres matraces Erlenmeyer de 2 L, empleando los inóculos que provienen de la estandarización, se alimentaron al 50% de su volumen alcanzado durante la estandarización (750 mL) con mosto al 60% de miel de agave y al 40% de miel de panela a 21°Brix, alcanzándose un volumen final de 1.5 L. La fermentación fue desarrollada durante 44 h a temperatura ambiente, mantenida en condiciones de anaerobiosis. Se tomaron muestra cada 6 horas, determinando el crecimiento celular en cámara Neubauer y los °Brix.

8.5.2 Fermentación a nivel matraz agitado

El matraz de 2 L, conteniendo 0.75 L de mosto al 60% miel de agave y al 40% miel de panela a 21 °Brix, fue inoculado con una semilla al 50% del volumen de mosto, proveniente bajo el esquema de estandarización del sistema 2. La fermentación se mantuvo a una velocidad de 100 rpm en un agitador orbital (thermo scientific modelo 4310). Durante las 72 de fermentación se monitorearon cada 4 horas retirando 1ml de muestra para °Brix y tomando muestras de 100 ml cada 12 h para su posterior análisis de concentración alcohólica.

8.5.3 fermentación a nivel fermentador sin sulfato de amonio

En el fermentador marca Applikon eZ-control de 3 L, conteniendo 0.75 L de mosto al 60% miel de agave y al 40% miel de panela a 21 °Brix, fue inoculado con una semilla al 50% del volumen de mosto, proveniente bajo el esquema de estandarización del sistema 2. Durante la fermentación, se mantuvo: pH=4.3; T=30 °C y 100 rpm. El pH fue controlado mediante la adición de HCl a 1 N y NaOH a 1N. La evolución de la fermentación y los datos fueron almacenados por el software Bioxpert lite del fermentador. El tiempo de monitoreo y el lapso de la fermentación fueron las mismas que el matraz agitado.

8.5.4 fermentación a nivel fermentador con sulfato de amonio

La estandarización fue realizada bajo el protocolo del sistema 2, alcanzando un volumen total de 1200 mL. El fermentador de 3 L, conteniendo 50% de mosto al 60% de miel de agave y al 40% de miel de panela a 21°Brix, y 1.1 g/L de sulfato de amonio, fue inoculado con 50 % de semilla alcanzando un volumen de operación 2400 mL., la fermentación tuvo un lapso de 90 h, el pH fue controlado mediante la adición de HCl a 1 N y NaOH a 1N por bombas peristálticas. Se realizaron toma de muestra cada 6 h, para determinar el crecimiento celular, sólidos solubles y a partir de las 34 h se tomaron 300 mL de muestra cada 12 horas para su posterior análisis de concentración alcohólica. La adición de sulfato de amonio tiene la finalidad de aumentar la concentración de la fuente de nitrógeno ya que durante la estandarización la concentración del sulfato de amonio alcanzada es relativamente baja.

8.6. Destilación

La destilación consistió en una destilación simple, la cual fue efectuada con un Equipo Corning marca Pyrex®. En la destilación no se separó ninguna parte del destilado por lo cual el destilado fue completo. La destilación se llevó a cabo a presión atmosférica, y fue limitada a una temperatura $\leq 96^{\circ}\text{C}$.

8.7 Elaboración de manuales

A partir de la información recabada en la bitácora de laboratorio, se elaboró el instructivo de procedimientos, donde se detallaron las actividades que se realizaron para obtener un inóculo estandarizado, y la operación del controlador del fermentador y así como el manejo del software.

IX. Resultados y discusiones

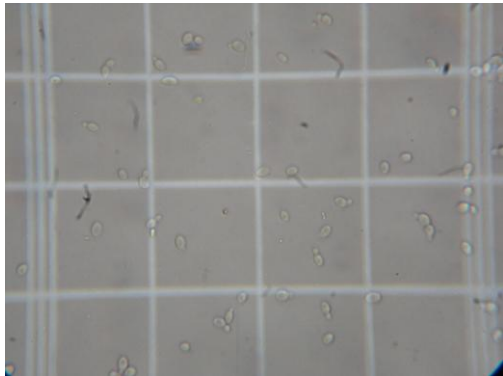
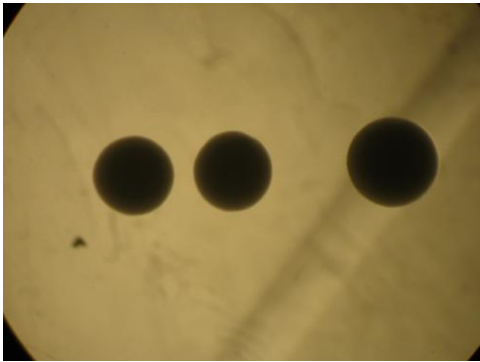
9.1 Aislamiento de levadura autóctona de la *Agave americana* L.

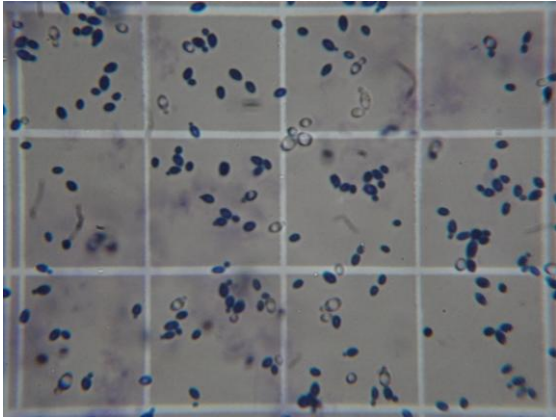
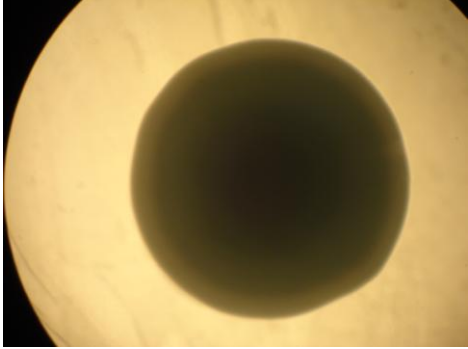
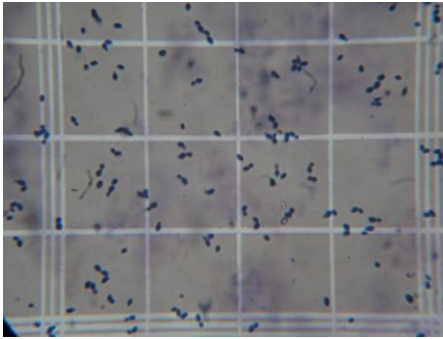

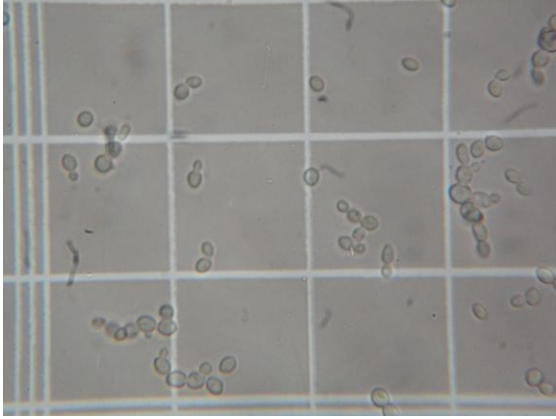
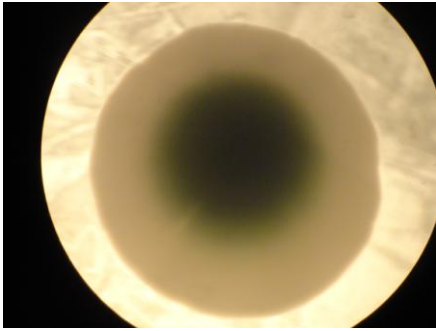
De la muestra tomada de la *Agave americana* L se aislaron 5 presuntas cepas de levaduras.

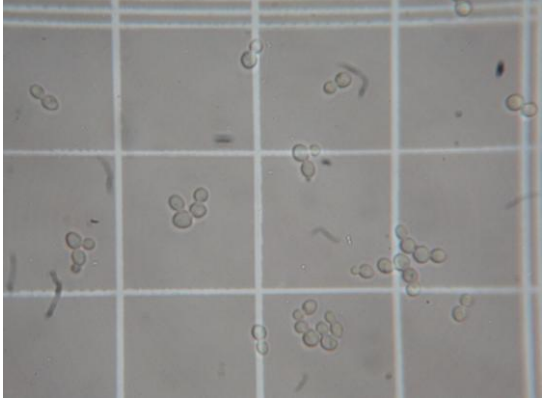
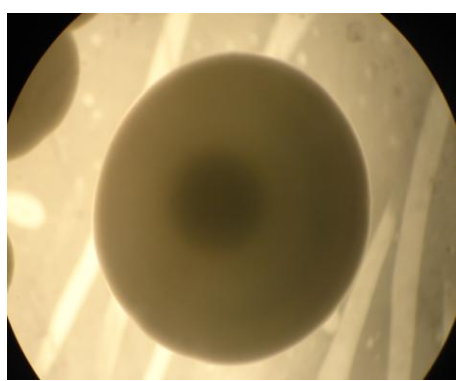
9.1.1 Características morfológicas de las levaduras aisladas

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de la muestra estudiada en el presente trabajo, se expresa a continuación en forma de tabla donde aparecen las características morfológicas (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización morfológica micro y macroscópica de las levaduras aisladas de la *Agave americana* L

Cepas	Morfología microscópica "Cámara Neubauer"	Morfología macroscópica "Estereoscopio"
Agave 1	Ligeramente ovalada, borde definido, se reproducen por gemación. Células pequeñas. Sin pseudomiselio.	WL: borde definido, circular, verde intenso, opaca, pequeña, umbricada.
		
