

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

YOHANI ALVARADO VELÁZQUEZ

CON EL TEMA:

**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FERMENTATIVO DE
Saccharomyces cerevisiae ETANOL RED UTILIZANDO
NUTRIENTES MARCA DIGRA EN LA PLANTA DESTILADORA LA
FE S.A DE C.V.”**

MEDIANTE:

**OPCION X
(MEMORIAS DE RESIDENCIA)**

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

JUNIO 2015

DEDICATORIA

A mis padres por apoyarme e impulsarme siempre, y por todo el amor que me han brindado durante toda mi vida. Gracias a su apoyo y enseñanza brindada a lo largo de mi vida me he convertido en la persona que ahora soy. Doy gracias a dios por tener a unos padres excepcionales y por los logros que he tenido y que seguiré teniendo en el transcurso de mi vida.

A mis hermanos y amigos que han estado para apoyarme en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, por apoyarme siempre. Por estar conmigo durante todo este largo camino. Por ser los mejores padres.
- A mis hermanos por apoyarme en todo momento.
- A los amigos, que siempre me apoyaron, impulsaron y han formado parte de mi vida durante tanto tiempo.
- Al instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por permitir mi formación académica.
- A mis asesores de memoria de residencia profesional; Dr. Miguel Abud Archila, M.C. Lucia M. Cristina Aguilar Canseco, Q.B.P. Aura Flores Pérez. Por sus asesorías, observaciones y sugerencias aportadas durante el desarrollo de esta memoria de residencia profesional.
- A la destilería la FE S.A. DE C.V. perteneciente a la cía. azucarera ZUCARMEX, por permitirme realizar mi residencia profesional en sus instalaciones.
- A mi asesor externo el Ing. Abel Cruz Hidalgo por permitirme realizar mi residencia profesional bajo su asesoría.

ÍNDICE

Pág.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. HIPÓTESIS	3
4. OBJETIVOS.....	3
4.1 OBJETIVO GENERAL	3
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
5. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO	4
5.1. HISTORIA DEL INGENIO AZUCARERO UBICADO EN PUJILTIC, CHIAPAS	4
5.2 ÁREA DE INFLUENCIA	5
5.3 DATOS DE LA EMPRESA	6
5.4 MISIÓN	6
5.5 VISIÓN	6
5.6 VALORES	6
5.7 COMPROMISOS CON:	7
5.8 LOCALIZACIÓN.....	8
6. PROBLEMAS A RESOLVER.....	9
7. ALCANCES Y LIMITACIONES	9
8. FUNDAMENTO TEÓRICO	10
8.1 LEVADURAS.....	10
8.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
8.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	12
8.3.1 Forma y tamaño	12
8.3.2 Estructura celular	13
8.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA EL CRECIMIENTO DE <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	13
8.4.1 Composición química.....	13
8.4.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
8.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	19
8.5.1 Ruta metabólica de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> durante el proceso de fermentación	20
8.5.2 Requerimientos nutricionales y condiciones de la fermentación	22
8.5.3 Factores a controlar durante la fermentación	25
8.5.4 Evaluación de la producción de etanol en procesos fermentativos.....	27

8.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	30
8.6.1 ANOVA	30
9. METODOLOGÍA.....	31
9.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
9.2 DESCRIPCIÓN DEL MOSTO.....	31
9.3 NUTRIENTES A EVALUAR	33
9.4 CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN	34
9.5 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	34
9.5.1 Determinación de la riqueza alcohólica	34
9.5.2 Eficiencia de fermentación	37
9.5.3 Conteo de células	38
9.5.4 Determinación del % de sedimentación celular	38
9.5.5 Determinación de pH.....	39
9.5.6 Determinación de °Brix en muestra.....	39
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
10.1 CONCENTRACIÓN CELULAR	41
10.2 VIABILIDAD CELULAR	44
10.4 EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN	48
10.3 RIQUEZA ALCOHÓLICA	52
11. CONCLUSIONES	57
12. RECOMENDACIONES	58
13. BIBLIOGRAFÍA.....	59

ÍNDICE DE TABLAS.

Pág.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	111
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS.	12
TABLA 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS LEVADURAS.	13
TABLA 4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
TABLA 5. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA TOTAL DE CÉLULAS.....	33
TABLA 6. PRUEBA DE MEDIAS PARA TOTAL DE CÉLULAS.....	40
TABLA 7. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA TOTAL DE CÉLULAS POR NUTRIENTE.	41
TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VIABILIDAD	41
TABLA 9. PRUEBA DE MEDIAS PARA VIABILIDAD.	43
TABLA 10. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA VIABILIDAD POR CONCENTRACIÓN.....	44
TABLA 11. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA RIQUEZA ALCOHÓLICA.....	45
TABLA 12. PRUEBA DE MEDIAS PARA RIQUEZA ALCOHÓLICA.	47
TABLA 13. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA RIQUEZA ALCOHÓLICA.	49
TABLA 14. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN	49
TABLA 15. PRUEBA DE MEDIAS PARA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN.	50
TABLA 16. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN POR CONCENTRACIÓN.	52
TABLA 17. PRUEBA DE MEDIAS PARA RIQUEZA ALCOHÓLICA.....	53
TABLA 18. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA RIQUEZA ALCOHÓLICA.	54

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Fig.1. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG.....	12
Fig. 2. Curva de crecimiento microbiano.....	21
Fig. 3. Diagrama de Fisher para total de células.....	22
Fig. 4. Viabilidad.....	23
Fig. 5. Riqueza alcohólica obtenida por cada una de las concentraciones de nutrientes utilizados.....	36
Fig. 6. Riqueza alcohólica obtenida por cada uno de los nutrientes utilizados.....	36
Fig. 7. Eficiencia de fermentación.....	42
Fig. 8. Eficiencia de fermentación.....	47
Fig. 9. vía metabólica Embden-Meyerhof	50
Fig. 10. Conversión del Piruvato a Etanol.....	54
Fig. 11. Esquema comparativo de la vía de Embden Meyerhoff y la vía Etner Doudoroff como estrategias microbianas de fermentación alcohólica.	52

1. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales. Las condiciones de temperatura, humedad, nutrientes, salinidad, etc. Muchos de estos microorganismos son utilizados en la industria con el fin de obtener productos a partir del proceso metabólico de ellos tal es el caso de la producción de etanol.

Actualmente la producción de etanol se lleva a cabo a partir de diferentes Materias primas, empleando diferentes microorganismos y bajo diferentes tecnologías. El microorganismo más utilizado para la producción de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, este es un hongo unicelular que se emplea, debido a su capacidad fermentativa, su fuente de carbono principal que son los azúcares (carbohidratos) tales como glucosa, fructosa y sacarosa.

Para llevar a cabo el proceso de fermentación las levaduras necesitan nutrientes en el sustrato para tener una mayor capacidad fermentativa, algunos nutrientes empleados son sulfato y fosfatos de amonio. La producción de etanol a nivel industrial está fundamentada en la utilización de materias primas provenientes del proceso de producción de azúcar (melaza). Sin embargo, la rentabilidad de la producción de etanol depende de la disponibilidad y costos de las materias primas utilizadas, de la eficiencia de fermentación, del tipo de microorganismo empleado y de la etapa de separación de productos y subproductos.

Por esta razón y debido a la alta demanda de etanol, es necesario aumentar los rendimientos de la producción de etanol, adicionando otros nutrientes al sustrato, que contienen una mayor cantidad de vitaminas, proteínas, aminoácidos y minerales. Nutrientes que garanticen mejoras en la producción, tales como; el aumento de la producción de etanol, mayor riqueza alcohólica, el grado alcohólico, menor impureza y un índice menor de contaminantes microbianos.

Por lo anterior se realizó la implementación de un diseño experimental mediante el cual se identifique el nutriente y la concentración adecuada para

el proceso de fermentación. La adición de nuevos nutrientes a diferentes concentraciones fueron evaluados a nivel laboratorio.

2. JUSTIFICACIÓN

En la producción de alcohol frecuentemente se utiliza melaza de caña, como sustrato para *Saccharomyces cerevisiae*, la cual cumple con las necesidades nutricionales que la levadura necesita para poder crecer, multiplicarse y con ello lograr una buena producción de etanol.

Teniendo en cuenta que el nitrógeno constituye alrededor del 10 % del peso seco de *Saccharomyces cerevisiae*, mismo nitrógeno que es asimilado en forma de iones amonio. Los cuales ayudan a la generación de biomasa y por lo consecuente a un aumento en volúmenes de producción de etanol.

En la actualidad con la finalidad de mejorar la producción de etanol en la planta destiladora la FE SA DE CV. Pretenden implementar “nuevos nutrientes” al mosto de melaza, es decir sustituir los que actualmente los cuales son sulfato y fosfato de amonio por otros de la marca DIGRA SA DE CV. Dichos nutrientes contienen una cantidad mayor de vitaminas, proteínas, aminoácidos y minerales. Se espera que favorecerá en la producción de etanol, aumentando los volúmenes de producción, así también como la calidad del producto terminado.

3. HIPÓTESIS

Los nutrientes de la marca DIGRA S.A DE C.V. permitirán obtener mejores rendimientos en la producción de etanol en la planta destiladora, la FE, CIA. AZUCARERA LA FE S.A. DE C.V. (INGENIO PUJILTIC), en comparación con los nutrientes empleados actualmente para la producción de etanol.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de 7 diferentes nutrientes de la marca DIGRA S.A DE C.V. Sobre la fermentación etanólica de *Saccharomyces cerevisiae* etanol red, empleada en la planta destiladora la FE, perteneciente a CIA. AZUCARERA LA FE S.A. DE C.V. (INGENIO PUJILTIC).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de 8 diferentes nutrientes sobre el rendimiento de etanol (riqueza alcohólica).
- Evaluar el efecto de 8 diferentes nutrientes sobre la concentración celular producida.
- Evaluar el efecto de 8 diferentes nutrientes sobre la eficiencia de la fermentación.

5. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

5.1. HISTORIA DEL INGENIO AZUCARERO UBICADO EN PUJILTIC, CHIAPAS

En el año de 1938, el señor Hernán Pedrero Arguello adquiere las tierras de Pujiltic, se llamaba finca Pujiltic (tierra de vientos), ocupó las tierras para el cultivo de maíz, frijol y la ganadería, el cual posteriormente se dedicó al a siembra de caña de azúcar, transformándolo en panela y distribuyéndose en todo el estado.

Tiempo después forma el trapiche para la molienda manejadas por caballos y bueyes, fue hasta el año de 1950, cuando el señor Hernán Pedrero Arguello deja de producir la panela, para dedicarse a la producción de aguardiente, más adelante, se hicieron los trabajos para preparar las tierras donde se expandió el cultivo de la caña de azúcar.

En 1958 la familia Pedrero empezó la construcción del ingenio, ya que la zona cañera se había expandido lo suficiente. Sabían a futuro que varios dueños de trapiches le suministrarían la materia prima.

Fue así como se constituyó “la primera sociedad de plantaciones agrícolas intensivas”, primera razón social del ingenio Pujiltic.

Para su construcción se compró en Nueva York un molino para sorgo al que se le hicieron adaptaciones necesarias para la molienda de caña y fabricación de azúcar.

Durante muchos años el ingenio trabajó con capital propio y era autosuficiente económicamente, sin embargo, más adelante requirió de los créditos de FINASA.

En 1968 el señor Moctezuma Pedrero compró a su hermano su parte en la sociedad y la mayoría de las acciones de las tierras y junto con sus hijos Hugo e Iván Pedrero Gutiérrez se encargaron de la administración del ingenio Pujiltic. Durante esta gestión hicieron frecuentes inversiones para mejoramiento de las instalaciones y la ampliación de las zonas de

abastecimiento; en 1973 la superficie cultivada aumenta a 3,990 hectáreas y se obtuvo una producción de 27,127 toneladas de azúcar.

Para la zafra de 1974-1975 los propietarios consiguieron un fuerte crédito por mediación del Banco Mundial para llevar a cabo una nueva ampliación de la fábrica, esta deuda posteriormente la absorbió FINASA al pasar la empresa al sector público (zafra 1976-1977) a partir de entonces fue incrementado la producción en el ingenio Pujiltic, hasta que se obtuvo en 1983-1984 el primer lugar nacional en productividad. A partir de 1996 el ingenio es propiedad de la CIA AZUCARERA "LA FE" S.A DE C.V. del grupo ZUCARMEX que abarca "la primavera" (Sinaloa), "Melchor Ocampo" (Jalisco), y "Pujiltic" (Chiapas). Este último se encuentra ubicado en san francisco Pujiltic, municipio de Venustiano Carranza, Chiapas.

5.2 ÁREA DE INFLUENCIA

Las tierras en las que se sentó el ingenio y la finca de la familia Pedrero pertenecían al ejido de Soyatitán, en el municipio de Venustiano Carranza.

Las comunidades cañeras de los ejido vecinos son los municipios de Soyatitán, Socoltenango, Venustiano Carranza, Las Rosas y Tzimol, cuentan con una superficie de 39, 900,000 m², poco a poco se convirtieron en proveedores del ingenio y a la vez en la principal área de influencia de este empresa.

