

1 9 8 8

Reg. No. 81420033

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



“COMPARACION DE LA PRODUCCION DE ALCOHOL DE  
CUATRO CEPAS DE Saccharomyces cerevisiae”

TESIS PROFESIONAL

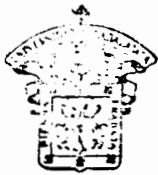
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

LETICIA PINAL ZUAZO

GUADALAJARA, JALISCO 1990



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

Expediente .....  
 Número 1065/89 .....

SRITA. LETICIA PINAL ZUAZO  
 P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "COMPARACION DE LA PRODUCCION DE ALCOHOL DE CUATRO CAPAS DE Saccharomyces cerevisiae" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la Q.F.B. Rosa Ma. Puebla Pérez.



ATENTAMENTE  
 "PIENSA Y TRABAJA"  
 Guadalajara, Jal., Septiembre 8 de 1989  
 EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. La Q.F.B. Rosa Ma. Puebla Pérez, Directora de Tesis.-Pte.  
 c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Guadalajara, Jal: Marzo 30 de 1990

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS C.  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E.

Estimado Ing. Adolfo Espinoza:

Por este medio comunico a usted que la Srita. Leticia Pinal Zuazo, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de la tesis titulada: COMPARACION DE LA PRODUCCION DE ALCOHOL DE CUATRO CEPAS DE Saccharomyces cerevisiae, realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a su consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

M.C. ROSA MARÍA PUEBLA PEREZ.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS GRACIAS

Por permitirme vivir y alcanzar una de mis metas.

A MIS PADRES

Por su comprensión y apoyo constantes.....

Mil gracias.

A MIS HERMANOS

Con cariño.

MI MAS SICERO AGRADECIMIENTO.

Al Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C. al permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones

A la M.C. Ingrid Rodriguez Buenfil por su motivación constante, así como su apoyo y dedicación, al ser la guía para la realización de este trabajo.

A la M.C. Rosa María Puebla Pérez por sus orientaciones y consejos en la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos que de una forma directa o indirecta intervinieron en la elaboración de la tesis, para todos ellos sinceramente..... gracias.

MI MAS SICERO AGRADECIMIENTO.

Al Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C., al permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones

A la M.C. Ingrid Rodriguez Buenfil por su motivación constante, así como su apoyo y dedicación, al ser la guía para la realización de este trabajo.

A la M.C. Rosa María Puebla Pérez por sus orientaciones y consejos en la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos que de una forma directa o indirecta intervinieron en la elaboración de la tesis, para todos ellos sinceramente..... gracias.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN  
EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y  
FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE  
BIOTECNOLOGIA.

CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA  
TECNOLOGIA Y DISEÑO, DEL ESTADO DE  
JALISCO A.C.

CON LA DIRECCION DE LA M.C.

INGRID M. RODRIGUEZ BUENFIL.

## RESUMEN

Se realizó la comparación de cuatro cepas de levadura; *S. cerevisiae* BCGC L-001 (ATCC 834), *S. cerevisiae* BCGC L-002 (ATCC 26 603), *S. cerevisiae* BCGC L-024 así como la levadura de panificación utilizada en el Ingenio "José María Martínez", en cuanto a su producción de alcohol.

La primera fermentación fué a nivel matraz desde la cual se observó que la cepa L-024 tuvo mejores rendimientos, y que la cepa del Ingenio tuvo un rendimiento por debajo de cualquiera de las cepas de catálogo.

Posteriormente se realizó la fermentación a nivel 15 litros en el que se comprobó la superioridad de la cepa L-024.

Finalmente la comprobación a nivel industrial (94 000 L) en el Ingenio confirmó que la cepa L-024 es la mejor mostrando una eficiencia de fermentación de 89% con un rendimiento de 0.45 mientras que la cepa Ingenio tuvo un rendimiento de 0.35 con una eficiencia de 68.5%.



## INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	2
HIPOTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	19
RESULTADOS.....	31
DISCUSIONES.....	38
CONCLUSIONES.....	44
TABLAS.....	45
FIGURAS.....	52
ANEXOS.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	78

## I.- INTRODUCCION

Como en el mundo las reservas de petróleo han bajado, nuevas fuentes de energía deben encontrarse para satisfacer nuestras necesidades, fuentes alternativas de carbón e hidrogeno deben ser encontradas para suplir nuestros requerimientos químicos y energéticos.

Grandes cantidades de biomasa estan disponibles en la mayor parte del mundo y pueden ser usadas como un mecanismo de energía o como materia prima para manufactura química.