Agave 2	Ligeramente ovalada, borde definido, se reproducen por gemación. Células medianas. Sin pseudomiselio	WL: borde definido, circular, verde intenso en el centro y luego crema, umbonada, opaca, grande.

		
	Circulares- ovoides, contorno definido, reproducción por gemación. Células pequeñas. Sin pseudomiselio	WL: borde indefinido, gran elevación (cóncava), verde intenso, opaca, pequeña, crema en los vordes.
Agave 3		
	Ovalada, borde definido, reproducción por bipartición. Células medianas. Sin pseudomiselio	WL: borde indefinido, verde intenso en el centro, opaca, grande, crema brillante en los vordes.
Agave 4		

Agave 5	Ovoides, borde definido, se reproduce por gemación. Células grandes. Sin pseudomiselio.	WL: borde definido, crema, circular, centro verde claro, opaca, grande.
		

En el medio YM + Oxitetraciclina, la Oxitetraciclina es un antibiótico de amplio espectro y muy eficaz. Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Opera a nivel de los ribosomas de la bacteria, impidiendo la fijación del ARN mensajero y el ARN de transferencia en los receptores respectivos. Inhibiendo a bacterias Gram (+) y (-), en dosis normales actúa como bacteriostático y en altas dosis como bactericida. Este medio permitió el aislamiento de 5 cepas.

El medio WL+ cloranfenicol es uno de los más utilizados para detectar y diferenciar las levaduras, aunque debe suplementarse con un bactericida cloranfenicol que inhiba totalmente el crecimiento bacteriano (Basanta, 2009).

Después de caracterizar a las levaduras de acuerdo a su morfología micro y macroscópica basándose en la tabla 5 del anexo ¿? se observa que las 5 cepas aisladas pertenecen entre las primeras 5 clasificaciones, deduciendo que la cepa Agave 1 corresponde a *Schizosaccharomyces pombe*; la cepa Agave 2, *Saccharomyces ludwigii*; la cepa Agave 3, *Saccharomyces cerevisiae* (Cavazza et al. 1992); mientras que las cepas Agave 4 y Agave 5 no fue posible ser identificadas. Sin embargo es necesario realizar pruebas bioquímicas para ser más preciso, y aplicar la biología molecular para la identificación precisa.

Durante el manejo de las levaduras fue evidente el olor característico de levaduras Agave 1, Agave 2 y Agave, que expiden las levaduras empleadas en las fermentaciones.

9.2 Prueba de fermentación de azúcares

Para llevar a cabo la fermentación, la prueba de fermentación de azúcares se empleó para seleccionar a los microorganismos que fueron capaces de fermentar los azúcares sacarosa, fructosa y glucosa debido a que estos son los azúcares presentes en la miel de agave y miel de panela utilizadas como sustrato y única fuente de materia y energía para la producción de etanol.

En la tabla 6 se observa que las cepas Agave 1 fue la cepa que presentó mejores resultados respecto a la sacarosa la cual se encuentra en mayor concentración, en la cepa Agave 3, fueron las que obtuvieron mayor producción de gas al fermentar sacarosa. Por consiguiente, estas cepas podrían adaptarse de mejor manera al medio de cultivo empleado.

Tabla 4. Azucares fermentables por las cepas aisladas.

Cepa	Formación de gas; Fermentación de azúcares					
	Azúcares	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4	Dia5
Agave 1	sacarosa	+++	++++	++++	++++	++++
	fructosa	+	++	+++	++++	++++
	glucosa	+	++	++	++	++
	lactosa	-	-	+	++	+++
	manitol	+++	++++	++++	++++	++++
Agave 2	sacarosa	++	+++	+++	+++	+++
	fructosa	+	++	+++	+++	+++
	glucosa	+	++	++	++	++
	lactosa	-	-	+	++	+++
	manitol	-	-	-	-	-
Agave 3	sacarosa	-	-	+	+	+
	fructosa	+	+	+	++	++
	Glucosa	++	+++	+++	++++	++++
	Lactosa	-	-	-	-	-

	manitol	-	-	-	-	-
Agave 4	sacarosa	-	-	+	+	+
	fructosa	-	-	+	+	+
	glucosa	+++	++++	++++	++++	++++
	lactosa	-	-	+	+	+
	manitol	-	-	-	-	-

Acotaciones: - Nulo; + mínimo; ++ escaso; +++ poco; ++++ mucho; +++++ Abundante.

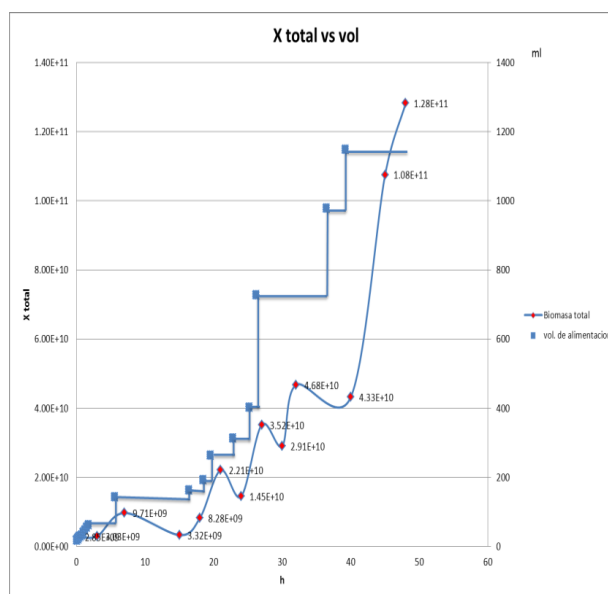
9.3 Estandarización del inóculo

9.3.1 sistema tradicional

Durante la estandarización tomando como base la técnica realizada en la empresa Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C.V. se obtuvieron los siguientes resultados tabla 5 y grafica 1, alcanzando una concentración celular de 1.11×10^8 lev/ml, un tiempo de 48 horas.

Tabla 5. Estandarización tradicional

t(h)	X total	vol.acum
0	2.85E+09	18.75
3	3.03E+09	63.75
7	9.71E+09	143.75
15	3.32E+09	163.75
18	8.28E+09	193.75
21	2.21E+10	263.75
24	1.45E+10	313.75
27	3.52E+10	403.75
30	2.91E+10	728.75
32	4.68E+10	978.75
40	4.33E+10	1149.25
45	1.08E+11	1149.25
48	1.28E+11	1149.25



Gráfica 1. Cinética de crecimiento

9.3.2 sistema 1

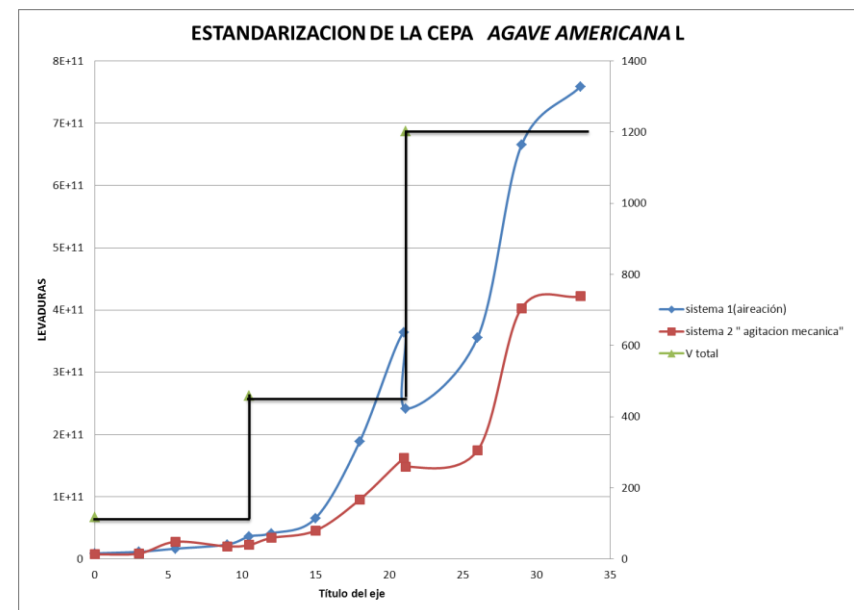
Durante la estandarización bajo este sistema se obtuvieron los siguientes resultados en la tabla 6 y grafica 2, alcanzando una concentración celular de 6.85×10^8 lev/ml en 35 horas.

9.3.3 sistema 2

Durante la estandarización bajo este sistema se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la tabla 6 y grafica 2, alcanzando una concentración celular de 3.33 lev/mL en 33 horas.

Tabla 6. Estandarización sistema aireado y agitado

t _{alimentación} (h)	Xtotal	°Bx	Xtotal	°Bx	V _{total}
0	9E+09	6	8E+09	6	118
3	1E+10	4	9E+09	4	118
5.5	2E+10	3	3E+10	3	118
9	2E+10	2	2E+10	2	118
10.5	4E+10	10	2E+10	10	458
12	4E+10	9	3E+10	9	458
15	7E+10	8	5E+10	8	458
18	2E+11	5.5	1E+11	5.5	458
21	4E+11	2.5	2E+11	2.5	458
21.15	2E+11	8	1E+11	8	1203
26	4E+11	6	2E+11	6	1203
29	7E+11	4	4E+11	4	1203
33	8E+11	3	4E+11	3	1203



Grafica 2. Cinética de crecimiento vs volumen de alimentación durante la estandarización del sistema 1 y 2

Durante el desarrollo de los tres sistemas, el mejor sistema es el de aireación ya que la producción de biomasa alcanza una concentración de 6.85 lev/mL en 33 horas, esto se debe principalmente a la suministración de oxígeno al medio (aerobiosis), donde la cepa Agave-1 sigue la ruta de glicolisis, utilizando en su totalidad el sustrato para la formación de energía (ATP) y compuestos macromoleculares que le permiten la formación de macroestructura para su reproducción, en tanto el sistema 2, el crecimiento de biomasa fue baja en comparación al sistema 1 alcanzando una concentración de 3.33×10^8 lev/mL en el mismo tiempo del sistema 1, mientras que en la estandarización tradicional en base la técnica realizada por la empresa comiteco, la concentración alcanzada es inferior en comparación al sistema 1 y 2. Alcanzando una concentración de 1.11×10^8 lev/mL cabe mencionar que esta concentración se alcanzó en 44 h, la baja concentración se debe a que la estandarización se realiza bajo condiciones de anaerobiosis, donde la falta de oxígeno obliga a la levadura en cuestión de su metabolismo, a realizar cambios fisiológicos, induciendo a la producción del piruvato, pero sólo en cantidades pequeñas entra en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos a fin de producir intermediarios para la biosíntesis de material celular esencial y no en la formación de energía y la única forma de compensar este balance es mediante la formación de energía en la producción de etanol, razón principal donde el sustrato no es metabolizado en su totalidad para fines de biosíntesis estructural y energética, si no parte del sustrato es metabolizado en la producción de etanol, alcanzando concentraciones bajas.