Su establecimiento trajo como consecuencia el mejoramiento de la calidad de vida de los productores, al comercializar el producto directamente el ingenio. Actualmente es administrativo para el consorcio azucarero, ZUCARMEX. Que tiene una capacidad de producción de 28,000 toneladas de caña/día; ocupando el segundo lugar a nivel nacional en producción debido a sus tierras que son de muy buena calidad y una producción de azúcar de 1000 toneladas las 24 horas, con esto se beneficia un total de 58 comunidades cañeras de entre las cuales los productores que las integran 2,997 son ejidatarios y 901 son pequeños propietarios.

5.3 DATOS DE LA EMPRESA

ZUCARMEX, CIA. AZUCARERA “LA FE” S.A. DE C.V. INGENIO PIJULTIC, MPIO. DE VENUSTIANO CARRANZA.

5.4 MISIÓN

La misión del grupo ZUCARMEX es ser cada día más productivos y aprovechar las oportunidades de negocios que se presenten en el entorno nacional e internacional, para lograr una mejor calidad de vida para todos los que somos ZUCARMEX, y crear los espacios para el desarrollo de los jóvenes que enfrentan los retos del milenio.

5.5 VISIÓN

- Ser una empresa que invierta y participe en el proceso de desarrollo económico de nuestro país y nuestra región reclaman, además de ofrecer oportunidad y fuentes de trabajo estables a los jóvenes que constituyen la mayoría de nuestra población.
- Ser líderes a nivel nacional eficiencia, volumen de producción, calidad y servicio.
- Ser líderes a nivel nacional en innovación y tecnología, respetando y protegiendo celosamente el medio ambiente.
- Ser una empresa generadora de riqueza que se distribuya de la manera equitativa, a nuestros trabajadores, productores de caña y accionistas.
- Ser una empresa dirigida con una perspectiva internacional, pero planificada con una visión nacionalista.

5.6 VALORES

Integridad

Actuar con honestidad, responsabilidad y respeto

Colaboración

El trabajo productivo colectivo basado en trabajo de equipo y obtener los mejores resultados

Liderazgo

Visualizar el futuro y orientar el esfuerzo hacia la excelencia en el servicio y la competitividad.

Ética

Nuestro comportamiento estará siempre basado en nuestros principios y valores.

Nuestro código de ética:

Nuestra cultura ZUCARMEX cimentada en nuestros valores cumpliendo nuestra misión, promueve el crecimiento de nuestra empresa y el desarrollo de nuestros clientes, inversionistas, trabajadores, proveedores, productores de caña y la comunidad en general

5.7 COMPROMISOS CON:**Colaboradores**

Garantizar el respeto a su dignidad, a su individualidad y facilitar un ambiente para su bienestar y desarrollo.

Accionistas

Proporcionar una rentabilidad razonable de manera sostenida.

Proveedores

Mantener relaciones cordiales y proporcionar su desarrollo.

Clientes

Brindar un servicio ejemplar y apoyarlos en su crecimiento y desarrollo.

Competidores

Competir en el mercado de manera vigorosa y objetiva, basándose en prácticas de comercio leales.

Sociedad

Promover el fortalecimiento de los valores éticos universales. Apoyar el crecimiento económico y social de las comunidades en donde nos encontramos

Giro empresarial

Industrial (producción de azúcar y la fabricación de alcohol de 96 grados)

Tipo de capital

Privado

5.8 LOCALIZACIÓN

Dirección

Esta unidad industrial se encuentra en el kilómetro 46 de la carretera a Venustiano Carranza, Chiapas, la cual parte del kilómetro 1,204 de la carretera panamericana Cristóbal Colón, donde la superficie de la fábrica es de 98,908 m² y la sección contruida de 14,158 m², contando con un área de abastecimiento de caña de casi 15,000 hectáreas para industrialización y más de 1,00 hectáreas de semilla proyectada para el ciclo 2000-2002.

Con dirección a la compañía AZUCARERA "LA FE" S.A DE C.V. en san francisco Pujilic. Encontrándose a 670 m.s.n.m. y teniendo las siguientes colindancias.

Ubicación

- Al norte con el ejido de Soyatitán
- Al sur con la finca El Zapote
- Al oriente con la colonia Hernández, Hernández
- Al poniente con la finca El Cascajal.

6. PROBLEMAS A RESOLVER

- Mediante la realización de este proyecto se pretende mejorar el rendimiento en la producción de alcohol mediante la utilización de nutrientes mejorados.
- Determinar la dosis del nutriente adecuado para tener una mejor eficiencia de fermentación.

7. ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances

Se logró determinar la mejor concentración y el mejor nutriente.

Se pudo establecer el comportamiento de la levadura con cada uno de los nutrientes.

Limitaciones

Debido a que son fórmulas nuevas y debido a que la zafra está en proceso no se puede adquirir el producto para volúmenes mayores o para realizar pruebas en planta. Es decir no se logró realizar el análisis costo beneficio.

8. FUNDAMENTO TEÓRICO

8.1 LEVADURAS.

Se les denomina levaduras a un grupo de hongos unicelulares cuya actividad ha sido siempre de gran importancia, estos organismos son abundantes especialmente en donde existe la presencia de azúcares (Burdon y Willians, 1971). Las levaduras son de forma esférica, ovalada o cilíndrica y en general la división celular se lo lleva a cabo por gemación (Brock y Madigan, 1982).

Las levaduras no forman filamentos ni micelio y las células de levadura permanecen como una colección de células solas (Brock y Madigan, 1982), por lo que se destacan como células individuales (Burdon y Willians, 1971). Algunas levaduras se reproducen sexualmente a lo que se conoce como apareamiento, en la cual dos células se fusionan (Brock y Madigan, 1982).

8.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, durante fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Carballo, 2000). La clasificación taxonómica se presenta a continuación.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reino	Hongo
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetidae</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Sacchaomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetidae</i>
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>Cerevisiae</i>

Fuente: (Carballo, 2000).

Las levaduras, son organismos eucarióticos unicelulares, por lo tanto sus estructuras se encuentran formadas por pared celular, núcleo diferenciado y organelos como ribosomas y mitocondrias; la formación de una cápsula de polisacáridos, la ausencia o presencia de vacuolas y el desarrollo de las mitocondrias dependen de las condiciones fisicoquímicas y de la edad del cultivo (Tuite y Oliver 1991).

El nombre de *Saccharomyces* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas, como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar la masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Ariza y González, 1997).

Saccharomyces cerevisiae y otras especies de levaduras en general, realizan fermentación alcohólica, en la cual el etanol es formado a partir de la D-glucosa; éste azúcar es convertido en piruvato por la vía de Embden-Meyerhof Parnas en la cual el piruvato es descarboxilado a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y la tiamina pirofosfato y el acetaldehído reducido finalmente a etanol (Halasz y Laszlity, 1991). En la tabla 2 se muestran algunas características de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 2. Características generales de las levaduras.

CARACTERÍSTICAS	LEVADURA
Dimensiones	(micras) 4 - 8
Tiempo de duplicación (horas)	1 - 3
pH (rango óptimo)	4,5 - 5,5
Nitrógeno (%)	7,5 - 8,5
Proteína (%)	35 - 45
Ácidos nucleicos (%)	6 - 12
Carbohidratos (%)	30 - 45

Fuente: Ospina y Palacios, 1994.

8.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE *Saccharomyces cerevisiae*

8.3.1 Forma y tamaño

Saccharomyces cerevisiae es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares (Figura 1). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados (Carballo, 2000).



Fig.1. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG

Fuente: Manual de Medios de Cultivo. Merk. 2000.

Sus dimensiones son: 2.5 – 10 micras de ancho y 4.5 – 21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas. (Ariza y González, 1997).

8.3.2 Estructura celular

Una célula de levadura está incluida en una pared celular y por una membrana citoplasmática en la que contiene un núcleo, una vacuola y numerosos gránulos y glóbulos de grasa. No contiene flagelos u otros órganos de locomoción. La pared celular está integrada por polímeros de glucosa y manosa, con cantidades pequeñas de proteínas, lípidos y quitina (Herdoisa, 2001).

8.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA EL CRECIMIENTO de *Sacharomyces cerevisiae*

8.4.1 Composición química

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente. La composición de la materia seca de la levadura se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición química de las levaduras.

COMPONENTES PORCENTAJE (%)	
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	2

Fuente: Haehn, 1991.

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5 – 9% del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30% (Haehn, 1991).

Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30 – 75%), contienen entre 5 y 12% de Nitrógeno (Castellanos, 1991). Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura del cultivo, etc. (Tuite y Oliver, 1991).

8.4.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de Nitrógeno, Fósforo y Carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable (Ospina y Palacios, 1994).

El uso de nutrientes para levaduras durante el proceso de fermentación se puede dividir en cuatro amplias categorías. Se necesitan diferentes nutrientes para levaduras: (1) en el principio, durante la fase de crecimiento aeróbica, al inicio de la fermentación; (2) en el medio, durante la fase anaeróbica de la fermentación alcohólica; (3) como profilaxis en el final, para ayudar fermentaciones perezosas, prevenir fermentaciones detenidas y re activar fermentaciones; y (4) para fermentaciones con elevados °Brix.

Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otros seres vivos como es el carbono, hidrogeno, oxigeno, nitrógeno, fosforo, potasio, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los últimos cinco elementos se necesitan en cantidades mínimas como componentes o activadores de enzima (Carpenter, 1969).

La concentración de nutrientes puede afectar tanto a la velocidad de crecimiento, como al rendimiento del crecimiento del organismo. El efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de células es fácil de comprender: Si el nutriente se convierte en material celular, cuanto más nutriente haya, mayor será la producción de células. La razón para reducir la velocidad de crecimiento a concentraciones muy bajas de nutriente, es porque no se puede transportar ese nutriente al interior de la célula con suficiente rapidez para satisfacer las demandas metabólicas del nutriente y la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de dichos nutrientes; sin embargo, a estas concentraciones bajas, el nutriente es utilizado para la proliferación (Brock y Madigan, 1982).

Los principales nutrientes y las formas más comunes de satisfacerlos son:

Carbono: El carbono es el compuesto mayoritario de la célula de la levadura, alrededor del 50% en peso seco. Los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono. Entre las fuentes de carbono, los glúcidos son los más frecuentemente utilizados como hexosas, disacáridos, trisacáridos (Mossel, 2003).

Nitrógeno: El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo. Es utilizado por las células en los aminoácidos, los nucleótidos y algunas vitaminas.

Todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ion amonio, los cuales pueden ser aportados en el medio por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, y sobre todo el sulfato amónico siendo este el mejor, y al mismo tiempo aportando el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos (Mossel, 2003).

Fósforo: El fosforo se halla incluido en los ácidos nucleícos y los nucleosidos di y tri-fosfato. El fosforo es asimilado por la célula en forma de iones orto

fosfato (H_2PO_4^-). Las fuentes de fósforo en el medio de cultivo deben estar constituidas por el dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) o por el hidrogenofosfato disódico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) (Mossel, 2003).

Azufre: El 60% del azufre está incorporado en las proteínas. El 5% en forma de sulfato inorgánico libre. El resto está en forma de enlaces disulfuro y en aminoácidos sulfurados libres, así como también está presente en algunas vitaminas. La fuente de azufre más utilizada en los medios de cultivo es el sulfato amónico (Mossel, 2003).

Los macronutrientes son K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl. Se requiere en concentraciones de 0.1 a 1 mM.

Potasio.- A pH ácido estimula la fermentación y la respiración, actúa como efector de numerosas enzimas; piruvato quinasas, aldolasas, aldehídos deshidrogenosas, y permeasas e interviene en la estructura de los ARN. Las fuentes de potasio son el cloruro de potasio y los fosfatos mono y dipotásico (Carballo, 2000).

Magnesio.- Es activador de las enzimas glucolíticas, estimula la síntesis de los ácidos grasos, regula las ATPasas de la membrana y participa con el potasio en la penetración del fosfato. El magnesio es aportado en los medios de cultivos en forma de sulfato o de cloruro de magnesio (Carballo, 2000).

Los micronutrientes son Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni y Va. Se requiere en concentraciones de 0.1 a 100 μM . Los micronutrientes pueden actuar como inhibidores, las cuales pueden afectar el crecimiento cuando se encuentra a concentraciones superiores a 100 μM . Hg, Ag, Ar, Ba, Li, Ni, Os, Pb, Se, Te (Gamazo *et al.*, 2005).

El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido por un pH próximo a 4.0 – 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta levadura para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el

crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento y utilización de glucosa, mientras que la máxima producción de enzima se observa a un pH de 3.0 (Tuite y Oliver, 1991).

Para los enólogos el nitrógeno, que estimula la fermentación llevada a cabo por las levaduras fermentadoras, es un nutriente esencial para una buena fermentación alcohólica (FA). 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 y Henschke, 2005). También se ha demostrado la existencia de una correlación entre la máxima velocidad de fermentación, el crecimiento de las levaduras y la concentración inicial de nitrógeno en el mosto (Sablayrolles *et al.*, 2001). El déficit de nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA) en el mosto aumenta considerablemente el riesgo de paradas o ralentizaciones de la fermentación. 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. Consideramos que un mosto con un nivel inicial de azúcares de alrededor de 200 g/L es deficiente en nitrógeno cuando su concentración es de menos de 150 mg/L, esta baja concentración de nitrógeno trae como consecuencias, la baja producción de biomasa, y un corto tiempo de vida de la levadura el cual conlleva a una fermentación “lenta” (Henschke y Jiranek 1993), las llamadas fermentaciones “lentas” generan bajas concentraciones de etanol en el proceso de producción etanólica (Sablayrolles *et al.*, 2001).