El etanol es una alternativa fuente de energía y requiere ser incrementado mejorando el rendimiento de alcohol por fermentación. Puesto que gran cantidad de residuos que contienen hidratos de carbono de precio muy reducido, pueden aprovecharse en la fabricación de alcohol etílico, la vía actual de los procesos de fermentación tiende a crecer.

La producción biológica de etanol usando levaduras fué un importante proceso comercial antes de 1940, cuando la síntesis química a partir de petroquímicos llegó a ser más económica. La reciente disminución de reservas de petróleo ha revivido el interés en el etanol por fermentación siendo actualmente alternativa muy viable para suplir ésta necesidad energética.

## II.- ANTECEDENTES

El alcohol es conocido por el hombre desde hace muchos siglos, tuvo su origen a través de la fermentación natural de los azúcares para la producción de licores y bebidas.(1)

Con el adelanto de la química orgánica en la segunda mitad del siglo XIX, el alcohol se constituyó en un producto químico indispensable como combustible, como solvente, y como materia prima para la producción de una serie de compuestos orgánicos.

La demanda de alcohol se incrementó significativamente durante la Primera Guerra Mundial y ésta necesidad resultó en el inicio de la producción de alcohol sintético, aún cuando en esa época éste tipo de alcohol no podía competir en términos económicos con el alcohol producido por fermentación.(2)

Al finalizar la Segunda Guerra Mundial hubo una merma en la demanda de alcohol, y el alcohol sintético reemplazó al alcohol obtenido por fermentación.(1). Más recientemente con la crisis del petróleo de la década de los 70s y con el consecuente aumento de los precios del etileno, la industria de la producción de alcohol por fermentación tiene hoy en día, un incentivo muy fuerte para su desarrollo y se están construyendo nuevas plantas en diferentes países en todo el mundo.(3)

Para el caso de Latinoamérica y en particular para los países productores de caña de azúcar miembros de GEPLACEA (Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar), el desarrollo de la producción de alcohol con miras a las mas distintas alternativas se presenta como una de las soluciones factibles para soportar la actual crisis que atraviesa la industria azucarera en nuestros países.(1)

En México se han producido un surtido de calidades de alcohol que va desde refinados para usos potables, hasta el utilizado como combustible doméstico. Dentro de la demanda a satisfacer se incluye tambien el consumo para fines sanitarios y para otras ramas de la industria.(4) El total de la industria de la producción de alcohol en el mundo es aproximadamente de 3200 millones de litros, (800 millones de galones al año).(5)

Actualmente la demanda de alcohol es superior a las posibilidades de suministro, por lo que resulta de gran importancia incrementar los niveles de producción a fin de satisfacer dicha demanda.(3,4)

Los procesos empleados en la fabricacion de alcohol etílico por fermentación dependen de la naturaleza de la materia prima y estos pueden ser agrupados en:

- a.- Materias primas azucaradas, que contienen una mezcla de sacarosa, glucosa y fructuosa, como lo son el jugo de caña las mieles y las melazas.

- b.- Materias primas celulósicas, como el bagazo de maderas, los restos de plantas etc.
- c.- Materias primas ricas en almidón, como la yuca, la papa y el maíz.(2)

La melaza y el jugo de caña son comunmente empleados para la fermentación a alcohol por ser disponibles y económicos.(6) En los últimos años se han empleado melazas para la fabricación de etanol, esta materia es el jarabe residual del jugo concentrado de azúcar de caña una vez separados los cristales de azúcar; suelen tener del 48 al 55% de azúcares, especialmente sacarosa,(ver tabla I).

La producción de alcohol en los ingenios se realiza en forma simplificada, mediante el siguiente proceso,(ver figura 1):

Las melazas son diluidas con agua, se ajusta el pH (4.5) con ácido sulfúrico concentrado, posteriormente se realiza la inoculación con Saccharomyces cerevisiae, realizándose así la fermentación. El mosto agotado es pasado posteriormente a un proceso de destilación para así finalmente obtener alcohol.

En todos los procesos de fermentación el éxito depende de la eficiencia del tratamiento preliminar, en caso de haberlo, del empleo de una concentración óptima de azúcar, de un pH y temperatura óptimos, de la adición de sustancias nutritivas al mosto si es que careciera de un constituyente esencial, de la inhibición del

crecimiento bacteriano, del empleo de una variedad fuerte de levadura con alta tolerancia alcohólica y capaz por tanto de producir grandes cantidades de alcohol, del mantenimiento de las condiciones anaeróbicas durante la fermentación y la inmediata destilación del mosto fermentado.(4,7)

Las levaduras son los microorganismos comunmente utilizados para la producción de alcohol, debido a su gran capacidad para fermentar azúcares aunque estas difieren ampliamente en su capacidad de tolerancia y producción de alcohol.