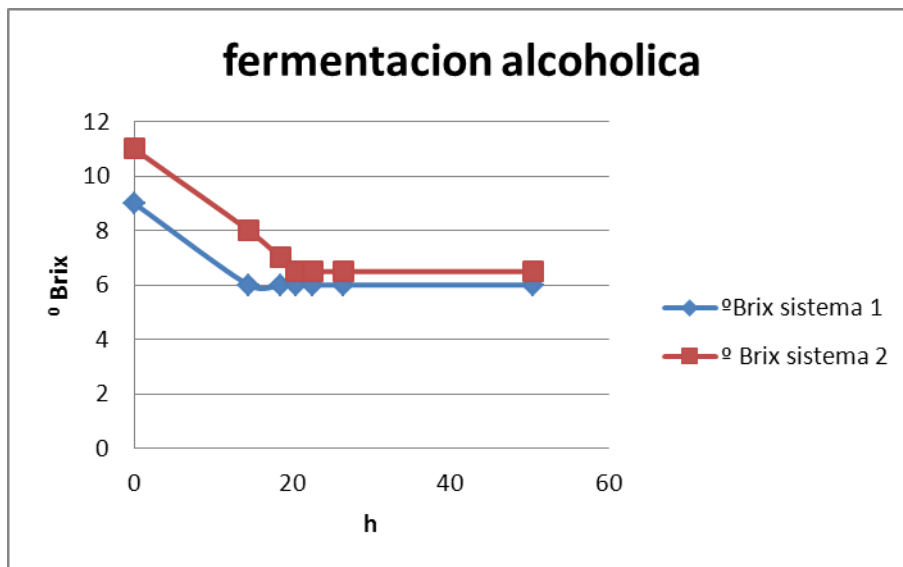
9.4 Estrategias de la fermentación etanólica

9.4.1 Fermentación a nivel matraz sin sulfato de amonio

Durante la fermentación en el matraz se obtienen los siguientes datos mostrados en la tabla 7 y figura 4, la evolución de la fermentación mediante la evaluación de los °Brix, se alcanza un tiempo de fermentación de 50.5 horas. Se siguió la variable °Brix, como aquella variable que mantiene una estrecha relación de la concentración de sólidos solubles (sustrato). Se puede apreciar en los datos de la tabla 7 como en la grafica 4 el matraz 1 proveniente del sistema 1, a partir de las 14.5 horas cesa su actividad, esto se debe a que la concentración inicial del sustrato fue menor que el matraz 2, teniendo como diferencia 2 unidades bajo los °Brix.

Tabla 7. Datos de los °Brix en ambas sistemas

t(h)	° Brix _{sistema 1}	° Brix _{sistema 2}
0	9	11
14.5	6	8
18.5	6	7
20.5	6	6.5
22.5	6	6.5
26.5	6	6.5
50.5	6	6.5



Grafica 4. Evolución del ° Brix durante la fermentación.

9.4.2 Fermentación a nivel matraz agitado sin sulfato de amonio

En la tabla 8 y grafica 5, muestra la concentración final alcanzada en la estandarización previo a la fermentación. El matraz fue Inoculado con una concentración inicial de 4.75×10^8 levaduras/ml. Los resultados de la fermentación se muestran en la tabla 9 y grafica 6.

9.4.3 Fermentación a nivel fermentador sin sulfato de amonio

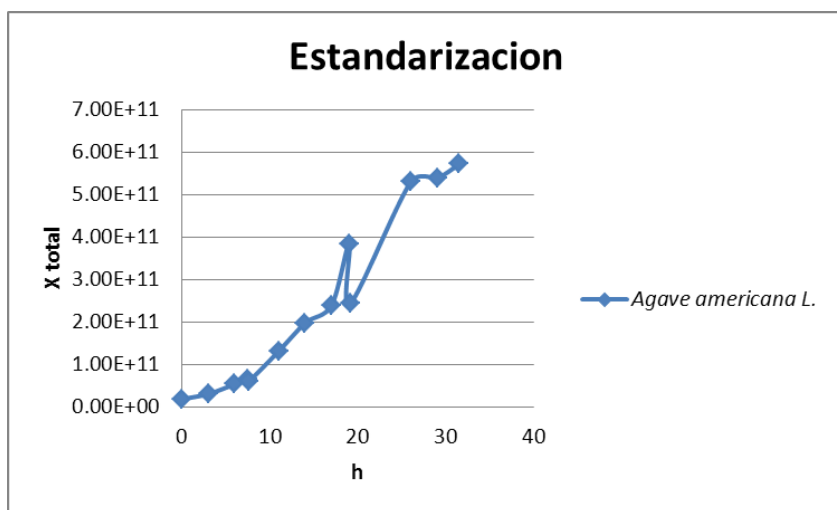
Inoculados con una concentración inicial de 4.75×10^8 levaduras/ml. Los resultados obtenidos durante la fermentación se muestran en la tabla 9, grafica 6 y 7.

9.4.4 Fermentación a nivel fermentador con sulfato de amonio

En la etapa de estandarización se obtuvo una concentración celular de 2.877×10^8 lev/ml y 5 °Brix final. Durante la fermentación se obtuvieron los siguientes datos, en la tabla 10 y figura 13, se puede observar que la concentración de biomasa máxima alcanzada es a las 26 h, sin embargo los °Brix mantuvo un valor de constante de 7 a partir de las 20 horas hasta el término de la fermentación.

Tabla 8. Conteo de biomasa total

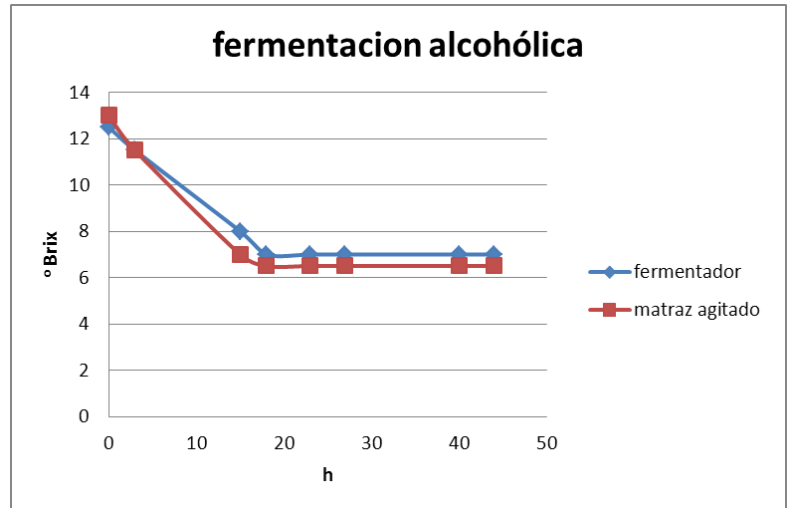
t(h)	X total
0	1.93E+10
3	3.16E+10
6	5.44E+10
7.5	6.53E+10
7.6	6.15E+10
11	1.33E+11
14	1.99E+11
17	2.41E+11
19	3.85E+11
19.1	2.44E+11
26	5.31E+11
29	5.40E+11
31.5	5.73E+11



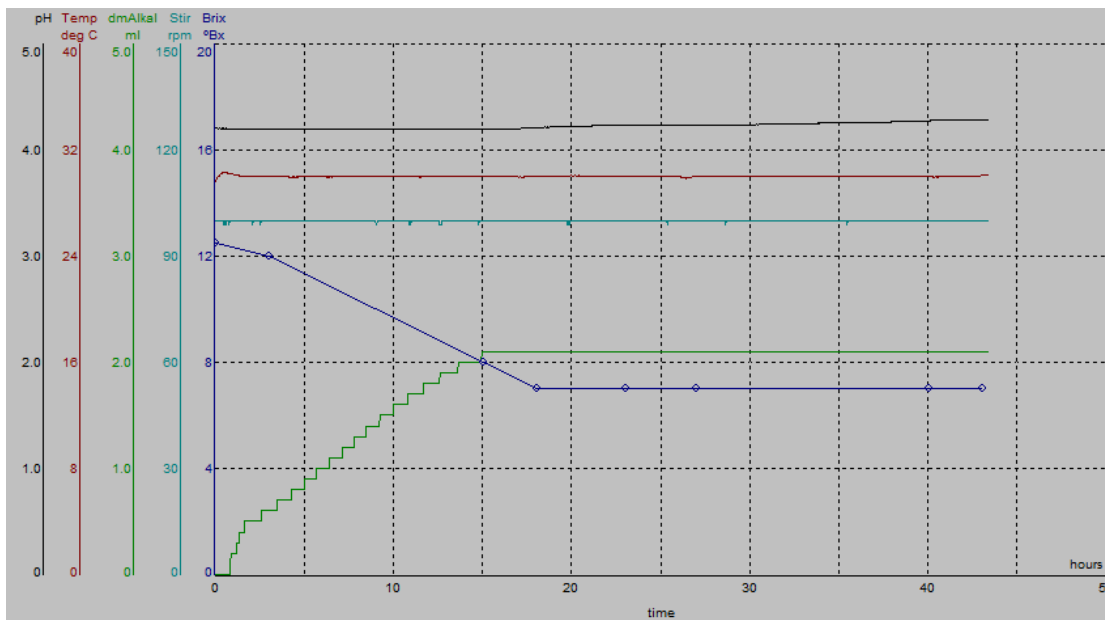
Grafica 5. Cinética de crecimiento.