Una falta de nitrógeno en el mosto puede interrumpir la síntesis de proteínas en las células de levadura, con un importante efecto inhibitor sobre el transporte de los azúcares, y consecuentemente un aumento del riesgo de paradas de fermentación (Busturia y Lagunas 1986). Antes de que se

produzca una ralentización o parada de la fermentación, la falta de NFA en el mosto puede también provocar un incremento de la producción de H_2S por parte de la levadura (Henschke y Jiranek 1991).

Las fuentes de nitrógeno utilizadas generalmente para la nutrición del mosto son sales de amonio (DAP/DAS) una fuente de nitrógeno 100% inorgánico o un preparado policompuesto constituido por sales de amonio y fracciones de levaduras inactivadas ricas en nitrógeno orgánico α -amínico, que combina los efectos positivos del nitrógeno inorgánico y del nitrógeno orgánico para el crecimiento y fermentación de las levaduras. Cada una de estas fuentes de nitrógeno tiene un efecto diferente sobre la levadura y sobre su fermentación. 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. El efecto de los preparados policompuestos sobre la velocidad de fermentación y sobre el crecimiento es moderado, pero estos preparados ayudan a asegurar un funcionamiento constante de la FA. El efecto sensorial en el mosto de la suplementación con nitrógeno varía considerablemente en función de la fuente de nitrógeno utilizada (Henschke y Jiranek, 1991). El efecto sensorial evaluado durante el proceso de fermentación alcohólica son el color e intensidad del aroma característico del alcohol (Henschke y Jiranek, 1991). Una fermentación realizada con una buena fuente de nitrógeno se percibirá por la coloración del mosto más “obscura” que la que contiene el mosto con una fuente de nitrógeno “pobre”, el aroma característico del alcohol es más fuerte cuando se trabaja con una buena fuente de nitrógeno y el olor empieza a sentirse durante las primeras 6 horas de fermentación, sin embargo una fermentación llevada a cabo con una fuente de nitrógeno “pobre” el aroma empieza a percibirse casi al final de la fermentación (Busturia y Lagunas 1986).

8.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos o añadidas artificialmente, realizan una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía (Biocombustibles, 2007).

La fermentación es un proceso biológico que se lleva a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* que procesa los hidratos de carbono (por regla general azúcares) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. La levadura consume los azúcares y otros productos contenidos en el mosto. Al metabolizar los azúcares se produce alcohol y CO_2 , pero dependiendo de las temperaturas de fermentación y de los otros productos contenidos en el mosto también se producirán alcoholes superiores (cadenas de más de un carbono, metílico, etc.) y otros subproductos que afectarán en gran medida al sabor, aroma y calidad del etanol que estamos elaborando. La fermentación depende de diferentes variables como la composición del mosto, la temperatura, la presión, la cantidad y tipo de cepa de levadura que se haya añadido, la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto, el cinc, cobre y otros metales y minerales contenidos en el mosto, el pH, la forma y geometría de los tanques y de las corrientes que se produzcan en su interior. Dependiendo de la cantidad de proteínas coaguladas contenidas en el mosto y de su composición, le será más o menos favorable a la levadura nutrirse y realizar los procesos de metabolización del azúcar (Menegazzo, 1978).

8.5.1 Ruta metabólica de *Sacharomyces cerevisiae* durante el proceso de fermentación

Para que la levadura lleve a cabo el proceso de fermentación se presentan distintas etapas para transformar las moléculas de glucosa a etanol. Desde la glucosa hasta la síntesis de piruvato, se trata de una vía metabólica idéntica a la glucólisis muscular, denominada vía de las triosas o de Embden-Meyerhof.

La cual se muestra en la figura 2.

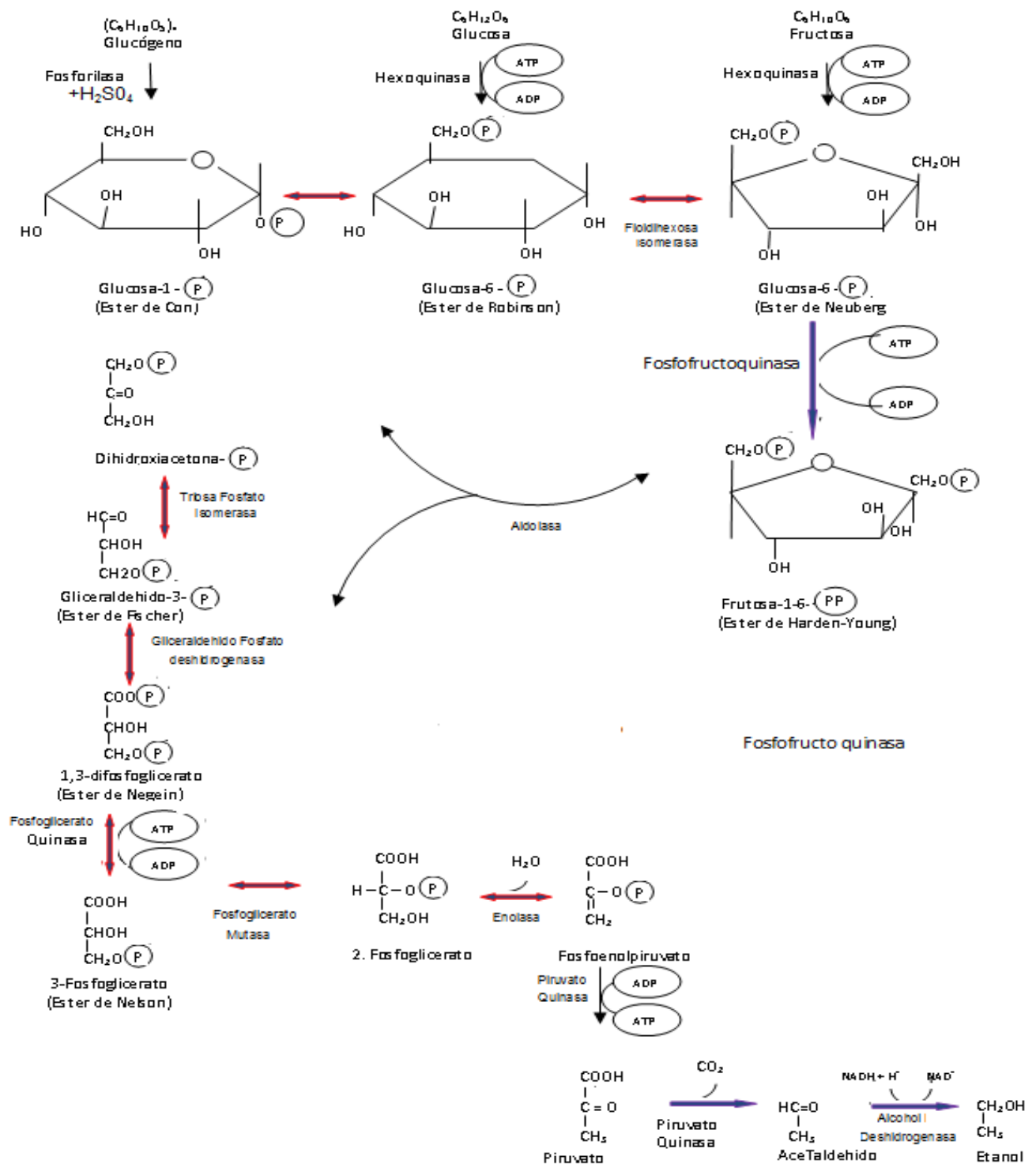


Fig. 2. Ruta metabólica Embden-Meyerhof. (Vázquez. *et al.*, 2007)

Durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol) (Lehninger, 1981). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones del hidrogeno (H^+) y electrones del NADH. Tras esta operación el NADH sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el GADHP se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol (Otterstedt. *et al.*, 2004). En la figura 3, podemos observar la transformación de piruvato a etanol.

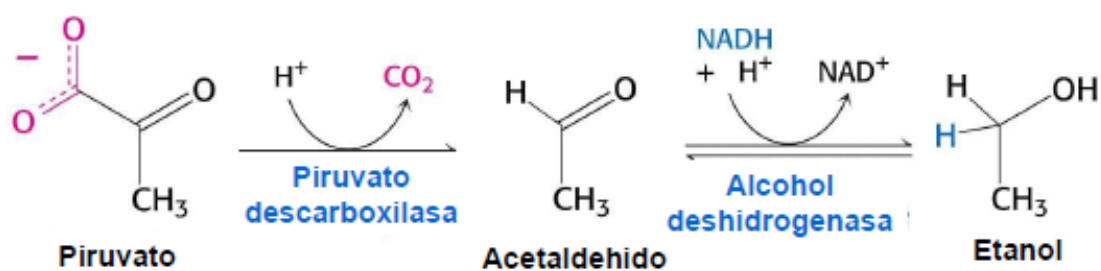


Fig. 3. Conversión del Piruvato a Etanol (Vázquez. *et al.*, 2007)

8.5.2 Requerimientos nutricionales y condiciones de la fermentación

Se ha comprobado que *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de utilizar diversa compuestos nitrogenados en su entorno natural, tales como aminoácidos, urea, y los iones de amonio (NH_4^+) (Hofman-Bang, 1999). Estos compuestos son transportados en las células a través de permeasas y directamente utilizados como bloques de construcción en las vías biosintéticas o degradados en amonio y glutamato para el metabolismo del nitrógeno (Hofman-Bang, 1999).

Es importante mencionar que el crecimiento de *S. cerevisiae* depende en gran medida del tipo y la concentración de fuentes nitrógeno. Como la mayoría de los microorganismos, *S. cerevisiae* utiliza selectivamente fuentes de nitrógeno, el transporte y la utilización de "buenas" fuentes de nitrógeno en lugar de los "pobres" (Crépin L. *et al.*, 2012). Este fenómeno es regulado por

The diagram illustrates the NCR-UAS^{GAT} system for nitrogen control in yeast, showing the metabolic pathways and the genetic circuit.

Metabolic Pathways:

- Preferred nitrogen sources under derepressed condition:** Indicated by a thick black arrow pointing to the Gln3p/Gat1p complex.
- Urea Cycle:** Citrulline → Arginine → Ornithine → Urea → Allantoate → Allantoin → Asparagine → Serine → Glycine. Ornithine is recycled to Proline, which can be converted to Aspartate and Alanine.
- Ehrlich pathway:** Isoleucine, Phenylalanine, Leucine, Valine, Tyrosine, Tryptophan, and Methionine are converted to Fusel oil.
- Glutamate/Glutamine Cycle:** Glutamate is converted to Glutamine by GLN1 and back to Glutamate by GLT1. Glutamate is also converted to a-ketoglutarate by GDH1 and back to Glutamate by GDH2. Glutamine is converted to a-ketoglutarate by GLT1.
- Threonine:** Threonine is converted to NH₄⁺, which enters the Glutamate/Glutamine cycle.

Genetic Circuit:

- nucleus:** Contains the NCR-UAS^{GAT} controlled genes. The Gln3p/Gat1p complex is shown binding to the UAS element, activating the transcription of the controlled genes.
- vacuole:** Contains the Vacuolar protease, which degrades the Gln3p/Gat1p complex.
- Transporter protein:** Located on the vacuolar membrane, it facilitates the transport of Gln3p and Gat1p into the vacuole.

NCR se refiere a la activación de algunos genes, tales como las permeasas de codificación y enzimas catabólicas, necesarios para utilizar el nitrógeno de fuentes no preferidas. En otras palabras, cuando existe una fuente de nitrógeno preferida estos genes se expresan a bajos niveles basales por procesos de NCR (Beltran, *et al.*, 2004). Una vez que las fuentes de nitrógeno represivas se agotan, NCR se activa y los genes de transcripción de NCR sensible se activa (Scherens, *et al.*, 2006). Este permite a *S. cerevisiae* hacer un mejor uso de las fuentes de nitrógeno en el medio, es decir aprovechar más la fuente de nitrógeno presente. El estudio de los procesos de NCR juega un papel importante en la investigación de muchos procesos de regulación global y en optimización del rendimiento industrial de *S. cerevisiae*. Los niveles de expresión de un considerable número de genes están regulados por estos reguladores, incluyendo muchos genes implicados en las vías catabólicas de nitrógeno (tales como glutamina, glutamato, prolina, la urea, la arginina, γ -aminobutírico ácido (GABA), y alantoína), varios genes que codifican permeasas (Crépin. *et al.*, 2012), y otro grupo de genes que

codifican proteasas responsable de la degradación de las proteínas en aminoácidos, de esta manera podemos observar como la levadura utiliza el nitrógeno para poder darnos una buena fermentación alcohólica.

Otro componente de este nutriente es el alto contenido de ácidos grasos que ayudan a resistir las altas concentraciones de etanol en el medio. Como bien sabemos las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato (Tomasso, 2004). La tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma (Madigan, *et al.*, 1994).

Sin embargo La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomasso, 2004).