Su contribución al progreso del hombre ha sido basada muy ampliamente en su capacidad para producir una rápida y eficiente conversión de azúcares en alcohol y CO<sub>2</sub>.(8)

También es del conocimiento de la mayoría que el hombre viene sirviéndose de las levaduras desde hace muchos siglos para fermentar zumos de frutas, para esponjar el pan y para hacer sabrosos y nutritivos ciertos productos alimenticios.

Las levaduras son cuantitativa y económicamente el grupo de microorganismos más importantes comercialmente para el hombre. La importancia de estos reside en su aplicación industrial para la obtención de productos útiles, debido a las propiedades fermentativas y oxidantes que desarrollan sobre determinados sustratos.(9)

Las células de levadura de Saccharomyces cerevisiae son por lo regular redondas o elipsoidales, varían considerablemente en

dimensiones, según la especie, nutrición, edad y otros factores. Pueden oscilar de 1 a 9 micras o más de anchura; y de 2 ó más de 20 micras de longitud. Las células esféricas de levaduras industriales tienen un diámetro medio de 4 a 6 micras pero puede haber grandes diferencias aún en un mismo cultivo. (10)

En las levaduras hay dos formas de reproducción la sexual y la asexual. En contraposición a la mayoría de los hongos filamentosos, la reproducción asexual no se efectúa por medio de órganos especialmente formados; la reproducción vegetativa o asexual ocurre en las levaduras por formación de conidios (fisión binaria o fisiparidad) o por combinación de los dos procesos (gemiparidad).

En el proceso de reproducción sexual, todas las levadura "verdaderas" producen ascosporas. (11)

Las levaduras como las bacterias y otras formas de vida requieren ciertos materiales alimenticios para un apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo C, H, O, N, P, K, S, Ca, Fe, y Mg. (10) Las fuentes de carbono que pueden ser utilizadas por la levadura varían grandemente con la especie. La glucosa puede ser utilizada por todas las levaduras, aunque no es necesariamente la más efectiva fuente de carbono para todas las especies. (12,13)

S. cerevisiae tiene la habilidad de fermentar un amplio rango de azúcares por ejemplo sacarosa,

glucosa, fructuosa, galactosa, maltosa; maltotriosa además otras especies como S. diastaticus y S. uvarum (carlsbergensis) pueden utilizar dextrinas y melobiosa respectivamente. (14,15)

Las levaduras son organismos heterotróficos que pueden usar azúcares y una variedad de compuestos orgánicos como fuente de nutrición. De estos compuestos ellas obtienen los esqueletos de carbono necesarios para realizar sus diferentes reacciones de biosíntesis.

Las actividades metabólicas de las levaduras son variadas entre las más importantes se encuentran:

- a.- Metabolismo anaerobio (fermentación alcohólica)
- b.- Metabolismo aerobio (ciclo de Krebs o del ácidotricarboxílico)
- c.- Fenómenos que afectan la capacidad respiratoria de las levaduras: efecto Pasteur y efecto glucosa.

Los azúcares entran a la célula rápidamente a través de la membrana citoplasmática con ayuda de un sistema de transporte común, el cual es mucho más rápido que si fueran transportados por difusión simple. El transporte de estos azúcares es por difusión facilitada.

En cuanto estos azúcares entran a la célula, se fosforila a la respectiva hexosa 6-monofosfato con la ayuda de una enzima común la hexoquinasa y ATP



después la glucosa-6-fosfato es convertida a fructuosa-6-fosfato y otra enzima fosforila esta última en fructuosa 1,6-difosfato con el gasto de una molécula de ATP.

A estas reacciones le siguen una serie de pasos, vía Embden-Meyer-Hof o glicólisis, hasta llegar a dos moles de piruvato con la producción de 4 moles de ATP.

Las dos moléculas de piruvato son descarboxiladas a dos moles de CO<sub>2</sub> y dos de acetaldehído. Por último son reducidos a dos moles de etanol con la ayuda de alcohol deshidrogenasa y coenzima NADH+H, formada anteriormente.

El resultado total de la degradación de una molécula de hexosa son dos moléculas de CO<sub>2</sub> y dos moléculas de etanol con una ganancia neta de dos moles de ATP.