Tabla 9. Datos de los °Brix en ambas sistemas

t(h)	°Brix _{fermentador}	°Brix _{matraz}
0	12.5	13
3	11.5	11.5
15	8	7
18	7	6.5
23	7	6.5
27	7	6.5
40	7	6.5
44	7	6.5



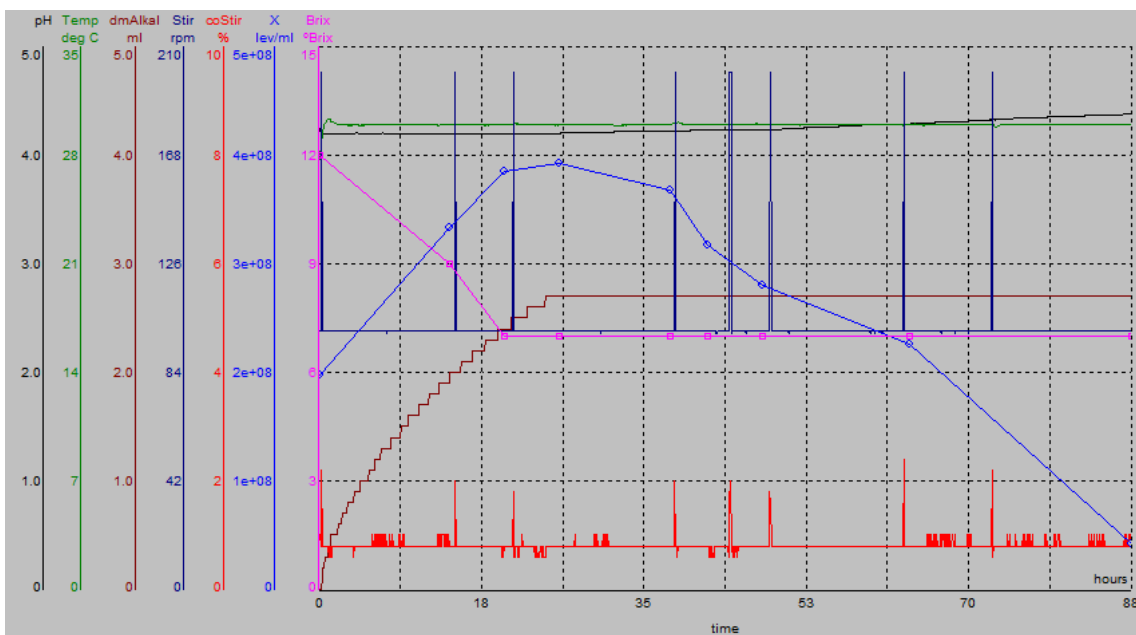
Grafica 6. Evolución del ° Brix durante la fermentación.



Grafica 7. Monitoreo on-line durante la fermentación pH=4.3; T=30°C y a 100 rpm vs t
Y fuera de línea °Brix vs t

Tabla 10. Datos generados durante la fermentación de la cepa A_1

t(h)	X(lev/mL)	°Brix
0	9.83E+13	12
14	2.50E+14	9
20	3.27E+14	7
26	3.91E+14	7
36	3.68E+14	7
42	3.17E+14	7
48	2.80E+14	7
60	1.13E+14	7
72	7.80E+13	7
88	2.13E+13	7



Grafica 8. Evolución de la fermentación graficado por el software Bioxper lite mediante valores on- line (pH, T, agitación y potencia y off-line (°Brix y biomasa)

Todo el desarrollo de las diferentes estrategias de las fermentaciones alcanza a disminuir el ° Brix en un rango de 6-7 en un lapso de 12-24 h, valor usado como cuantitativo para definir el tiempo de la fermentación.

La fermentación a nivel fermentador con y sin sulfato de amonio, en las graficas 7y 8, las variables T y pH se mantuvieron constantes, en tanto las fluctuaciones de la velocidad de agitación (rpm) es debido al aumento de la velocidad al momento de tomar la muestra, la adición de base observada en la grafica, fue incrementándose hasta un tiempo de 25 horas sin sulfato de amonio y un tiempo de 26 horas con sulfato de amonio, mismo tiempo que se alcanza la máxima

concentración celular, esto permite deducir que el aumento de biomasa libera cierto compuesto que cambia la acides del medio, detectado por el sensor de pH, esta variable podría ser usada como un índice de crecimiento celular, sin la necesidad de realizar un conteo celular.

9.5 Destilación

En la etapa de destilación la temperatura de ebullición del etanol es a los 80 °C, se esperaba la destilación comenzara a esa temperatura, sin embargo, no se logró la destilación a esa temperatura ya que comenzó a 92 °C, por lo tanto los destilados fueron a esta temperatura llegando a los 96 °C.

Para la determinación de la concentración de los destilados, se realizo mediante el equipo de densímetro. Resultados mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados de los destilados

Destilados de la fermentación a nivel matraz sin sulfato de amonio						
sistema	Concentración % (p/p)	Densidad (g/cm ³)	Vol. de mosto (ml)	Vol. Destilado (ml)	Rendimiento % (v/v)	Producción (g _{et-OH} /ml mosto)
Sistema 1	74.29 ±2.2344	0.85730	1000	30	3	0.02599
Sistema 2	71.13± 2.2344	0.8613	1000	35	3.5	0.02890

Datos de empresa comiteco Balún Canán S.A de C.V					
Vol. De mosto (L)	Vol. Destilad (ml)	Concentración % (p/p)	Densidad (g/cm ³)	Rendimiento % (v/v)	Producción (g _{et-OH} /ml mosto)
3	180	43.74 ±1.5692	0.92738	6	0.02829
3	180	41.52±1.5692	0.93203	6	0.02672
Corrida 1. Fermentación a nivel fermentador sin sulfato de amonio controlando; pH= 4.3, T= 30 °C y 100 rpm.					
Vol. De mosto (mL)	Vol. Destilado (mL)	Concentración % (p/p)	Densidad (g/cm ³)	Rendimiento %	Producción (g _{et-OH} /ml mosto)
100	3	70.55±3.3123	0.9696	3	0.02096
100	2	67.7 ±3.3123	0.9754	2	0.0138
100	2	69.5±3.3123	0.9765	2	0.01423

100	3	67.55±3.3123	0.9770	3	0.02074
Fermentación en matraz agitado sin sulfato de amonio, agitación a 100 rpm					
100	4	66.35±1.7991	0.97739	4	0.2715
100	3.9	64.2 ±1.7991	0.9779	3.9	0.0256
100	4.5	68.25±1.7991	0.9770	4.5	0.0314
100	3.8	64.85±1.7991	0.9777	3.8	0.0232
Corrida 2. Fermentación a nivel fermentador con sulfato de amonio, controlando; pH= 4.3, T= 30 °C y 100 rpm.					
300	8.7	73.81± 4.1123	0.85847	2.9	0.02900
300	8.8	67.75± 4.1123	0.87295	2.933	0.02933
350	10.9	69.13±4.1123	0.8696	3.111	0.0311
400	11	78.98±4.1123	0.8459	2.7542	0.02754
815	18.9	72.95±4.1123	0.8605	2.3333	0.02333

La desviación estándar de los resultados en base a la producción.

$$S = \pm 2.21E-03$$

S= desviación estándar

Durante la estandarización con los dos sistemas propuestos, tienen consecuencia en la fermentación y destilación alcohólica como se muestra en la tabla 14, a un que no es significativa la diferencia en la concentración, más que en el volumen del destilado de ambos sistemas. Sin embargo en comparación con la estandarización realizada por dicha empresa, se ve una diferencia significativa en el volumen de destilado y el rendimiento ya que al comparar ambas sistemas se obtiene un rendimiento de 3%, mientras que el tradicional es de 6%, la desventaja está en que la concentración de alcohol obtenido por la empresa es baja, sin embargo bajo el análisis de producción no hay diferencia significativa. En el fermentador, los datos obtenidos no difieren de los demás sistemas.

La adición de sulfato de amonio al principio de fermentación, incrementa relativamente la concentración del alcohol, sin embargo el los rendimientos y volumen de destilado, como se observa en la tabla 1, es idéntica a la fermentación sin sulfato de amonio.

9.6 Elaboración de manuales durante la estandarización del inóculo y el uso del fermentador

A partir de la metodología establecida, se procedió a la realización de manuales de procedencia para la generación del inóculo de la levadura nombrada Agave 1, para las etapas de aislamiento, estandarización y la fermentación en el fermentador Applikon. "Manual de aislamiento" código MA-ITTG-01," manual estandarización" código ME-ITTG-01, manual de "fermentación fermentador Applikon" código MFA-ITTG-01.

ITTG	Manual de procedimientos	Código: MA-ITTG-01
	Laboratorio de investigación	
	Procedimiento de aislamiento	

proceso	Secuencia	Actividad
1. preparación de materiales y toma de muestra	1.1 Preparación y limpieza de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Matraz Erlenmeyer de 250 ml 2. Vasos de de precipitado de 50 ml y 500ml 3. Puntas para micropipetas de 1000 µL de capacidad. 4. Reactivos medio de cultivo YM y WL 5. Antibióticos Oxatetraciclina y cloranfenicol. 6. Tubos de 16 x 150 con tapón de rosca 7. Cajas de Petri estériles 8. Termo y hielera
	1.2 Recolección y transportación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recolectar 500 ml de aguamiel de agave en un termo limpio 2. Transportar la muestra en una hielera
2.0 Crecimiento en matraz	2.1 Preparación de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación 50 mL/matraz de medio de cultivo YM + oxitetraciclina (g/L) y cajas petri con WL + cloranfenicol (g/l) así como cajas petri medio YM + oxitetraciclina.