El buen contenido de minerales presentes en el mosto juega un papel muy importante durante el proceso de fermentación ya que estos ayudan a *S. cerevisiae* a tener mejor resistencia durante todo el proceso fermentativo. Los minerales así como otros iones de gran importancia son transportados al interior de la célula gracias a la capacidad transportadora de protones de la ATPasa de la membrana el cual establece un gradiente de protones a través de la membrana que permite el transporte de aminoácidos, nucleótidos, fosfato y otras moléculas, así como la entrada de cationes, como Na⁺ Mn, Ca, zinc, Fe, K, Cu etc. todo ello es imprescindible para la supervivencia de este organismo (van der Rest. *et al.*, 1995). El potasio es uno de los elementos minerales más importantes para las levaduras ya que estimula la

fermentación y la respiración (Boysen. *et al.*, 2006). El magnesio otro mineral de gran importancia que favorece el buen funcionamiento de muchas enzimas que participan en el metabolismo de *S. cerevisiae*, una carencia de Mg conlleva a la producción elevada de ácido acético en el medio (Mossel, 2003). La presencia de fósforo en la célula es para realizar la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y múltiples metabolitos celulares (implicados en procesos de fosforilación u obtención de energía) (Foury. *et al.*, 2002). El hierro y el cobre también son nutrientes esenciales para *S. cerevisiae* ya que participan en procesos muy relevantes pero el exceso o la incorrecta distribución de estos metales puede resultar tóxico. Dadas sus propiedades redox, la acumulación de hierro y cobre libres da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de provocar daños a diferentes componentes celulares como lípidos, proteínas y DNA. El hierro libre es captado a nivel de la superficie celular a través de sistemas de transporte de baja y alta afinidad (Ooi. *et al.*, 1996). El carbono es de vital importancia en el proceso de fermentación, ya que se ha demostrado que el carbono influye directamente sobre la pared celular de la levadura, además de ser utilizados como fuente de energía, tales como los glúcidos son los más frecuentemente utilizados como hexosas, disacáridos, trisacáridos (Mossel, 2003)

8.5.3 Factores a controlar durante la fermentación

Acidez del sustrato. El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5. En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Ríos. *et al.*, 2005).

Concentración de Azúcares. Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración

celular (Ríos. *et al.*, 2005).

Temperatura. Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar los 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor optimo que es de 30 °C (Ríos. *et al.*, 2005).

El zinc es un elemento esencial para que se realice la fermentación. La falta de zinc puede producir fermentaciones incompletas. Las células de levadura necesitan zinc para su multiplicación. Algunas cepas necesitan más cantidades que otras (Amerine. *et al.*, 1969).

El cobre también es necesario para una fermentación ideal, pero en cantidades muy pequeñas, si esta cantidad se supera, el efecto es negativo (Amerine. *et al.*, 1969).

El control de la formación y descomposición de subproductos producidos durante la fermentación es esencial para conseguir un producto final de calidad. Estos subproductos afectan al etanol en cuanto a la estabilidad biológica, sabor, aromas. Todos ellos son subproductos producidos por los comportamientos característicos de los diferentes tipos de levadura. Durante la fermentación y posterior almacenaje se descomponen en cierta medida y son eliminados o producen a su vez otros subproductos aún menos deseados. Estos subproductos, según su concentración en el mosto, estarán por encima o por debajo del umbral de percepción de los catadores. Algunos subproductos, en concentraciones al borde del umbral de percepción aumentarán la calidad del etanol pero una vez pasada esta barrea pasarán a ser indeseables (Hernández, 2008).

Los subproductos de fermentación más característicos son:

- Alcohol metílico y otros alcoholes superiores
- Ésteres
- Diacetilo (Dicetonas Vicinales)
- Acetaldehidos (Etanal)
- Componentes sulfurosos
- Ácidos orgánicos

8.5.4 Evaluación de la producción de etanol en procesos fermentativos

La obtención y cuantificación de alcohol se lleva a cabo en diferentes métodos, las cuales son; por destilación, calculando su riqueza alcohólica o por espectrofotometría.

Por otro lado la cuantificación de etanol está basado en el hecho que la densidad (o peso específico) de una solución hidroalcohólica disminuye de manera inversamente proporcional a la cantidad de alcohol que contiene. Es decir, mientras más alcohol contenga la solución, menor será su densidad.

El hidrómetro es un instrumento que basa su acción en la variación de flotabilidad que sufre un cuerpo cuando es sumergido en soluciones de diferente densidad. Es similar al densímetro empleado para medir sólidos solubles pero su escala expresa la masa o peso de la solución por unidad de volumen, lo que se conoce como densidad o peso específico. Mediante tablas esta densidad puede ser relacionada con el contenido de alcohol y expresarse entonces como porcentaje o grado Gay-Lussac (°G.L.). Este instrumento y los otros empleados para medir densidad deben ser manejados bajo ciertos parámetros de temperatura para poder obtener de ellos una lectura adecuada (Treybal, 1970).

Alcoholímetro o alcohómetro, no es más que un densímetro cuya escala expresa directamente el contenido de alcohol por lo que no es necesario el uso de tablas. Su fundamento es exactamente el mismo del hidrómetro (Treybal, 1970).

Picnómetro, Es un pequeño bulbo de vidrio de volumen perfectamente calibrado que, al llenarlo con la muestra y pesarlo, permite obtener la masa o peso por unidad de volumen de la solución hidroalcohólica. Requiere el empleo de tablas de equivalencia densidad-alcohol. Requiere el uso de una balanza de precisión (Treybal, 1970).

8.5.4.1 Destilación

La destilación es una operación unitaria que permite la separación de dos componentes por medio de un equilibrio de fases liquido-vapor (Treybal, 1970).

Es decir la operación de separar mediante vaporización y condensación en los diferentes componentes líquidos, sólidos disueltos en líquidos o gases licuados de una mezcla, aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de las sustancias ya que el punto de ebullición es una propiedad intensiva de cada sustancia, es decir, no varía en función de la masa o el volumen, aunque sí en función de la presión (Treybal, 1970).

La destilación depende de parámetros como: el equilibrio liquido- vapor, temperatura, presión, composición y energía. (Treybal, 1970).

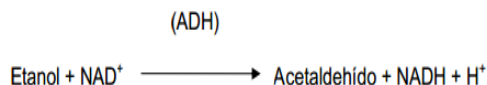
8.5.4.2 Alcohol por ebulloimetría

Principio de la ebulloimetría: El método ebulloimétrico de dosificación de alcohol se basa en la determinación de la temperatura de ebullición del líquido. El agua hierve a 100°C bajo una presión de 760 mm de Hg; el alcohol absoluto en las mismas condiciones tiene su punto de ebullición a 78,4°C. Una mezcla de agua y alcohol cuya concentración se mantenga constante por un refrigerante a reflujo, tiene, a la misma presión, un punto de ebullición situado entre estas dos temperaturas. Cuanto más rico en alcohol sea el líquido, más bajo es el punto de ebullición.

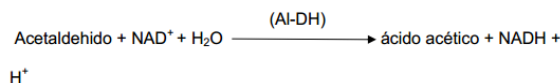
Se concibe entonces que por la determinación de la temperatura de ebullición de un líquido alcohólico, se pueda conocer su riqueza en alcohol (Glover, 1966).

8.5.4.3 Análisis del etanol por espectrofotometría enzimática

La cuantificación del etanol por el método de espectrofotometría enzimática requiere dos reacciones enzimáticas, la primera reacción está catalizada por el alcohol deshidrogenasa (ADH), en la que el etanol se oxida en acetaldehído por dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD^+) (Pesce. *et al.*, 1990).



Sin embargo, dado que el equilibrio de la reacción se produce a favor del etanol y NAD^+ , se requiere otra reacción para atrapar los productos. Esto se consigue por oxidación cuantitativa del acetaldehído en ácido acético en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH) y NAD^+ (Pesce. *et al.*, 1990).



La cantidad de NADH que se forma en esta reacción es estequiométrica con dos veces la cantidad de etanol. Lo que se mide es el NADH por el incremento en la absorción a 340 nm (Beutler, 1988).

La reacción produce la oxidación del alcohol a acetaldehído con la consiguiente reducción de la coenzima dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a NADH. La coenzima reducida puede ser medida directamente a 340 nm (FAO, 1997).

8.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental. En un diseño experimental se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés. El diseño experimental prescribe una serie de pautas relativas qué variables hay que manipular, de qué manera, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza predefinido la necesidad de una presunta relación de causa-efecto (Badii. *et al.*, 2007) Esta propuesta consiste en estimar los efectos principales y de las interacciones en un experimento factorial del tipo 2^k . El método tradicional de experimentación (variar un factor a la vez, mientras que el resto de variables permanecen constantes) es una opción en procesos biológicos donde una gran cantidad de variables entran en juego dentro del comportamiento del sistema y del agente biológico. Este método, aparte de implicar mayor cantidad de experimentos, puede solo proporcionar información parcial que limitaría el alcance del análisis. Por ejemplo, no mostraría si existe interacción entre factores de operación, siendo esta una limitación para los procesos de obtención de etanol en los cuales, interacciones entre factores.

El diseño estadístico de experimentos contempla una amplia variedad de estrategias experimentales que son óptimas para generar y analizar la información que se busca y la que se obtiene. Una de las estrategias más utilizadas son el diseño factorial. Algunos de los reportes científicos que hacen uso de este tipo de estrategias estadísticas para el planteamiento y análisis de experimentos referentes a la producción de etanol.

8.6.1 ANOVA

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, control de procesos, en el laboratorio de análisis, control de métodos analíticos. Su aplicación son dos principalmente: la comparación de múltiples columnas de datos y la estimación de los componentes de variación de un proceso (Badii. *et., al* 2007).

9. METODOLOGÍA

9.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura empleada fue *Saccharomyces cerevisiae*, de la marca Fermentis Etanol Red® en su presentación liofilizada, elaborada por la compañía Lesaffre, líder en levaduras y productos de levadura, creada en 2003 para dirigir el grupo a través de la innovación en el campo de la cervezas, vinos, licores y bebidas fermentadas. Etanol Red® una cepa especialmente seleccionada, que se ha desarrollado para la industria de etanol, con alta tolerancia al etanol, mantiene la viabilidad celular mayor especialmente durante la fermentación "Very High Gravity".

Diseñada para la producción de alcohol y capaz de maximizar los rendimientos de alcohol en una amplia gama de condiciones de fermentación. Es particularmente bien adaptado para el sustrato de azúcar (melazas).

9.2 DESCRIPCIÓN DEL MOSTO

El sustrato empleado fue melaza de caña, la melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar.

Se obtiene durante la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida. El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa (Swan y Karalazos, 1990).

La melaza empleada fue proporcionada por la fábrica de alcohol, a 40 °Brix y pH 4, mediante una dilución con agua desmineralizada se llevó a 18 °Brix para su posterior inoculación. Los principales componentes de la melaza se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de la melaza de caña de azúcar.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60 - 63 %
	Azúcares reductores	3 - 5 %
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4 - 8 %
	Agua	16%
	Grasas	0,40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0,74%
	Magnesio	0,35%
	Fósforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
	Treonina	0,06%
	Valina	0,02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Acido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

(Tellez, 2004; Yepez, 1995)

9.3 NUTRIENTES A EVALUAR

Se evaluaron 7 nutrientes adicionales al mosto los cuales fueron proporcionados por la marca DIGRA S.A DE C.V. además del nutriente actualmente utilizado en destilería la FE, el cual es una mezcla de sulfato y fosfato de amonio.

Debido a la confidencialidad que la empresa exigió, no fue posible tener acceso a la composición específica de cada uno de los 7 nuevos nutrientes, sin embargo de manera verbal se informó por parte del jefe de fábrica de alcohol de destilería la FE, que estos nutrientes propuestos por la marca DIGRA S.A DE C.V. Contienen una mayor cantidad de vitaminas, minerales, carbono, etc. en comparación con el nutriente que se utiliza actualmente en la destilería la FE. Las concentraciones que se utilizaron para cada nutriente se representan en la tabla 5.

Tabla 5. Nutrientes a evaluar.

Nutriente	N1 (cod.P1)	N2 (cod.P2)	N3 (cod.P3)	N4 (cod.IP1)	N5 (cod.P4)	N6 (cod.P5)	N7 (cod.P6)	N8 (s/f amonio)
Concentración g/L	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	2
	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.095
	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	

N: Nutriente.

Cod: Código de identificación del nutriente.

9.4 CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación consistió en utilizar miel clarificada a 40 °Brix. La cual mediante una dilución con agua desmineralizada se llevó a 18 °Brix. Para evaluar el efecto de cada nutriente se emplearon 3.250 L de miel la cual fue distribuida en volúmenes de 250 ml y adicionada a su respectivo matraz Erlenmeyer cada matraz fue inoculado con 5 g de levadura liofilizada de la marca Fermentis etanol red y se adicionó el respectivo nutriente a la concentración indicada en la tabla 4. Además se empleó un matraz testigo, el cual solo contenía melaza y levadura. Una vez adicionados los nutrientes la fermentación transcurrió a una temperatura ambiente de 28° C, sin agitación durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos de; riqueza alcohólica, conteo celular, % de sedimentación, pH y °Brix de la fermentación final. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

9.5 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

9.5.1 Determinación de la riqueza alcohólica

El método ebullométrico de dosificación de alcohol se basa en la determinación de la temperatura de ebullición del líquido. El agua hierve a 100 °C bajo una presión de 760 mm de Hg; el alcohol absoluto en las mismas condiciones tiene su punto de ebullición a 78,4 °C. Una mezcla de agua y alcohol cuya concentración se mantenga constante por un refrigerante a reflujo, tiene, a la misma presión, un punto de ebullición situado entre estas dos temperaturas. Cuanto más rico en alcohol sea el líquido, más bajo es el punto de ebullición. Se concibe entonces que por la determinación de la temperatura de ebullición de un líquido alcohólico, se pueda conocer su riqueza en alcohol.