Esta forma de energía (ATP) es usada para suplir los requerimientos energéticos, para el crecimiento celular y la síntesis de productos de almacenamiento (por ejemplo glucógeno y trehalosa). Sin embargo aún en ausencia de crecimiento (como en un medio de glucosa pero sin fuente de nitrógeno), las células de levadura pueden convertir aproximadamente el 70% de la glucosa a CO<sub>2</sub> y etanol en tanto que lo restante es asimilado para producir carbohidratos de almacenamiento. (16)

Suele ser satisfactoria una concentración de azúcar en los mostos de fermentación del 10 al 18%.

Aunque a veces se emplean concentraciones demasiado altas, estas actúan adversamente sobre la levadura, pues el alcohol producido puede inhibir su acción y en consecuencia se prolonga el tiempo de fermentación y puede no transformarse parte del azúcar. Por otra parte el empleo de concentraciones demasiado bajas no resulta económico, ya que origina una pérdida de espacio de fermentación y un aumento en los gastos de obtención de la misma cantidad de alcohol en la destilación posterior.(7)

Aunque las melazas contienen la mayor parte de las sustancias nutritivas necesarias en la fermentación para suplir la posible deficiencia en fósforo o nitrógeno puede añadirse fosfato o sulfato amónico.(7) Ya que la levadura presenta tendencia a utilizar iones de amonio como única fuente de nitrógeno.

Generalmente, es preferible la urea porque provee una fuente fácilmente asimilable de azufre.

El fósforo que es esencialmente para el crecimiento de las células, es suministrado en forma de fosfatos y la concentración de estos controla la síntesis de lípidos y carbohidratos y mantiene la integridad de la membrana.

Las vitaminas regulan el metabolismo de las levaduras, su función es enzimática (las vitaminas son generalmente tanto coenzimas como precursores para la activación enzimática).

Los requerimientos de las vitaminas esenciales para los rangos de fermentación dependen de la cepa, biotina y pantoteno contienen lo esencial para todas las cepas de Saccharomyces. (7,10,11)

Una sustancia promotora del crecimiento que juega un papel importante en el control del rango de fermentación es el inositol. La omisión del inositol en el caldo de la fermentación tiene un efecto más grande que omitir todas las vitaminas excepto biotina con un mínimo requerimiento del orden de 2mg/L.

El inositol es un factor esencial del crecimiento, donde en la forma de fosfatidil inositol juega un papel clave en el mantenimiento de la membrana de la levadura. (7)

La concentración de iones de hidrógeno es un factor significativo en la fermentación industrial, es muy importante en el control de la contaminación bacteriana, en el efecto del crecimiento de la levadura, en los rangos de fermentación y en la formación de subproductos.

Los límites absolutos de pH para el crecimiento de la mayoría de las cepas de S. cerevisiae ha sido reportado de 2.4 a 8.6 con un óptimo para el crecimiento de 4.5.

El pH interno de S. cerevisiae es independiente del pH externo y va en un rango de 3 a 7. (16)

La temperatura es un factor de importancia que se debe considerar. Se inocula el mosto a una

temperatura de 20 a 30 °C dependiendo en cierto modo de la temperatura exterior.

Durante una fermentación aumenta la temperatura del mosto. El empleo de serpentines de refrigeración o bien de chorros de agua sobre las paredes del exterior del depósito ayudan a mantener una temperatura adecuada. A temperatura muy por encima de los 40 °C el alcohol se evapora rápidamente y aumenta el desarrollo bacteriano. (7)

El crecimiento de la levadura mesófila de S. cerevisiae cerca de la temperatura máxima, puede producir un gran número de pequeñas mutantes, causa además desestabilización en la membrana plasmática y una rápida pérdida de la viabilidad celular. (6)

Rita Kar y Viswanathan (1985) compararon la habilidad de tres levaduras termotolerantes para fermentar jugo de caña y melazas a etanol, a una temperatura de 30 a 40 °C, al realizar su estudio ellos observaron que al adaptar estas cepas por diez sucesivas transferencias en ambos medios se obtiene un incremento en los rendimientos de etanol; además comprobaron que estas levaduras termotolerantes tienen mejores rendimientos a bajas concentraciones de azúcar, de cualquier manera ésta desventaja puede ser solucionada sustituyendo a un proceso de fermentación continuo, en el que se mantengan bajas concentraciones de azúcar.

Dos de las cepas dieron adecuados rendimientos de etanol tanto a 30 °C como a 40 °C. Una cepa (Candida tropicalis) fué superior teniendo una

eficiencia de fermentación de 92.6% y 90.4% en jugo de caña, y 98 y 96% en medio de melaza a 30 y 40 °C respectivamente.