		2. Tomar 5 ml de agua miel e inocular en los matraces de medio YM.
	2.2 Condición de los matraces	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incubar los matraces durante 8 h, una a temperatura ambiente y otra a 30°C. 2. Tomar una asada de los matraces incubados y resembrar en un matraz con medio YM bajo las mismas condiciones de procedencia. 3. Incubar los matraces a temperatura ambiente y a 30°C durante 13h.
3.0 Aislamiento en cajas	3.1 Aislamiento en medio YM	<ol style="list-style-type: none"> 1. Homogenizar la muestra 2. Tomar una azada de los matraces incubados y realizar una estría cruzada. 3. Incubar las cajas bajo las mismas condiciones de procedencia durante 2 días. 4. Con un estereoscopio y microscopio observar su morfología macro y micro.
	3.2 Aislamiento en medio WL	<ol style="list-style-type: none"> 1. De las colonias aisladas en el medio YM e identificadas diferente mente mediante un código. 2. Tomar una azada de la colonia asilada previamente codificada, realizar una estría cruzada en medio WL, incubar a las mismas condiciones de procedencia durante 3 días. 3. Con un estereoscopio y microscopio observar su morfología macro y micro.
	Nota:	Todas las pruebas deben ser triplicados
4.0 Preservación	4.1 Preparación de material	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar tubos de 16x150 con 7 ml de medio YM agar. 2. Esterilizar los tubos a 15 libras durante 15 minutos. 3. Inclinar los tubos, para su solidificación. 4. Rotular los tubos con los códigos de la levadura.
	4.2 Siembra en tubo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Limpiar el área de la mesa con cloruro de benzoico y prender el mechero de bunsen.

		<p>2. Tomar una azada de las colonias aisladas previamente codificadas y realizar estria cruzada masiva en los tubos.</p> <p>3. Incubar a 30°C durante 3 días</p> <p>4. Gradar los tubos en refrigeración.</p>
	Nota:	<ul style="list-style-type: none"> • Resembrar las cepas aislados cada 2 meses en medio YM • Resembrar la cepa de interés mínimo 5 días antes de su utilización.

ITTG	Manual de procedimiento	Código: ME-ITTG-01
	Laboratorio del polo tecnológico	
	Procedimiento de estandarización	

Proceso	Secuencia de etapas	Actividad
1.0 Crecimiento en matraz	1.0 Preparación de materiales	<p>2. Limpiar el área de trabajo con cloruro de benzoico</p> <p>3. Preparar 70 ml medio de cultivo YM en un matraz Erlenmeyer.</p> <p>4. Puntas de micropipetas de 1000 µl.</p> <p>5. Agua destilada en un matraz Erlenmeyer.</p> <p>6. El medio de cultivo, las puntas y el agua destilada, se esterilizan en una autoclave a 15 lb durante 15 minutos.</p>
	1.1 preparación del inculo	<p>1. Tomar tres tubos de la cepa A_1</p> <p>2. Suspender con 5 mL de agua estéril.</p> <p>3. Inocular al 10% (V/V) en el matraz de medio de cultivo YM.</p> <p>4. Homogenizar la muestra y tomar 1 ml de</p>

		<p>muestra con punta estéril.</p> <p>5. Depositar 0.5 ml de muestra + 0.5 ml de azul de metileno en un tubo de ensaye.</p> <p>6. Realizar conteo celular en cámara Neubauer.</p> <p>7.0 Incubar a 30°C, agitado a 100, durante 8 h.</p> <p>8. Repetir paso 4,5 y 6, para saber la concentración.</p>
2.0 Estandarización	2.1 preparación de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Probeta de 100 y 500 ml 2. Mortero 3. Miel de agave y panela 4. Agua destilada 5. Refractómetro 6. Matraz de 2 L 7. Bomba de aire 8. Filtros 9. Orbital shaker.
	2.2 cinética de crecimiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tomar el volumen total de inóculo obtenido de la estandarización. 2. Armar el sistema de aireado y agitado figura 13 y 14 anexo B. 3. Realizar la alimentación, bajo el esquema de lote alimentado intermitente. 4. Tomar muestras cada 3 horas previamente homogenizado la muestra. 5. Realizar conteo celular con cámara Neubauer, °Brix con un refractómetro. 6. Reportar el conteo como células totales.

ITTG	Manual de procedimiento	Código: MFA-ITTG-01
	Laboratorio del polo tecnológico	
	Fermentación alcohólica en un fermentador de tanque agitado	

proceso	Secuencia	Actividad
1. preparación de materiales	1.0 Preparación y limpieza de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Limpiar el área de trabajo con benzal y cloro comercial. 2. Lavar el fermentador de 3L marca Applikon con benzal y etanol al 75%. 3. Dejar secar y evaporar el alcohol del fermentador. 4. Prepara las mieles de agave y panela a 21 °Brix, ajustados con agua destilada con un refractómetro. Con el respectivo porcentaje 60% miel de agave y 40% mile de panela, representando un volumen total del 50% de semilla. 5. Preparar una solución de acido y base a 1N.para ajustar el pH durante la fermentación. 6. Limpiar el sensor de pH con agua desionizada y limpiar con pañuelos klinecs.
	1.1 Preparación del inculo y estandarización	<ol style="list-style-type: none"> 1. La preparación del inculo fue seguido bajo las especificaciones del manual “Procedimiento de estandarización” código ME-ITTG-01
2.0 fermentación	2.1 Proceso de inoculación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Encender el controlador del fermentador Applikon 2. Calibrar el sensor de pH del fermentador con dos soluciones a pH 4 y 7. 3. Llenar el fermentador con el mosto 3. Inocular el fermentador con la semilla al 50% del volumen del mosto. 4. Cerrar el fermentador y conectar todos los tubos de entradas para la solución de acido o base, a si como la conexión de los sensores en su respectivo entrada.

	2.2 Operación y control del fermentador	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bajo el seguimiento del manual de operación del fermentador se ajustaron los puntos óptimos de la fermentación el pH=4.3, T= 30°C y a 100 rpm. 2. Encender computadora con el software Bioxpert-lite, para la recolección y almacenamiento de datos.
	2.3 Toma de muestra cada 6 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aumentar la agitación del fermentador de 3 L a 200 rpm durante un tiempo de 2 min. 2. Tomar 2 ml de muestra 3. Colocar la agitación a 100 rpm
	2.4 Realizar mediciones de variables	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar cuenta celular con cámara Neubauer. 2. Medir sólidos solubles con refractómetro.
3.0 Producción de alcohol en el fermentador	3.1 Preparación y limpieza de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Probeta graduada de 500 ml 2. Equipo Corning 3. Bombas de agua y mangueras 4. Tubos falcon 5. Densímetro modelo marca Anton Par
	3.2 Toma de muestra a partir de 36h y cada 12 h en adelante	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aumentar la velocidad de agitación a 200 rpm durante 2 min. 2. Tomar 300 ml de muestra en tubos falco, congelar las muestras antes de la destilación. 3. Ajustar nuevamente a 100 rpm. 4. Concluida la fermentación retirar todo el mosto restante para su destilación. 5. Lavar el fermentador con una solución de cloro y con detergente líquido.
	3.3 Destilación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Armar equipo Corning 2. Medir volumen del mosto a destilar 3. Colocar una cubeta de agua fría donde se sumerge las bombas para enfriar el refrigerante durante la destilación, añadir bosas de hielo al agua. 4. Calentar la parrilla para la evaporación del alcohol

		<p>5. Recoger destilado en un tubo falcon.</p> <p>6. Medir la concentración de etanol en un densímetro Anton Para</p> <p>7. Guardar muestra en refrigeración.</p>
--	--	---

El fermentador Applikon consiste básicamente en las siguientes partes:

Dispositivos auxiliares del fermentador	
Auxiliares	Propiedades
Sensor de Oxígeno Disuelto (ADI DO ₂)	Sensor polarografico que mide la presión parcial del oxígeno disuelto del medio de cultivo. Sensor de 12 mm de diámetro. Temperatura máxima de esterilización a 135 °C
Sensor de pH	Sensor polarografico que mide la cantidad de iones hidrogeno libres del medio de cultivo. Teniendo 12 mm de diámetro. la temperatura máxima del sensor es igual al de DO ₂
Sensor de T	Sensor galvánico que mide Cambios de resistencia eléctrica con la temperatura.
Sensor de nivel	Electrodo metálica que detecta el nivel de espuma.
Toma de muestra	El sistema de muestreo con una botella de vidrio es montado sobre la placa de cabeza del reactor. Este sistema es completado con una jeringa.
Rotámetros	Cada rotámetro contiene una válvula de no retorno en la salida de gas que evita las diferencias de presión para provocar el reflujo a través del rotámetro.
Manta eléctrica	Una manta de calefacción que se envuelve alrededor del biorreactor de vidrio (sin chaqueta). La temperatura máxima de la manta de

	calentamiento es de 80 ° C.
Bombas	Tres bombas peristálticas tiene instalado para abastecer la adición de Acido, Base y antiespumante
Motor P-100	Motor estándar para biorreactores Applikon de 3 litros, con medios de baja viscosidad. Velocidad de 0 a 2000 rpm.
Impelentes Rushton	Se utilizan principalmente para aplicaciones microbianas.
Baffles	Se utilizan para aumentar la eficiencia de mezclado.
Dispersores	Para satisfacer la demanda de oxígeno de un cultivo, una corriente de gas estéril se puede burbujear a través del cultivo por medio de los dispersores.
Condensador salida de aire	Trabajando a temperaturas elevadas y el uso de la aireación del cultivo podría provocar la evaporación demasiado durante fermentación, causando un aumento de la concentración de nutrientes y una disminución en el volumen.
Intercambiador de calor	Este intercambiador es fijado en la placa.
Porta termómetro	Es un tubo donde permite introducir el termómetro sin hacer contacto con el medio.