Para realizar esta determinación de riqueza alcohólica por el método de ebullometría primeramente se calibró el ebullómetro, para ello se colocaron 50 ml de agua en la caldera y se llenó el refrigerante hasta la línea marcada (como se indica en la fig. 5), se colocó un termómetro de 100 °C en el orificio de la caldera, se procedió a encender el mechero y se dejó por varios minutos hasta que la temperatura se estabilizara. Una vez que la temperatura se estabilizó se procedió a calibrar la tabla de grado alcohólico Gay Lussac, esta tabla está formada por 2 escalas diferentes, una es de temperatura que se lee en sentido contrario a las manecillas del reloj y la otra del grado alcohólico que se lee en sentido de las manecillas del reloj. La temperatura generalmente se estabilizaba a 98 °C, entonces para calibrar la tabla de grado alcohólico se posicionaba los 98 °C en la escala de grado alcohólico en 0, obteniendo de esta manera la calibración del instrumento con base al punto de ebullición del agua. Se drenó la muestra con la que se calibró y se procedió a tomar 50 ml del caldo de fermentación obtenida, se depositó en la caldera, se le colocó un termómetro de 100 °C, se llenó el refrigerante hasta la línea marcada y se dejó ebulir por varios minutos hasta que se estabilizó la temperatura. Una vez que esto se alcanzó se comparó la temperatura a la cual se estabilizó y se leyó en la regla alcohólica Gay Lussac. Las figuras 5 y 6 muestran los puntos del ebullómetro. (Manual de operación de análisis fisicoquímicos de destilería la FE S.A DE .CV)

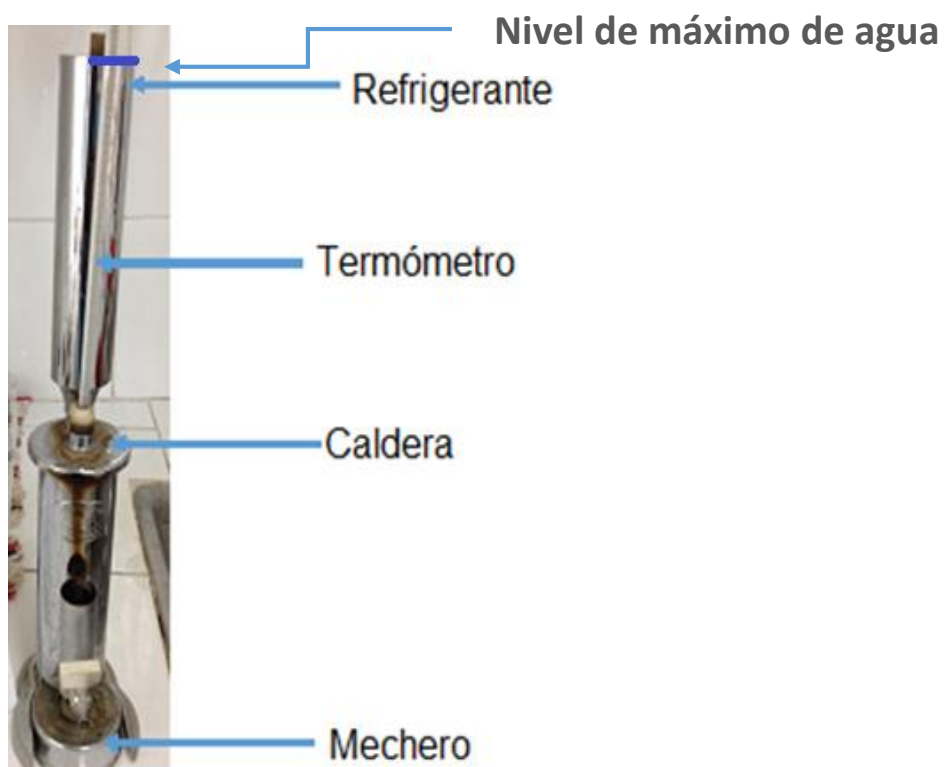


Fig. 5. Ebulómetro

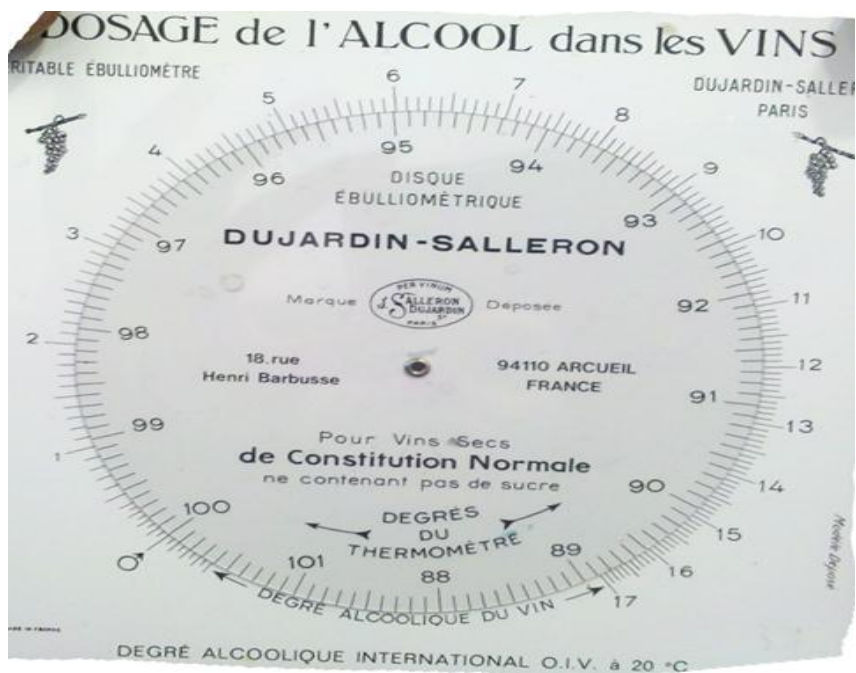
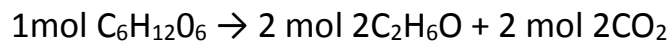
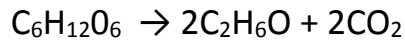


Fig. 6. Tabla de ° alcohólico Gay Lussac

9.5.2 Eficiencia de fermentación

La eficiencia de la fermentación se determinó mediante un cálculo que fue proporcionado por el jefe de la fábrica de alcohol de destilería la FE. Donde se establece que el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511111 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. Dichos valores se obtienen de la fermentación anaerobia que realiza *S. cerevisiae* al metabolizar las moléculas de glucosa. La reacción se presenta a continuación. (Manual de operación de análisis fisicoquímicos de destilería la FE S.A DE .CV)



Donde: $C_6H_{12}O_6 = 180\text{ g}$

$2C_2H_6O = 46\text{ g}$

$2CO_2 = 44\text{ g}$

$$Y1 = (C_2H_6O / C_6H_{12}O_6) = (95\text{g}/180\text{g}) = 0.5111$$

$$Y2 = (CO_2 / C_6H_{12}O_6) = (88/180) = 0.489$$

$$\% \text{ eficiencia de fermentación} = \frac{\text{Riqueza alcohólica real} \times 100}{\text{Riqueza alcohólica teórica}}$$

$$\text{Riqueza alcohólica teórica} = (^\circ\text{Brix inicial} / ^\circ\text{Brix final}) \times 0.511111$$

9.5.3 Conteo de células

Después de las 24 horas de fermentación se procedió al conteo celular, primeramente se homogenizó muy bien el caldo de fermentación para después tomar 1 ml del caldo fermentación de cada matraz y el cual se depositó en un matraz volumétrico de 100 ml y se procedió a aforar con agua desmineralizada. Una vez aforada se homogenizó la solución. Se tomaron 10 ml de la muestra homogenizada y se colocó en un tubo de ensaye con tapón de baquelita, se le agregaron tres gotas de azul de metileno y se procedió a homogenizar la solución tapando el tubo de ensaye. Se homogenizó perfectamente la muestra contenida en el tubo y se tomó una pequeña parte de la muestra con la ayuda de un gotero y se depositó en la cámara de Neubauer, se llevó al microscopio para poder observar la muestra. El conteo se realizó considerando únicamente células vivas. (Manual de operación de análisis fisicoquímicos de destilería la FE S.A DE .CV)

Total de células vivas= células vivas * 5000000

Viabilidad celular= [células vivas/ (células vivas + células muertas)]*100

9.5.4 Determinación del % de sedimentación celular

Después de las 24 horas de fermentación se tomaron 10 ml del caldo de fermentación obtenida de cada uno de los matraces y se depositó en tubos Eppendorf graduados, se llevó a la centrifuga a 3,000 rpm durante 5 minutos. Después de eso se tomó la lectura de la biomasa sedimentada. (Manual de operación de análisis fisicoquímicos de destilería la FE S.A DE .CV)

9.5.5 Determinación de pH

Se calibró el potenciómetro con las soluciones buffer a pH 4 y 7, una vez calibrado el potenciómetro se tomó aproximadamente 30 ml de la muestra fermentada y se depositó en un vaso de precipitado de 50 ml, se introdujo el electrodo del potenciómetro y se esperó unos segundos para que el pH se regulara. Una vez regulada se tomó la lectura del potenciómetro. (Manual de operación de análisis fisicoquímicos de destilería la FE S.A DE .CV)

9.5.6 Determinación de °Brix en muestra

Una vez transcurridas las 24 horas de fermentación se procedió a tomar aproximadamente 250 ml de muestra de cada uno de los matraces y se depositó en una probeta de 250 ml, se le introdujo un brixómetro de 50°Brix dándole un giro al introducirlo en sentido de las manecillas del reloj, se dejó estabilizar durante unos minutos, después se procedió a tomar la lectura de los °Brix. (Manual de operación de análisis fisicoquímicos de destilería la FE S.A DE .CV)

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de este proyecto están basados en la determinación de la eficiencia de fermentación, así como de la riqueza alcohólica que generaron los diferentes nutrientes de la marca DIGRA S.A DE C.V. A diferentes concentraciones, cuyos resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla. 6. Resultados de la fermentación de *S. cerevisiae* utilizando 8 nutrientes diferentes

Nutriente	Concentración (g/L)	Riqueza alcohólica (°GL)	Eficiencia de fermentación (%)	Viabilidad celular (%)	Concentración celular (cel/ml)
P1	0.15	3.267±0.058	67.277±1.189	75.537±3.707	7.0E+08±8.5E+07
	0.2	3.400±0.173	70.023±3.567	76.098±0.817	6.7E+08±7.4E+07
	0.25	3.000±0.087	61.785±1.784	71.003±2.171	6.2E+08±9.2E+07
	0.625	3.733±0.144	76.888±2.973	75.113±1.721	7.7E+08±1.5E+07
P2	0.15	3.933±0.462	80.163±9.414	87.741±1.367	8.8E+08±9.2E+07
	0.2	4.050±0.087	82.541±1.765	86.930±2.361	7.9E+08±8.6E+07
	0.25	3.900±0.173	79.484±3.530	87.809±5.184	5.3E+08±5.8E+06
	0.625	3.733±0.144	76.888±2.972	77.233±8.216	6.8E+08±3.8E+07
P3	0.15	4.200±0	85.600±0	79.079±3.397	6.0E+08±6.6E+07
	0.2	4.500±0.087	91.710±1.767	83.532±2.382	7.1E+08±8.0E+07
	0.25	4.600±0	93.750±0	79.098±2.340	7.3E+08±3.5E+07
	0.625	4.450±0	91.650±0	79.340±1.448	6.3E+08±1.2E+07
IP1	0.15	4.267±0.058	87.900±1.212	85.316±1.200	6.7E+08±1.4E+07
	0.2	4.233±0.058	90.000±1.212	86.766±2.272	7.1E+08±2.0E+07
	0.25	4.233±0.058	92.033±1.270	85.138±3.084	7.2E+08±1.3E+07
	0.625	4.400±0.087	93.533±1.848	86.837±2.691	7.1E+08±1.5E+07
P4	0.15	4.167±0.058	92.133±1.328	89.450±2.828	6.7E+08±5.0E+07
	0.2	4.233±0.058	92.033±1.270	85.238±3.582	6.7E+08±2.8E+07
	0.25	4.267±0.058	92.767±1.270	87.964±0.766	6.7E+08±1.3E+07
	0.625	4.200±0	96.700±0	86.397±1.483	7.0E+08±2.3E+07
P5	0.15	4.000±0.520	85.033±11.027	84.873±10.127	6.8E+08±1.8E+07
	0.2	4.367±0.058	92.867±1.270	90.293±4.244	7.9E+08±1.5E+07
	0.25	4.367±0.058	94.967±1.270	88.140±0.534	7.9E+08±3.8E+07
	0.625	4.300±0	93.500±0	90.230±2.488	7.2E+08±1.8E+07
P6	0.15	4.267±0.058	92.767±1.270	88.540±0.680	7.9E+08±1.0E+07
	0.2	4.300±0	93.500±0	88.435±2.750	7.5E+08±8.0E+07
	0.25	4.500±0.173	97.433±0.635	92.314±1.255	8.0E+08±2.3E+07
	0.625	4.450±0	96.700±0	89.483±2.603	8.2E+08±7.6E+06
s/f amonio	2	4.200±0	94.500±0	83.420±1.293	5.8E+08±1.0E+07
	0.095	3.833±0.058	91.500±1.386	83.463±1.676	5.5E+08±3.4E+07

10.1 CONCENTRACIÓN CELULAR

Se evaluó la concentración de células obtenida en cada una de las fermentaciones con los diferentes nutrientes a diferentes concentraciones. El análisis de varianza se refleja en la tabla 7.