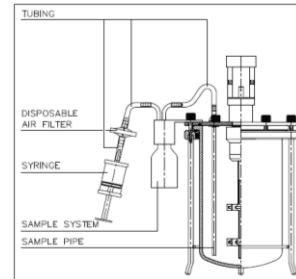
ITTG	Manual de procedimientos	Código: MOFA-ITTG-01
	Laboratorio de investigación	
	Operación del fermentador Applikon	

proceso	Secuencia	Actividad
1. uso del fermentador	1.1 limpieza y armado	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sanitizar todas las piezas del fermentador con cloro, benzal y alcohol al 75%. 2. Llenar el fermentador con el medio de cultivo. 3. Armar todas las piezas del fermentador y conectar los mangueras de alimentación para el ácido, la base o antiespumante y el aire, en su respectivo bomba peristáltica. 4. Quitar tapón de los sensores (pH y DO₂), para su conexión con el controlador. 5. introducir sensor de DO₂. 6. calibrar sensor de oxígeno en el controlador 7. Calibrar sensor de pH, con dos soluciones buffer de pH=4 y 7 en el controlador 6. introducir el sensor de pH al medio de cultivo 8. Introducir sensor de temperatura, en un porta tubo llenada con agua. 9. Introducir sensor de nivel. 10. Colocar el motor.
2.0 operación del controlador	2.1 Calibración y control del pH.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Encender el controlador por la parte de atrás. 2. En la pantalla principal, ir a opción VIEW, seleccionar OPERADOR, LOGIN introducir clave 0000 seleccionar ENTER, regresar a la pantalla principal en opción HOME. Este paso siempre realizarla por razones de bloqueo. 3. Pantalla principal parte inferior seleccionar opción pH → pH CALIBRATE → RESET CALIBRATE VALUES → 2-POINT CALIBRATION esta opción abrirá una ventana introducir el valor de la temperatura del buffer → ENTER introducir sensor en el

		<p>buffer pH=4, a la vez introducir el valor en la pantalla esperar que se estabilice el valor seleccionar ENTER. Limpiar sensor con agua destilada, sumergir sensor en el segundo buffer pH=7 realizar los mismos pasos. Una vez concluida la calibración regresa la pantalla principal.</p> <p>4. Ajustar Alarmas. Opción pH → ALARM LIMITS → UPPER Y LOWER seleccionar cual quiera de estas dos opciones e introducir el valor ENTER.</p> <p>5. Monitor de dosis permite guardar la cantidad de ácido o base adicionado al medio de cultivo. Resetear cuando se comience una nueva fermentación MENU → DOSE MONITOR → RESET ALL DOSE MONITOR todos los valores retornar a cero, regresar pantalla principal HOME.</p> <p>6. Ajuste al valor deseado a controlar. Seleccionar opción pH → pH SETPOINT → introducir valor, seleccionar ENTER.</p> <p>7. Comenzar a controlar el proceso. pH → STAR pH CONTROLLER.</p>
	<p>Nota:</p>	<p>La calibración del sensor de pH requiere que los buffer estén lo más cercano a la temperatura a controlar, debe de realizarse también previo a la esterilización. Al momento de esterilizar debe estar cubierta la parte superior de la conexión con su tapa. Por otra parte una vez concluida la fermentación se debe almacenar en agua pura, no destilada. La esterilización del fermentador es a 15 Lb durante 15 minutos.</p>

Operación del controlador	<p>2.3 Calibración y control del Oxígeno Disuelto (DO)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Si se esteriliza el fermentador el sensor debe cubrirse la conexión con la tapa. 2. Después del esterilizado en dado caso se haya realizado, conectar nuevamente el sensor al controlador. 3. Polarizar el sensor durante 8 horas. 4. Seleccionar opción OD₂ → DO₂ CALIBRATE ▶ RESET CALIBRATE VALUES → SET → MEASUREMENT RANGE → MEASUREMENT RANGE FOR AIRE se pone de color café, regresar a la pantalla botón gris → CALIBRATION ▶ 1-POINT CALIBRATION → ENTER VALUE introducir el valor 100 %. 5. Seleccionar DO₂ SETPOINT inserte el valor a controlar → STAR CONTROLLER.
	<p>Nota:</p>	<p>El electrolito que contiene el sensor DO₂ debe cambiarse cada mes, mientras que la membrana cada 2 años. Guardar siempre con la tapa puesta.</p> <p>El sensor de pH debe mantenerse con la tapa con agua de llave, tiene 50 ciclos de esterilización.</p> <p>La calibración de pH realizar siempre antes de un nuevo cultivo.</p> <p>El sensor de DO₂ polarizar siempre durante 8 horas</p>
	<p>2.4 Calibración y control de temperatura</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. El sensor de temperatura es calibrada cada 6 o más años. 2. Seleccionar opción Temperature → CALIBRATE TEMPERATURE insertar el sensor en agua a una temperatura conocida. 3. Esperar que la temperatura sea mostrada en la parte inferior de la pantalla. 4. seleccionar 1-POINT CALIBRATION introducir el valor de la temperatura registrada. 6. Ir a menú principal de la temperatura seleccionar





		<p>Temperature Setpoint introducir valor y STAR CONTROLLER</p> <p>7. Los límites de alarma se configuran exactamente como el de pH.</p>
	<p>2.5 Sensor de nivel</p>	<p>Esta no requiere calibración ya que es un sensor de encendido o apagado</p> <p>Solo se escoge la sensibilidad.</p> <p>Seleccionar opción LEVEL → SENSITIVITY High: conductivity $\geq 26 \mu\text{S}$ equals "contact" → menu principal LEVEL → STAR CONTROLLER</p>
	<p>3.0 Sistema de muestreo</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Conectar una jeringa al tubo que está conectado a la "púa fuera" del sistema de muestreo. En este tubo no debe haber un filtro o algodón. 2. Tire del émbolo de la jeringa para crear un vacío en la botella de muestra. Como resultado, cierto volumen es recogido en el recipiente. 3. Vuelva a colocar la botella de muestra asépticamente con un mechero.



	4.0 Control de la velocidad de agitación de	<p>1. seleccionar opción STIRRER → Stirrer setpoint introducir valor a controlar ENTER → Star stirrer controller</p> <p>2. los límites de alarma son configurados como fue realizado con el pH.</p>
Nota:		Cuando se desee detener la fermentación ir en cada opción y elegir stop controller ó seleccionar la opción menú → star/stop all controller .

ITTG	Manual de procedimientos	Código: MMSB-ITTG-01
	Laboratorio de investigación	
	Manejo del software Bioxpert lite	

Proceso	Opciones	Actividad
Manejo del software	1. Cultivación	<p>1. Encender la computadora</p> <p>2. Ir a Menú, seleccionar el programa Bioxpert lite.</p> <p>3. Seleccionar el nombre de Usuario, elegir Cultivation seleccionar OKY.</p> <p>4. En la ventana principal por la parte superior seleccionar opción RUN, aparecerá una ventana introducir nombre de microorganismo y comentarios, presionar OKY.</p> <p>5. Aparecerá otra ventana, seleccionar la opción Access interval (min) para 1 =5días, 2=11 días, seleccionar en base a los días de fermentación. En la parte derecha de la tabla seleccionar opción Locate, abrirá otra ventana donde hay que seleccionar un archivo donde se</p>

		guardaran los datos, en la parte izquierda de la ventana aparece la opción File Name , introducir el nombre del archivo con terminación .frm, ej. "Lote1.frm", seleccionar OKY 6. Al seleccionar OKY , retornara a la ventana principal.
1.1 opciones para visualizar graficas		Dar clic mouse botón izquierdo, aunado a esto seleccionar también las variables controladas para que aparezcan todas las graficas.
		selecciona las variables que se muestran en la ventana de la tabla, después de hacer doble clic en este icono, la selección se presentan en el gráfico
		Opción que permite ver la grafica individual de cada variable.
		Permite mostrar todo los valores en tabla.
Notas:		Todas estas opciones aparecen en la parte inferior de la ventana principal, son las que permiten visualizar las graficas.
1.2. Configurar escalas de la grafica		1. Para poder configurar en el eje X, seleccionar con el mouse izquierdo en la parte inferior de la grafica, aparecerá otra ventana con nombre principal, time or variable in X-axis-f1- , verificar. 2. Aparecerá un listado de opciones, seleccionar la variable que desee esté en el eje de las X. 3. la ventana permite configurar la escala ya sea manual mente o con la opción keep width , una vez configurado seleccionar OKY . 4. En el eje Y, en la parte izquierda de la gráfica aparecen todas las variables dependientes seleccionar con el botón izquierdo del mouse una variable,

		<p>aparecerá una ventana con el nombre Scaling Settings –F1-, seleccionar las configuraciones necesarias Number of Space, Manually Scale, seleccionar OK una vez hecho todo los cambios.</p>
	<p style="text-align: center;">1.3 Introducir valore off- line</p>	<p>1. En la ventana principal, en la parte superior seleccionar la opción DATA EDITOR, seleccionar OFF-LINE aparecerá una ventana llamada Edit off-line vriables f1.</p> <p>2. En la parte derecha de la grafica seleccionar NEW, muestra otra ventana con el nombre New Variable –f1- .</p> <p>3. La opción Name escribir nombre de la variable, espacio de 4 dígitos.</p> <p>4. En Scale Unit introducir las unidades de la variable ej. g/mL.</p> <p>5. Comment escribir un comentario que sea considerado importante.</p> <p>6. Observar que la opción Button in Variable Windows este seleccionada, esta permitirá que se muestre la grafica.</p> <p>7. Las demás opciones no se cambian.</p> <p>8. Seleccionar Oky para guardar los cambios.</p> <p>Entre las opciones de la ventana Edit off-line vriables f1.</p> <p>-Done guarda los cambios cada vez que se realizan.</p> <p>-Delete, primero seleccionar la variable a eliminar y elegir esta opción para borrar la variable creada.</p> <p>-Copy seleccionar esta opción para copiar los datos de la tabla y pasarlos a otro formato ej. Excel.</p> <p>- Timing esta opción permite definir el tiempo de la hora muestreada.</p> <p>1. Al seleccionar la opción Timing aparece una ventana</p>

		<p>con el nombre off-line time set produce -f1-</p> <p>2. En la opción Default Interval (min), fijar el tiempo de los monitoreos ej. 3h=180 min.</p> <p>3. En caso de que los tiempos sean indefinidos usar la opción Time introducir la hora y los minutos del muestreo, h: min ej. 03:40.</p> <p>4. Seleccionar Insert para que la hora fijada sea guardada y aparezca en el cuadro Time Points.</p> <p>5. En caso de eliminar una hora fijada seleccionar con el mouse y dar clic en la opción Delete.</p> <p>6. Guardar los cambios en la opción Done.</p> <p>7. La opción Keep rest siempre debe estar activada.</p>		
	<p>2.0 Opciones del menú</p>	<p>Todas las opciones aparecen en la parte superior de la ventana.</p> <table border="1" data-bbox="574 934 1409 1837"> <tr> <td data-bbox="574 934 812 1837" style="text-align: center;"> <p>2.1 File option</p> </td> <td data-bbox="812 934 1409 1837"> <ul style="list-style-type: none"> - New: permite abrir un nuevo cultivo o cuadro de diálogo de cálculo para elegir el nombre de usuario y número de fermentador. - Open: seleccionar para abrir los archivos guardados existentes. - Save al seleccionar esta opción parece una ventana con sus opciones seleccionar el dispositivo y la carpeta donde se desee guardar, seleccionar Oky. - Save as tiene la misma función del Save. - Export chart esta opción permite enviar la grafica del programa a otro formato. Al seleccionar esta opción aparece una ventana, introducir un nombre para la imagen de la Gráfico. A continuación seleccionar el dispositivo </td> </tr> </table>	<p>2.1 File option</p>	<ul style="list-style-type: none"> - New: permite abrir un nuevo cultivo o cuadro de diálogo de cálculo para elegir el nombre de usuario y número de fermentador. - Open: seleccionar para abrir los archivos guardados existentes. - Save al seleccionar esta opción parece una ventana con sus opciones seleccionar el dispositivo y la carpeta donde se desee guardar, seleccionar Oky. - Save as tiene la misma función del Save. - Export chart esta opción permite enviar la grafica del programa a otro formato. Al seleccionar esta opción aparece una ventana, introducir un nombre para la imagen de la Gráfico. A continuación seleccionar el dispositivo
<p>2.1 File option</p>	<ul style="list-style-type: none"> - New: permite abrir un nuevo cultivo o cuadro de diálogo de cálculo para elegir el nombre de usuario y número de fermentador. - Open: seleccionar para abrir los archivos guardados existentes. - Save al seleccionar esta opción parece una ventana con sus opciones seleccionar el dispositivo y la carpeta donde se desee guardar, seleccionar Oky. - Save as tiene la misma función del Save. - Export chart esta opción permite enviar la grafica del programa a otro formato. Al seleccionar esta opción aparece una ventana, introducir un nombre para la imagen de la Gráfico. A continuación seleccionar el dispositivo 			

			<p>en donde desea guardar, la imagen se guarda como mapa de bits (extensión del archivo es BMP) o como Windows Metafile (WMF es la extensión de archivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Export data prácticamente tiene la misma función como del Export chart, la única diferencia son enviados los datos a formato de Excel. - Import. Se abre un cuadro de diálogo de selección de archivos donde se puede introducir el nombre de archivo ASCII para importar datos en la escala de tiempo en línea. A continuación, el cuadro de diálogo Abrir archivo ASCII se abre donde usted puede elegir las relaciones entre las variables en el archivo y las variables en el protocolo de cultivo actual y primera línea de datos. Todos los valores actuales en línea son eliminados. - Print Imprime el protocolo de cultivo, datos, protocolo de instalación y el gráfico en la ventana de la imagen. - Exit seleccionar esta opción para salir del software
		<p style="text-align: center;">2.2 Data Editor Option</p>	<ul style="list-style-type: none"> - New Date. Elimina todos los datos de las variables medidas (en líneas y fuera de las líneas) - On-line. Se abre una ventana donde se pueden modificar las variables en línea de diálogo para agregar, eliminar y establecer las variables en línea. Son realizados los mismos para introducir valore off- line. - Off-line. Leer apartado introducir

		<p>valores off-line</p> <ul style="list-style-type: none"> - Show mode. Abre un cuadro de diálogo de la representación de las curvas (medidos en línea y fuera de línea únicas variables) - Description. Abre un cuadro de diálogo donde muestra la descripción de cultivo para el organismo, el nombre de cultivo y los comentarios, permite ver el momento de inicio y final del cultivo. - Import. Abre un diálogo de importación de datos para obtener los datos de una variable de la ejecución todos los BioXperts. Como solo es un fermentador esta opción no es usada.
	<p>2.3 Chart option</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Reset. Deseleccionar todas las variables de la ventana de chat. Es una forma rápida de eliminar todas las variables. - Redraw. Actualiza la ventana de la tabla. - Copy. Copia la imagen de la ventana de gráfico a la portapapeles. Se trata de una forma rápida de usar esta imagen en otro programa. - Pictures Se abre un cuadro de diálogo. Tabla de imágenes para agregar tabla actual de configuración de la ventana, al eliminar y ver imágenes existentes <p>Las opciones X-axis, Y-axis y scaling ya fueron descritas en apartado introducir valor off-line.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Option Se abre un cuadro de diálogo

			<p>Opciones de gráfico para elegir la red, marcas, líneas de cero y en el eje puesta en la ventana de gráfico.</p> <p>- Font. Se abre un cuadro de diálogo Seleccionar fuente (tipo de letra y tamaño) para cambiar la fuente en la ventana de la tabla. Utilice esta opción antes de la ventana de impresión Gráfico.</p>
		2.3 Run option	<p>- New. Esta opción es para comenzar una nueva corrida.</p> <p>- Test. Abre un diálogo de prueba donde se muestran los valores medidos en línea por cada dos segundos</p>
		2.4 Install options	<p>- Device. Se abre un cuadro de diálogo Dispositivos, donde se puede elegir un dispositivo de protocolo y un puerto serie con opciones de comunicación.</p> <p>- Variables. Se abre un cuadro de diálogo Configuración de las variables donde se puede conectar las variables en línea con las correspondientes canales de entrada y de salida.</p> <p>- Graphic. Se abre un cuadro de diálogo de configuración gráfica que puede seleccionar imagen, variables, etc.</p>
		2.5 Window option	<p>- Show chart. Trae la ventana principal de la tabla al frente en el escritorio de BioXpert.</p> <p>- Show variables. Muestra y esconde la ventana de Variables.</p> <p>- Show ch. Val. Muestra u oculta la</p>

			<p>ventana de los valores.</p> <p>- Show graphic muestra y oculta la grafica en la ventana.</p>
		Nota:	<p>La opción help aparece en cada venta de dialogo y describe la función de cada opción que tenga esta.</p>
		3.0 Recalculation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Encender la computadora 2. Ir a Menú, seleccionar el programa Bioxpert lite. 3. Seleccionar el nombre de Usuario, elegir Recalculation seleccionar OKY. 4. Aparecerá ventana principal mismas características que la opción cultivation con su barra de menú.

X. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

El uso de equipos sofisticados en el control de procesos biológicos, ayudan ciertamente a cumplir las necesidades requeridas por los microorganismos estrictamente en lo ambiental como el pH, temperatura, su agitación y entre otras. Tal y como se vio reflejado en la cepa autóctona Agave_1 aislada de *Agave americana* L. que al mantenerla en condiciones aerobias a partir aireación o agitación mecánica se alcanza mayor concentración celular en tiempos más cortos durante la estandarización. Durante la fermentación alcohólica por parte de la A_1, bajo condiciones de pH, T y la velocidad de agitación controlados por el fermentador Applikon se obtienen concentraciones altas de etanol, algo muy importante para bajar los costos, ya que el aumento en la concentración, se requiere menos vapor en la destilación. La elaboración de los manuales permitirá desde cierto punto de vista la reproducibilidad del trabajo, donde se establecieron las actividades que se deben realizar durante la estandarización y fermentación de la cepa aislada. Parecen prometedores los resultados obtenidos de la fermentación alcohólica por las cepas aisladas en base a las concentraciones alcanzadas del etanol resultando optativo para sustituir las levaduras existentes en los grandes industrias.

Recomiendo la realización de un proceso fermentativo con la cepa A_1, donde se controle solo la temperatura, sin embargo se monitoree el pH, °Brix, Biomasa, azúcares reductores y totales, así como etanol, con la finalidad de conocer todas los cambios fisiológicos de la levadura durante la evolución de la fermentación. Que estos datos permitan en su posterioridad realizar fermentaciones en lotes alimentados. La Identificación de las cepas por biología molecular permitiría conocer en su totalidad las levaduras aisladas. Análisis de los destilados por cromatografía de gases, para su caracterización.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES.

A. Mas et al (2002).” Selección de Levaduras”. Tecnología del Vino. Unidad de Enología del Centro de Referencia en Tecnología de los Alimentos. Facultad de Enología de Tarragona. Universidad Rovira i Virgili.

Arratia M. (2009) Diversidad Genética de Levaduras Involucradas en la Fermentación del Mezcal Tamaulipeco. Tesis. Instituto Politécnico Nacional Centro de Biotecnología Genómica-

Arrazola, M. (1969). Estudio del contenido de azúcares en la piña del agave tequilana. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad autónoma de Puebla, México.