Tabla 7. Análisis de Varianza para concentración celular

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:nutriente	1.42385E17	7	2.03407E16	3.81	0.0012
B:concentración	2.604E17	6	4.34001E16	8.13	0.0000
RESIDUOS	4.48569E17	84	5.34011E15		
TOTAL (CORREGIDO)	9.7831E17	97			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla 7 muestra que los valores-P son menores que 0.05, el cual no indica que existe diferencia significativa entre el nutriente y la concentración, siendo la concentración la más influyente durante el proceso fermentativo.

La tabla 8 muestra la comparación de medias según la diferencia mínima significativa.

Tabla 8. Prueba de medias para concentración celular

Concentración (g/L)	Número de células (cel/ml)	Grupos Homogéneos
0	5.1875E8	X
0.095	5.42083E8	XX
2	5.72083E8	XXX
0.25	6.95179E8	XX
0.15	7.10417E8	XX
0.625	7.20417E8	XX
0.2	7.28036E8	X

En la tabla 8, utilizando un nivel de confianza del 95% podemos observar que en las concentraciones 0.25 g/L, 0.15 g/L, 0.625 g/L, 0.2 g/L, y 2 g/L, no existe diferencia significativa en cuanto al total de células que se generaron durante la fermentación. Sin embargo podemos observar que con la concentración 0.2 g/L en comparación con la concentración 0.625 g/L existe una diferencia del 2% en cuanto a la producción celular, siendo 0.2 g/L la mejor con concentración para generar una alta concentración de células en el medio. A si también se puede notar que 0.2 g/L es superior en un 22% a la concentración de 2 g/L, la cual es la concentración de nutriente que actualmente se utiliza en destilaría la FE.

La figura 7 muestra el diagrama de Fisher para el total de celular en donde podemos comparar visualmente el comportamiento de cada una de las concentraciones de los diferentes nutrientes utilizados.

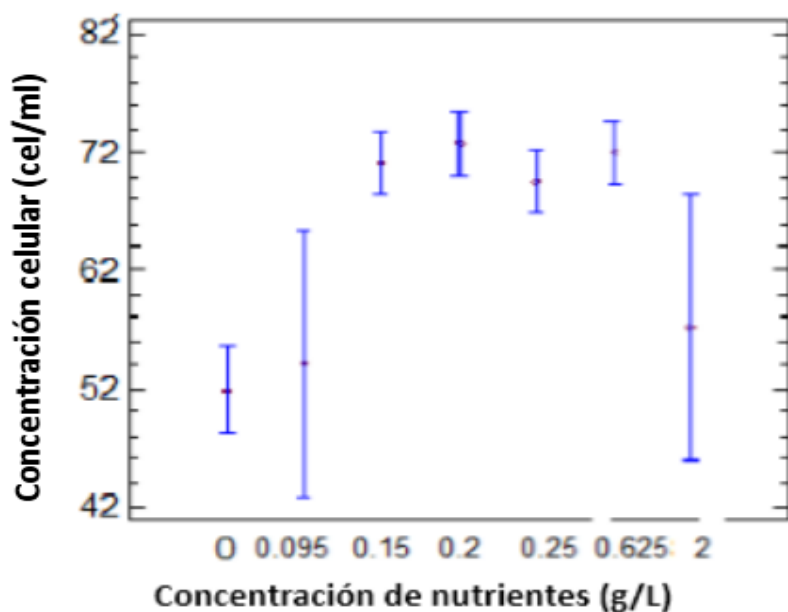


Fig. 7. Diagrama de Fisher para concentración celular.

La tabla 9 muestra la prueba de múltiples rangos para concentración celular por nutriente observándose que el mejor nutriente es el 7 que estadísticamente igual al 6.

Tabla 9. Pruebas de Múltiple Rangos para la concentración celular por nutriente

Nutriente	Número de células (cel/ml)	Grupos Homogéneos
3 (cod.P3)	5.8708E8	X
5(cod.P4)	6.09003E8	XX
1(cod.P1)	6.17465E8	XXX
4(cod.IP1)	6.34388E8	XXX
8(s/f amonio)	6.47245E8	XXXX
2(cod.P2)	6.47465E8	XX
6(cod.P5)	6.69772E8	XX
7(cod.P6)	7.15542E8	X

Los resultados en cuanto al nutriente óptimo, como pudimos observar en la tabla anterior son los nutrientes P5 y P6, sin embargo, es importante mencionar que durante el conteo celular de las fermentaciones obtenidas se observó contaminación microbiana (cocos y bacilos) en el caldo fermentado, por lo que al evaluar cada uno de los nutrientes se obtuvo que nutriente 8 (sulfato y fosfato de amonio) estuvo muy contaminada, por lo que no es recomendable seguir trabajando con este nutriente. Sin embargo con P6 se observaron células más grandes y la contaminación microbiana disminuyó considerablemente permitiendo obtener una mejor fermentación y un buen número de células en buen estado. El tamaño de células que se obtuvieron durante la fermentación con el nutriente 8 fueron células pequeñas, aformes y con una pared celular delgada, esto se debe a la falta de nutriente en el medio en este caso la presencia de carbono, la cual ayuda a la célula a fortalecer su membrana, obteniendo con ello células más gruesas y mejor definidas (Ospina y Palacios, 1994). Ya que la concentración de nutrientes puede afectar tanto a la velocidad de crecimiento, como al rendimiento del crecimiento del organismo (Brock y Madigan, 1982). A si también 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). Sin

embargo con el nutriente P6, se obtuvo células grandes, bien definidas y con pared celular gruesa. El incremento de la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo favoreció al crecimiento de la biomasa tal como lo comenta Henschke y Jiranek (1991), así también como la presencia de carbono que se considera que contiene este nuevo nutriente favoreció directamente en la pared celular de la levadura haciéndola más gruesa y bien definida (Mossel, 2003). El buen contenido de minerales favoreció el buen crecimiento de la biomasa ya que estos al ser consumidos por la levadura ayudan a tener una mejor resistencia durante todo el proceso fermentativo (van der Rest. et al., 1995). El fosforo presente en el sustrato favoreció a la síntesis de ácidos nucleicos y con ellos poder producir la energía que la célula necesita para metabolizar las moléculas de glucosa a etanol (Foury y Roganti, 2002). Por el contrario un déficit de nitrógeno en el mosto puede interrumpir la síntesis de proteínas en las células de levadura, con un importante efecto inhibidor sobre el transporte de los azúcares, y consecuentemente un aumento del riesgo de paradas de fermentación (Busturia y Lagunas 1986).

10.2 VIABILIDAD CELULAR

Se evaluó además el total de células obtenidas en cada una de las fermentaciones con los diferentes nutrientes a diferentes concentraciones. El análisis de varianza se refleja en la tabla 10, observándose que el nutriente y la concentración tienen un efecto estadístico significativo sobre la viabilidad celular.

Tabla 10. Análisis de Varianza para viabilidad celular

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:nutriente	2109.63	7	301.376	12.37	0.0000
B:concentración	4540.49	6	756.749	31.07	0.0000
RESIDUOS	2045.73	84	24.354		
TOTAL (CORREGIDO)	8550.15	97			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

La tabla 10 muestra que los valores-P son menores que 0.05, el cual no indica que existe diferencia significativa entre el nutriente y la concentración, siendo la concentración la más influyente durante el proceso fermentativo.

La tabla 11 muestra la comparación de medias según la diferencia mínima significativa.

Tabla 11. Prueba de medias para viabilidad celular

Nutriente	Viabilidad (%)	Grupos Homogéneos
1(cod.P1)	68.1321	X
3(cod.P3)	72.521	X
2(cod.P2)	75.8249	XX
4(cod.IP1)	77.2006	XX
5(cod.P4)	80.0337	XX
6(cod.P5)	81.4455	X
7(cod.P6)	81.7303	X
8(s/f amonio)	89.7423	X

Los resultados muestran que en la viabilidad celular los nutrientes P5, P6 y (s/f amonio) son estadísticamente iguales. Sin embargo, es importante mencionar que el tamaño de células y la contaminación microbiana (cocos y bacilos) que se presentó en cada uno de estos nutrientes varia demasiado sobre todo en cuanto al nutriente 8 se refiere ya que presentó alta contaminación microbiana, esto se le atribuye a la falta de nutrientes que pudo existir en el medio de cultivo la cual no favoreció el crecimiento de *S. cerevisiae* debido a que el medio pudo no contener la cantidad suficiente de nutrientes para que la levadura pudiera crecer y multiplicarse rápidamente, por lo que las bacterias que normalmente presenta el mosto proliferaron rápidamente, reduciendo el sustrato para *S. cerevisiae*, por lo que el resultado que se obtuvo de las fermentaciones con este nutriente reflejaron células, pequeñas, con pared celular delgada y con alta contaminación en el

medio. A diferencia del nutriente P6, el cual presentó baja contaminación microbiana, y por lo consecuente las células se desarrollaron mejor en el medio, además de ser células grandes también fueron células muy bien definidas y con una pared celular gruesa. Como se ha mencionado anteriormente esto se atribuye a la buena cantidad de carbono, nitrógeno, hidrógeno y fósforo (Ospina y Palacios, 1994) que probablemente contenía el medio el cual favoreció el buen crecimiento de *S. cerevisiae*. A si también como se considera que este nuevo nutriente contenía una buena cantidad de minerales y otros iones que son metabolizados por la levadura y que favorecen en la supervivencia de este organismo (van der Rest. *et al.* 1995). Ya que se ha comprobado que *S. cerevisiae* cuando se encuentra en un medio rico en nutrientes, específicamente hablando de nitrógeno este tiende a metabolizar la concentración más “rica” en nitrógeno que la concentración más “pobre” (Crépin. *et al.*, 2012). En este caso *S. cerevisiae* tiende a consumir primeramente la fuente de nutriente que se le esta adicionando al medio, para después consumir la fuente de nutriente “pobre” que contiene el medio por sí mismo. Ya que como sabemos la melaza por si sola es una buena fuente de nutrientes para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Pero como se puede observar en este proyecto esa fuente de nutrientes que contiene la melaza por sí sola no es suficiente para que la levadura pueda producir altos volúmenes de alcohol. Ya que cuanto más nutriente haya mayor será la producción de células (Brock y Madigan, 1982) y al aumentar la biomasa, aumenta la producción de alcohol. Por lo que es necesario la adición de nutrientes que favorezcan el crecimiento celular, y por lo consecuente esto favorecerá en una buena producción de alcohol.

La figura 8 muestra el diagrama de Fisher para la viabilidad celular en donde podemos comparar el comportamiento de cada uno de los nutrientes utilizados durante la fermentación.

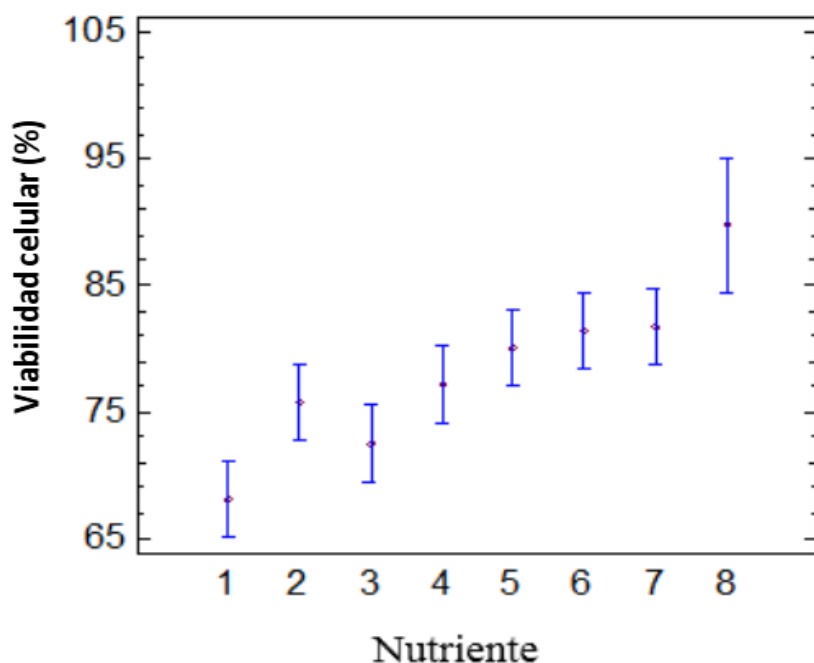


Fig. 8 Efecto de los nutrientes sobre la viabilidad celular

La tabla 12 muestra la prueba de múltiples rangos para viabilidad celular por concentración de cada uno de los nutrientes utilizados, durante cada una de las fermentaciones, observándose que la mejor concentración de nutriente es 0.25 g/L y 0.2 g/L.