Atkinson B., Mavituna F. “Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook”, Editorial The Nature Press, New York, N.Y. 1985

Badui D. S. (2006) “Química de los Alimentos” México. Pearson Addison Wesley

Basanta, A. (2009) Evaluación De La Enterocina L50 (L50a Y L50b) De “Enterococcus Faecium” L50 Como Bioconservante De La Cerveza: Producción Y Secreción Heteróloga De Las Enterocinas L50 Y L50b En “Saccharomyces cerevisiae” Y “Pichia pastoris”. Facultad de Veterinaria. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid.

Bautista, J. (2001). El agave tequilana weber y la producción de tequila. Acta Universitaria, Vol 1. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.

Cervantes, M., Pedroza A. M. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. Departamento de Matemáticas, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-Instituto Politécnico Nacional. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana.

García, A. J. (2007). Los Agaves de México. Ciencias. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México.

James, C. (1991). Manual del azúcar de caña. Primera Edición p. 4. México.

J.Bu'lock, B.Kristiansen. (1991), "Biotecnología básica" México, Acribia, S.A.

Jiménez, J. A. (2009). Identificación y Cuantificación de Algunos Alcoholes en la Destilación y Rectificación del Mezcal Obtenido de Agave Potatorum zucc. Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Leveau J., Bouix, M. (2000). Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial (2000) E. Acribia (ed). Zaragoza, España. Pp. 595.

Martín-Lagos, F. (1999). Levaduras Autóctonas Aisladas en Vinos de la Comarca de Laujar de Andarax (Almería), Su Influencia en la Calidad. Departamento de Nutrición y Bromatología Facultad de Farmacia Universidad de Granada.

Owen P. Ward,(1989) "Biotecnología de la fermentación", México, Acríbia, S.A.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D. (1992). "Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains" Appl. Environ. Microbiology.

Ramírez, A. (2009). Evaluación del Efecto Prebiótico del Aguamiel de Maguey (Agave salmiana) en Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

Santiago J.A. (2010). Optimización de un medio de cultivo a base de pulpa de mango Para la producción de etanol empleando levaduras aisladas de una bebida fermentada. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutierrez.

Villalobos, J. (2005). Tequila, 4ª parte, Elaboración. "Xipe totok" Revista trimestral del Departamento de Filosofía y Humanidades, Iteso. Guadalajara, Vol. XIV No. 4. No. de publicación 56.

Zudaire M. (2009). Sirope de agave como alternative al azúcar. Eroski consumer.

XII. ANEXOS

A. Medios de cultivo YM (Extracto de levadura- Extracto de malta)

FUNDAMENTO:

En medio ácido, el extracto de malta que es rico en glúcidos, es capaz de aportar todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de mohos y levaduras. Por el carácter ácido del medio, se inhibe el crecimiento de la mayor parte de los gérmenes contaminantes (Martínez-Cruz, 1982).

COMPOSICIÓN:

Extracto de levadura 3 g/L

Extracto de malta 3 g/L

Dextrosa 10 g/L

Peptona de caseína 5 g/L

Agar bacteriológico 15 g/L* (en medio sólido)

pH 4.5 – 5

PREPARACIÓN

Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, y añadir el antibiótico posteriormente. Incubar entre 20° y 30°C de 3 a 5 días.

Preparación de la oxitetraciclina

FUNDAMENTO:

La oxitetraciclina es un antibiótico de amplio espectro y muy eficaz. Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Opera a nivel de los ribosomas de la bacteria, impidiendo la fijación del ARN mensajero y el ARN de transferencia en los receptores respectivos. Inhibe a bacterias Gram (+) y (-), en dosis normales actúa como bacteriostático y en altas dosis como bactericida.

PREPARACIÓN:

Se elabora una solución a 50 mg/ml, utilizando diez pastillas de 125 mg de oxitetraciclina pulverizadas y disueltas en 25 ml de agua destilada. Ésta solución es centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, posteriormente es filtrada con una membrana de poro de 0.45µm y una jeringa estéril, y es colocada en tubos eppendorft.

Medios de cultivo WL (Wallerstein)

FUNDAMENTO:

Se utiliza para el cultivo de levaduras. Adicionado de 0,1 g de cloranfenicol /L, que se incuba a 25-30°C en anaerobiosis 3 días con el fin de inhibir el crecimiento de mohos y levaduras, sin embargo adicionado con tetraciclinas se inhiben bacterias (Andrews, 1992).

COMPOSICIÓN:

Glucosa 50 g/L

Fosfato monopotásico 0,55 g/L

Hidrolizado de caseína 5 g/L

Cloruro de calcio dihidrato 0,125 g/L

Extracto de levadura 4 g/L

Sulfato de magnesio heptahidrato 0,125 g/L

Cloruro de potasio 0,425 g/L

Cloruro férrico hexahidrato 2,5 mg/L

Sulfato de manganeso tetrahidrato 2,5 mg/L

Verde de bromocresol 22 mg/L

Agar bacteriológico 20 g/L* (en medio sólido)

pH 5

PREPARACIÓN

Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

Tabla 12. Características obtenidas luego de 5 días de incubación en medio WL, para diferentes especies de levaduras enológicas (Cavazza et al, 1992).

Especie	COLOR	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	MORFOLOGÍA CELULAR	LISINA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Crema-verde claro	Umbricada	Lisa opaca	Cremosa		-
<i>Torulaspota delbruekii</i>	Crema-verde claro	Imbricada	Lisa opaca	Cremosa		+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Verde intenso	Plana	Lisa opaca	Mantecosa		+
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Verde	Umbricada convexa	Lisa opaca	Cremosa	Células grandes apiculadas	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Verde intenso	Umbricada puntiforme	Lisa mucosa	Mantecosa	Células alargadas	+
<i>Rhodotorula sp.</i>	Rosa	Convexa umbricada	Lisa rugosa	Mantecosa		+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Crema-rosa inferior Crema-rosa difunde	Convexa	Lisa rugosa	Harinosa		+
<i>Pichia membranifaciens</i>	Crema - azulado	Convexa	rugosa	Harinosa		+
<i>Hansenula anomala</i>	Azulado-crema	Plana	Lisa cremosa	Cremosa		+
<i>Brettanomyces intermedius</i>	Crema	Cúpula pequeña	Lisa	Cremosa	Cél. Pequeñas ojivales	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Crema	cúpula	Lisa	Cremosa		+

El medio WLN es uno de los más utilizados para detectar estas levaduras debido a que permite su desarrollo, aunque debe suplementarse con un bactericida (por ej.: tetraciclina o cloranfenicol) que inhiba totalmente el crecimiento bacteriano. Por otra parte, para la diferenciación entre *Saccharomyces spp.* de las especies no *Saccharomyces spp.* puede emplearse un medio de cultivo específico que posee lisina como única fuente de nitrógeno, tal y como se observa en la tabla ya que no permite el desarrollo de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* (Basanta, 2009).

B. Tablas de alimentación

Tabla 13. Estandarización de inóculo (levantamiento de inóculo) con la cepa Agave americana L. bajo el esquema de la empresa Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C.V.

# Ali.	t trans(h)	punto C	°brix antes	°brix des	vol.agave 12	vol.pan 12	vol.miel 14	sulfato de A	vol.acum
0	0				18,75	0	0		18,75
1	0,1666				3,75				22,5
2	0,333				3,75				26,25
3	0,5				3,75				30
4	0,6666				3,75				33,75
5	0,9166				7,5				41,25
6	1,1666				7,5				48,75
7	1,4166				7,5				56,25
8	1,6666				7,5				63,75
9	5,5333		8		80			0,138	143,75
10	16,3333	8,5	8	9	15	5			163,75
11	18,4333	8,5	8,5	9	20	10			193,75
12	19,4999	8,5	9	10	50	20		0,276	263,75
13	22,7499		9		30	20		0,276	313,75
14	25,16656		9		70	20		0,414	403,75
15	26,1665				175	100	50		728,75
16	36,4165		10	10	150	100		0,552	978,75
17	39,1665		9	10		103	67,5	3	1149,25
18	41,1665								

Tabla 14. Estandarización de la cepa *Agave americana* L, en sistema de "aireación" y agitación mecánica.

$t_{\text{alimentación}}$ (h)	No. _{alimentación}	Miel _{agave 12°Bx}	Miel _{panela 12°Bx}	Miel _{agave 14°Bx}	(NH) ₄ SO ₂	v_{total} (ml)
0	1	48	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
5,5	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10,5	2	265	75	-	1,104	458
12	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
21,15	3	325	303	117,5	3,5252	1203
26	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-



Figura 6. Matraz con Sistema de aireación velocidad de fluio 1vvm.

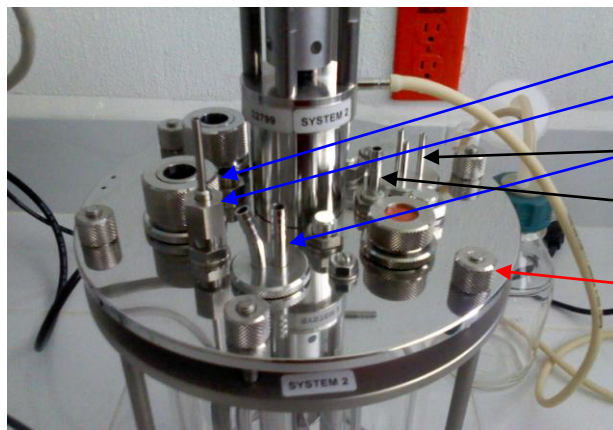


Figura 7. Matraz con Sistema de aireación a 100 rpm.

C. Imágenes del fermentador Applikon.



figura 8. Fermentador Aplikkon



Entrada de sensores pH o OD₂

Sensor de nivel

Intercambiador de calor

Conector de tubos, entrada de ácido,
base o antiespumante

Conector de tubo, airear.

Tornillos de seguridad

Figura 9. Accesorios del fermentador