Tabla 12. Pruebas de Múltiple Rangos para viabilidad celular por concentración

Concentración g/L	Viabilidad (%)	Grupos Homogéneos
0	60.0151	X
2	72.0069	X
0.095	72.0499	X
0.625	85.1501	X
0.15	85.994	X
0.25	86.1264	X
0.2	86.9592	X

La mejor concentración como se puede observar es la de 0.2 g/L. Es ahí donde se refleja la mejor viabilidad. Tomando en cuenta que en el proceso de producción de etanol existe recuperación de levadura, es conveniente utilizar esta concentración de nutriente, debido a que con esto podemos utilizar la cantidad de nutrientes necesarios para lograr una fermentación adecuada. Por lo tanto, como podemos ver en los resultados, la adición de nuevos nutrientes al medio de cultivo generan un efecto positivo sobre el crecimiento y la actividad fermentativa de la levadura, generando un buen número de células en el medio capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica. La adición de cada una de estas fuentes de nitrógeno tiene un efecto diferente sobre la levadura y sobre su fermentación (Henschke P, 1997). Otra de las fuentes de nitrógeno que normalmente se adicionan al mosto antes y durante el proceso de fermentación es el fosfato di-amónico (DAP). Este compuesto, favorece ampliamente el proceso fermentativo. Por lo que el número de células en mostos con bajas cantidades de nitrógeno es mucho menor que los mostos con altos niveles de nitrógeno y por consiguiente la mortalidad de las células es mayor (Beltran, 2004).

10.4 EFICIENCIA DE FERMENTACIÓN

Se evaluó la eficiencia de fermentación obtenida en cada una de las fermentaciones con los diferentes nutrientes a diferentes concentraciones, con el objetivo de determinar la capacidad de la levadura de transformar las moléculas de glucosa a etanol. El análisis de varianza (tabla 13) muestra que de la misma forma el nutriente y su concentración tienen efecto estadístico significativo sobre la eficiencia de fermentación.

Tabla 13. Análisis de varianza para eficiencia de fermentación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:nutriente	7391.06	7	1055.87	65.72	0.0000
B:concentracion	2452.96	6	408.826	25.44	0.0000
RESIDUOS	1349.65	84	16.0672		
TOTAL (CORREGIDO)	11252.8	97			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

La tabla 13 muestra que los valores-P son menores que 0.05, el cual no indica que existe diferencia significativa entre el nutriente y la concentración, siendo el nutriente el más influyente durante el proceso fermentativo.

Tabla 14. Prueba de medias para eficiencia de fermentación

Nutriente	Eficiencia de fermentación (%)	Grupos Homogéneos
1(cod.P1)	64.0831	X
2(cod.P2)	74.6634	X
4(cod.IP1)	86.5789	X
3(cod.P3)	86.9306	XX
5(cod.P4)	86.9881	XX
8(s/f amonio)	89.011	XXX
6(cod.P5)	90.1285	XX
7(cod.P6)	95.4451	X

Comparando los resultados de los nutrientes observamos que con el nutriente P6 se obtuvo la mejor eficiencia de fermentación.

En la figura 9, muestra el diagrama de Fisher para la eficiencia de fermentación donde podemos comparar la eficiencia de fermentación de cada uno de los nutrientes utilizados durante el proceso de fermentación.

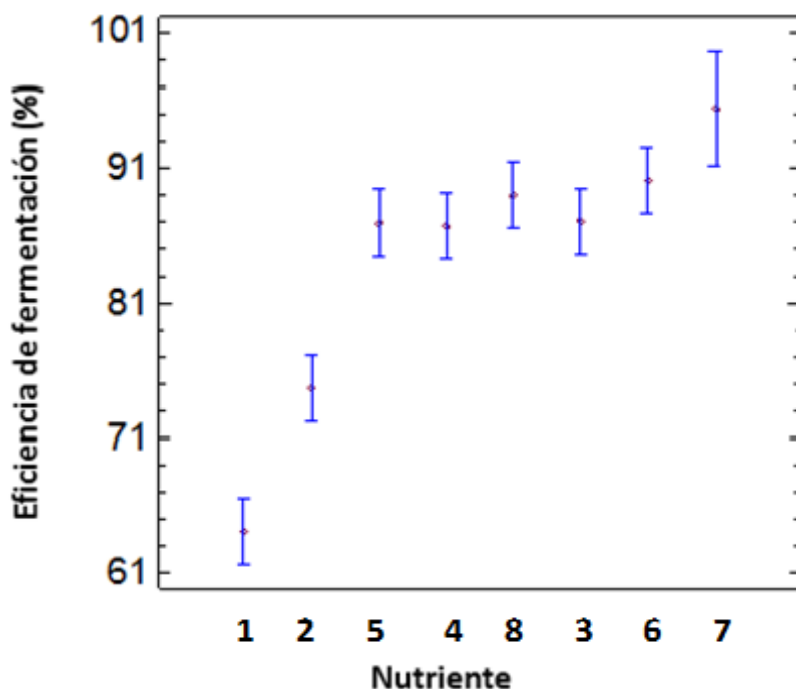


Fig. 9. Efecto del nutriente sobre la eficiencia de fermentación.

La tabla 15 muestra la prueba de múltiples rangos para la eficiencia de fermentación por concentración utilizada de nutrientes, donde se observa que la mejor concentración es 0.625 g/L que es estadísticamente igual a 0.25 g/L y 0.2 g/L.

Tabla 15. Pruebas de Múltiple Rangos para eficiencia de fermentación por concentración.

Concentración g/L	Eficiencia de fermentación (%)	Grupos Homogéneos
0	70.9091	X
0.095	80.2469	XX
2	83.2363	XXX
0.15	86.0087	X
0.25	89.0567	XX
0.2	89.1274	XX
0.625	91.015	X

En cuanto a las concentraciones de los nutrientes observamos que se obtuvieron tres concentraciones estadísticamente iguales, por lo que es conveniente utilizar la concentración de 0.2 g/L, la cual generará estadísticamente el mismo efecto en cuanto a la eficiencia de fermentación que al utilizar las otras dos concentraciones. Por lo que es conveniente utilizar la concentración de 0.2 g/L con el nutriente P6, ya que con este se obtiene una buena eficiencia de fermentación además de generar un ahorro de nutriente, comparándolo con la concentración de 0.625 g/L, y obteniendo el mismo efecto benéfico sobre la eficiencia de la fermentación, es decir con este nutriente y con esta concentración la levadura puede transformar un alto contenido de moléculas de glucosa a etanol, mejor que el utilizado con el nutriente 8(sulfato y fosfato de amonio). La capacidad alta de transformación de las moléculas de glucosa a etanol se atribuye a que el nutriente utilizado puede contener una alta concentración de nitrógeno, que la célula metaboliza a través de iones amonio acelerando la capacidad fermentativa de la levadura. Utilizando P6 con la concentración 0.2 g/L, también se obtuvieron células grandes, bien definidas y con una pared celular gruesa, esto se debe a que este nutriente debe contener una buena cantidad de carbono que favorece altamente a la levadura directamente en la pared celular y sobre todo le sirve a la célula como fuente de energía. Considerando que en el proceso de producción de alcohol existe recuperación de levaduras, y considerando el aspecto económico, es altamente recomendable utilizar el nutriente P6 con la concentración 0.2 g/L. De esta manera como se ha mencionado se obtendrá una buena producción de alcohol, cumpliendo con las metas diarias de producción, obteniendo un alcohol de 96°, un alcohol que cumple con las normas de calidad, y que sea de bajo costo. Estos puntos son muy importantes para la implementación del nutriente en la industria. Se han realizado numerosos estudios relacionados con el efecto del nitrógeno en la fermentación, en los cuales algunos autores explican que la adición de fuentes de nitrógeno en el mosto incrementan la biomasa de las levaduras y la velocidad de utilización de los azúcares (Halasz y Laszlity, 1991), mientras que otros comentan que el uso de sales de amonio para

incrementar el contenido de nitrógeno en el mosto induce a la represión en el consumo de aminoácidos en las levaduras, lo cual podría reducir la eficiencia de la fermentación y disminuir la síntesis de aminoácidos (Beltrán. *et al.*, 2004). Sin embargo se ha demostrado que esta opinión es un tanto erróneo debido a que se ha demostrado que al agregar una buena fuente de nitrógeno favorece al crecimiento de biomasa, aumentando la velocidad de fermentación y evitando las llamadas fermentaciones “lentas” obteniendo una buena eficiencia de fermentación (Van der Rest. *et al.*, 1995).

10.3 RIQUEZA ALCOHÓLICA

Se evaluó la riqueza alcohólica obtenida en cada una de las fermentaciones con los diferentes nutrientes a diferentes concentraciones, donde pudimos medir la cantidad de alcohol que se generó en cada una de las fermentaciones. En La tabla 16 se puede observar que tanto el nutriente como su concentración en el mosto de fermentación afectan estadísticamente la riqueza alcohólica de la fermentación.

Tabla 16. Análisis de Varianza para riqueza alcohólica

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:nutriente	12.8597	7	1.8371	44.25	0.0000
B:concentracion	9.36701	6	1.56117	37.60	0.0000
RESIDUOS	3.48766	84	0.0415197		
TOTAL (CORREGIDO)	25.6208	97			

La tabla 16 muestra que los valores-P son menores que 0.05, el cual no indica que existe diferencia significativa entre el nutriente y la concentración, siendo el nutriente el más influyente durante el proceso fermentativo.

La tabla 17 muestra la comparación de medias según la diferencia mínima significativa.

Tabla 17. Prueba de medias para Riqueza alcohólica.

Concentración g/L	Riqueza alcohólica (°GL)	Grupos Homogéneos
0	3.025	X
0.095	3.45833	X
2	3.825	XX
0.15	4.06786	X
0.25	4.17738	XX
0.2	4.20833	X
0.625	4.23452	X

Como podemos observar en la tabla 14, la riqueza alcohólica fue mayor en las concentraciones de 0.2 g/L, 0.625 g/L, y 0.25 g/L, no existiendo diferencia estadística significativa entre ellos. Sin embargo, podemos notar que la concentración que generó una mayor cantidad de alcohol fue 0.625 g/L la cual es estadísticamente igual a 0.2 g/L. Es decir ambas concentraciones generaron el mismo efecto en cuanto a la producción de alcohol durante el proceso fermentativo, por lo que se optó por seleccionar a la concentración de 0.2 g/L como la mejor concentración de nutriente presente en el caldo de fermentación y con el cual se logró obtener una buena concentración de alcohol es cual es superior a el resultado obtenido por s/f de amonio. La adición de nuevos nutrientes al medio de cultivo, mejoraron el crecimiento, y por lo consecuente el metabolismo de las levaduras, haciendo que estas generarán más alcohol que con el nutriente que actualmente se utiliza durante la fermentación. Se cree que el nuevo nutriente además de vitaminas contiene minerales, los cuales son muy importantes durante la fermentación, como una buena cantidad de magnesio la cual ayuda a disminuir la producción de ácido acético durante el proceso de fermentación, logrando obtener mayor cantidad de alcohol.

En la figura 10 se muestra el diagrama de Fisher para la Riqueza alcohólica en donde podemos comparar visualmente el comportamiento de la riqueza alcohólica con las dosis utilizadas de los diferentes nutrientes.

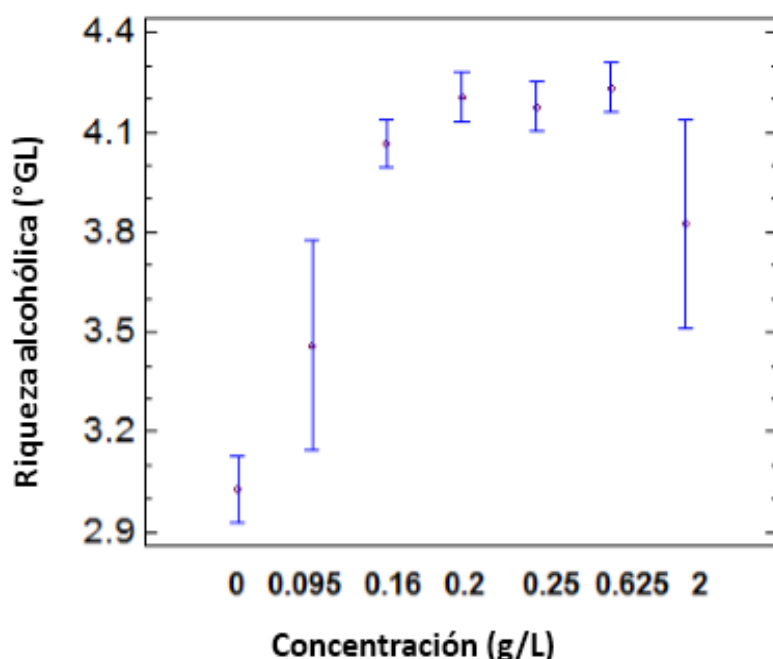


Fig. 10. Riqueza alcohólica obtenida por cada una de las concentraciones de nutrientes utilizados.

La tabla 18 muestra la prueba de múltiples rangos para riqueza alcohólica por nutriente observándose que el mejor nutriente es P5 que es estadísticamente igual a P3 y P6.

Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos para Riqueza alcohólica.

Nutriente	Riqueza alcohólica (°GL)	Grupos Homogéneos
1(cod.P1)	2.98823	X
2(cod.P2)	3.569	X
5(cod.P4)	3.92669	X
8(s/f amonio)	3.94976	X
4(cod.IP1)	3.96515	X
3(cod.P3)	4.0613	XX
7(cod.P6)	4.1613	X
6(cod.P5)	4.23163	XX

Sin embargo, como podemos observar el mejor nutriente que obtuvo una mayor riqueza alcohólica fue P5 el cual es estadísticamente igual a P6, ambos nutrientes generaron el mismo efecto significativo en cuanto a la producción de alcohol que se generó durante el proceso fermentativo. Por lo que se optó por seleccionar a P6 como el mejor nutriente ya que con este nutriente se logró obtener una buena cantidad de alcohol superior a la que obtuvo con el nutriente 8. Es importante tomar en cuenta los demás factores que se evaluaron durante este proyecto, sobre todo en cuanto a la eficiencia de fermentación. Ya que P6 fue superior a todos los demás nutrientes evaluados. Por lo que al comprar los resultados obtenidos de P6 con los de s/f de amonio se puede decir que el nutriente óptimo es P6, con la concentración 0.2 g/L. los resultados muestran que con este nutriente podemos obtener una buena cantidad de alcohol, que es producto de un buen número de células que se produjeron durante la fermentación. Como se ha mencionado con anterioridad tener una buena fuente de nitrógeno en el medio de cultivo genera un buen crecimiento y mejora la capacidad fermentativa de la levadura, logrando producir una mayor cantidad de etanol. Tal como los nutrientes y la buena fuente de nitrógeno que se cree que aporta el nutriente P6. La adición de nutrientes al medio de cultivo genera que la levadura esté mejor nutrida, y por lo tanto llevar a cabo en perfectas condiciones la fermentación alcohólica, la cual genera una buena producción de alcohol superior al actualmente obtenido. Los compuestos mayoritarios del mosto son: amonio (3-10%), aminoácidos (25-30%), polipéptidos (25-40%) y proteínas (5-10%). y los aminoácidos son fundamentales para su crecimiento y por lo tanto son las fuentes preferidas de nitrógeno (Bell y Henschke, 2005). Los aminoácidos pueden ser considerados cuantitativamente los componentes más importantes en cuanto a la aportación de nitrógeno para la síntesis de 5 proteínas estructurales y funcionales que hacen aumentar la biomasa de las levaduras, y para la producción de enzimas y transportadores de metabolitos que intervienen en la fermentación alcohólica (Bell y Henschke, 2005). Logrando obtener un buen consumo de sustrato y sobre todo que las levaduras generen una buena cantidad de alcohol.

En la figura 11, observamos el comportamiento que tuvo la Riqueza alcohólica por cada nutriente utilizado.

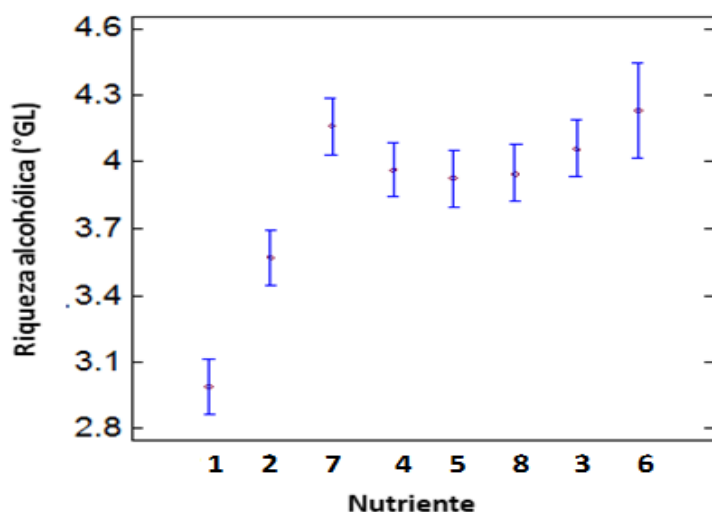


Fig. 11. Riqueza alcohólica obtenida por cada uno de los nutrientes utilizados.

La implementación del nuevo nutriente al mosto trae consigo nuevas mejoras en la producción de etanol, el nutriente P6 con la concentración 0.2 g/L ha demostrado que con él se puede obtener una mejor eficiencia de fermentación, una mayor riqueza alcohólica un alto número de células y una mejor viabilidad en el medio. Este nuevo nutriente ayudó a que *S. cerevisiae* haya podido mejorar su metabolismo y poder obtener buenos resultados, resultados que se vieron en la buena producción de etanol. Ya que se obtuvo una riqueza alcohólica de 4.1613 °GL, el cual es superior al obtenido con el nutriente 8(sulfato y fosfato de amonio). La riqueza alcohólica que actualmente se obtiene en la fábrica de alcohol de destilería la FE S.A DE C.V es de 3.94 °GL. Por lo que como podemos ver los resultados que se obtienen con el nutriente 7(P6) son superiores a los que actualmente se obtienen con el nutriente 8.

Uno de los factores más importantes que debe de contener este nuevo nutriente es el mayor contenido de nitrógeno, ya que el incremento de nitrógeno en el mosto da como resultados una buena síntesis en la biomasa debido al contenido de nitrógeno en el medio, ya que la proporción de compuestos nitrogenados en células es de aproximadamente 50% (En peso) (Scherens, *et al.* 2006).

11. CONCLUSIONES

Con base a los resultados de los nutrientes evaluados de la marca DIGRA y del nutriente actualmente utilizado en la planta destiladora la FE, se llegó a la conclusión de que es posible implementar un nuevo nutriente que generará una buena producción de alcohol, el nutriente que reflejó mejores resultados en cuanto a la producción de alcohol se refiere fue P6, con la concentración de 0.2 g/L el cual superó los resultados obtenidos del nutriente que actualmente es utilizado en la planta el cual es s/f de amonio. La adición de P6 al mosto generó una mayor concentración de células, las cuales lograron producir 4.1614 °GL, el cual fue la cantidad mayor que se obtuvo al evaluar estos nuevos nutrientes a diferencia del actualmente utilizado que generó 3.94 °GL. La eficiencia de fermentación también se incrementó al utilizar P6, los resultados con P6 fue 90.1285 % y con s/f de amonio se obtuvo 89.011 % es evidente el aumento que se generó de alcohol durante las fermentaciones realizadas por lo que es altamente recomendable adquirir el nutriente P6, el cual generará una mayor producción de alcohol generando mayores ganancias a la industria. A si mismo se reducirá el costo para la adquisición en comparación con los costos de adquisición de s/f de amonio, esta información fue proporcionada de manera verbal por el jefe de fábrica de alcohol.

12. RECOMENDACIONES

- Implementar el nutriente P6 con la concentración de 2 g/L a las fermentaciones producidas en destilaría la FE.
- Evaluar al nutriente P6 a nivel industrial para poder comparar los resultados obtenidos con los resultados que se obtuvieron a nivel laboratorio.
- Realizar la evaluación de P6 utilizando la concentración real de °Brix que actualmente se utiliza en destilaría la fe, la cual es de 36 a 40 °Brix.

13. BIBLIOGRAFÍA

Amerine, M.A. y Ought, C.S. (1969) *Análisis de Vinos y Mostos* Ed. Acribia. Zaragoza. España.

Ariza, B. y González, L. 1997. Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Tesis de pregrado Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Bacteriología. Bogotá. Colombia. 22-27p.

Badii, M.H., J. Castillo, J. Landeros & K. Cortez. 2007h. Papel de la estadística en la investigación científica. *InnOvaciOnes de NegOciOs*. 4(1): 107-145.

Beutler H.O. Ethanol. In *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer, H. U.) Ed. 3rd ed. VCH Publishers (UK) Ltd. Cambridge, 1988; VI: 598-606

Biocombustible Biodiesel-Bioetanol. 2007. I Seminario-Taller Biocombustibles Biodiesel-Bioetanol 2007 Bogotá-Colombia. Virtual Pro.

Bell y Henschke, 2005 S.J. Bell and P.A. Henschke, Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (2005), pp. 242–295

Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 2004, 4, 625-632.

Bely, M., Sablayrolles, J.M. y Barre, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 70: 246-252; 1990.

Boysen JH, Mitchell AP (2006) Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, *ESCRT machinery, and the Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Mol.Biol.Cell* **17**, 1344- 1353.

Brock, T. Madigan, M. (1982). Microbiología Sexta Edición. (M. C. Idalgo & Mandrango, Trad) Printice Hall Hispanoamerica S.A.

Burdon, K. Willians R. (1971). Microbiología. Primera Edición en Español. Mexico, DF. Publicaciones culturales S.A.

Busturia, A. y Lagunas, R. Catabolic inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 379-385; 1986.

Carballo, F. 2000. Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia. España. 20-31p.

Carpenter, P. (1969). Microbiología Segunda Edición. (J. R. Blengio, Trad.) Mexico, DF. Editorial Interamerica, S.A.

Castellanos, C. 1991. Estudio de levaduras de fermentación industrial. Revista Alimentaria. Edición 33. Volumen 7. Noviembre – Diciembre. 18-25p.

Crépin L, Nidelet T, Sanchez I, Dequin S, Camarasa C. Sequential use of nitrogen compounds by yeast during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:8102–11.

FAO/WHO. Codex Alimentarius Volumen 6. Fruit Juices and Related Products. [CD ROM]. Rome: Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 1997.

Foury F, Roganti T (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J.Biol.Chem.* **277**, 24475-24483.

Gamazo, C. López, I. Díaz, R. (2005). Microbiología. Tercera edición. Barcelona España. Masson S.A.

Glover A. 1966. "Determination of molecular weights by Ebulliometry", pp. 1-67 de Mc Lferty, eds, interscience div, Jhon Wiley and Sons, New York, 1966.

Haehn, H. 1991. Bioquímica de las fermentaciones. Editorial Aguilar. España. 42- 48p.

Halasz, A. y Laszlity, R. 1991. Use of Yeast biomass in food production. CRS Press. Boca Raton Ann Arbor. Boston, Estados Unidos. 18-29p.

Henschke, P., 1997. Wine yeast. In: Zimmerman, F.K., Entian, K.D. (Eds.), Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. Lancaster, United Kingdom, pp. 527–560.

Henschke, P. y Jiranek, V. Int. Symp. On Nitrogen in Grapes and Wines; 172-184; 1991.

Henschke, P. y Jiranek, V. Yeast metabolism of nitrogen compounds. Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet G.H. (Eds) 77-165; 1993.

Herdoisa, G. (2001). Biología general de las levaduras.

Hernandez, A. (2008). Microbiología industrial.

Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biotechnol 1999; 12:35–71.

Lehninger, Albert. 1981. Las bases moleculares de la estructura y función celular. p: 409-437 Cadena Agroindustrial. (2004). Etanol: Análisis de Estudio de Cadena Etanol. Nicaragua.

Madigan T., Michael, Martinko M., Jhon, Parker, Jack. Brock. 1994. Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall. Décima edición. p: 957-985

Manual de análisis fisicoquímicos destilería la FE S.A DE CV.

Menegazzo Gómez, J.M (1978). En: Novos Enfoques en Microbiología Enológica. Carrau, J.L.e Cal- egari Basso, R.M. (Eds.). Universidade de Caixas do Sul, Brasil.pp 49

Merck. Manual de Microbiología. 2000. CD Room.

Mossel, D. 2003. Microbiología de los alimentos. Fundamentos Ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (Inocuidad y Calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acirbia. Zaragoza, España. 392-394p.

Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A, Bonifacino JS, Klausner RD (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* **15**, 3515-3523.

Ospina, A. y Palacios, M. 1994. Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A. Tesis pregrado Microbiología. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 23-29p.

Otterstedt, K. Larsson, C. Bill, R. Ståhlberg, A. Boles, E. Hohmann, S y Gustafsson, L. 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. European Molecular Biology Organization. Vol 5 number 5: 532 – 537.

Peisker K. Application of Neuhoff's optimized Coomassie Brilliant Blue G-250/ammonium sulfate/phosphoric acid protein staining to ultrathin polyacrylamide gels on polyester films. Electrophoresis 1988;9:236–8.

Pesce A. y Kaplan L. Química clínica - Métodos. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1990.

Ríos del Risco, Carlos A., Fajardo, Mario, Pérez M., Juan Carlos. 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.

Sablayrolles, J.M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L. y Barre, P. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. J. Ferm. Bioeng. 82: 377-381; 1996.

Scherens B, Feller A, Vierendeels F, Messenguy F, Dubois E. Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. FEMS Yeast Res 2006;6:777–91.

Swan, H. y Karalazos, A. 1990. Las melazas y sus derivados. Revista Tecnología. Geplacea. No. 19. España. 78-82p.

Tellez, D. 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín- Industria de Licores del Valle. Universidad del Valle. Tesis pregrado Bacteriología. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico. Santiago de Cali. Cali, Colombia. 79p.

Tomasso, Mauricio. 2004. Tolerancia de las levaduras al etanol. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Química

Treybal R. A simple methods for batch destilación. Chem. Eng. 77(21), 95 (1970)

Tuite, M. y Oliver, S. 1991. *Saccharomyces*. Editorial Plenum Press. New York, Estados Unidos. 272p.

Van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol.Rev.* **59**, 304-322.

Vázquez H. J, Dacosta. O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería investigación y tecnología VIII. 4. 249-259.2007.

Yopez, Y. 1995. Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Tesis de maestría. 109 Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 34-48p.