El uso de estas cepas en la producción de alcohol por fermentación es una alternativa que solucionaría el problema que presentan las fábricas de alcohol por fermentación en las zonas tropicales y subtropicales, ya que estas levaduras resisten las altas temperaturas de fermentación comunmente alcanzadas en éstas áreas.(6)

Aunque la producción de alcohol no requiere de O<sub>2</sub> en los primeros momentos de la fermentación es necesaria una gran cantidad de éste gas para la reproducción de las células de levadura en condiciones óptimas. Durante la fermentación se desprende CO<sub>2</sub> y se establecen pronto las condiciones anaerobias.

El CO<sub>2</sub> causa inhibición en el crecimiento de la levadura, tanto aeróbicamente como en la fermentación anaeróbica.(7)

Este compuesto influye en la composición y permeabilidad de la membrana resultando algunas enzimas alteradas en su actividad y cambios en la permeabilidad y transporte de solutos.(3,17)

Haraldson A. y Rosen C. G. (1982) estudiaron además de otros factores, la influencia de la tensión de oxígeno en el rendimiento de etanol y crecimiento celular en dos diferentes cepas de levadura una es Saccharomyces cerevisiae y la otra Schizosaccharomyces pombe.

Como se esperaba el rendimiento de etanol mostró un declinamiento constante cuando se incrementó la tensión de oxígeno.

Las levaduras crecen cuando se incrementa el  $O_2$  arriba de 1000 partes por millon (ppm), para una fermentación continua es suficiente 50 partes por millon de  $O_2$ . En contraste de S. cerevisiae con Schiz. pombe es que presenta una disminución del crecimiento a una tensión de oxígeno arriba de 1000 partes por millon.

Fué realizada una comparación de la formación de productos por las dos cepas empleadas en éste estudio, durante una fermentación continua, bajo similares condiciones pero a una escala más grande que la descrita por Cook en 1980. Como se puede observar en la tabla II hay una formación menor de productos por parte de Schiz. pombe comparada con Sacch. cerevisiae.(18)

Al cabo de 50 h o menos la fermentación suele estar terminada, despues de la fermentación el mosto se denomina vino o mosto fermentado y se tiene una composición muy variable siendo sus principales componentes el agua y el etanol.(3)

Las melazas fermentadas se destilan en un alambique continuo para separar el alcohol y otros componentes volátiles. El alcohol se purifica en columnas de rectificación y se almacena.

Se han realizado innumerables investigaciones con el fin de mejorar el rendimiento de alcohol, una de ellas es la realizada por Suresh et al en

1987, al hacer un muestreo de siete levaduras de cerveza, identificando dos cepas de Saccharomyces cerevisiae, caracterizandolas como productora lenta y rápida de etanol. Para ambas cepas se determinaron en el período de crecimiento exponencial los niveles de cuatro enzimas clave: invertasa, piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH), y aldehído deshidrogenasa (ADD). Los niveles de PDC y ADH fueron más bajos, y el nivel de ADD, más bajo en la cepa fermentadora lenta.

Ellos concluyeron que las razones por el incremento en las actividades específicas de la invertasa, PDC, ADH y ADD durante los estados más rápidos de la fermentación no son bien conocidos y necesitan mayor examinación.(15)

Por otra parte Mancilha I. M. et al (1984) realizaron experimentos con 64 cepas de levadura que fueron evaluados por su producción de etanol, en la fermentación de un medio que contenía un 10% del total de azúcar de jugo de sorgo. La producción de alcohol fué muy variada desde 0.12 a 5% (w/v).

La eficiencia de la conversión de azúcar (ECA) varía de 13.79 a 99.20 de las 64 cepas probadas en medio con 10% de azúcar, 20 de ellas mostraron una eficiencia en la conversión de azúcares más grande del 90% como se puede apreciar en la tabla III.

En general todas las cepas mostraron una buena eficiencia de conversión de azúcar; así los resultados indican que el jugo de sorgo puede ser utilizado para mejorar los rendimientos de alcohol.(19)

Se han realizado experimentos para acelerar la velocidad de producción de alcohol tal es el caso de Patil y Patil (1985) que utilizaron diferentes tipos de carbohidratos, principalmente polisacáridos para estudiar su efecto en la producción de alcohol a partir de melazas de caña en una fermentación en lote usando una cepa de levadura industrial, Saccharomyces cerevisiae NCIM y Saccharomyces uvarum NCIM 3509. Observaron un marcado incremento en la velocidad de producción de etanol en la presencia de polisacáridos como quitina, xilano y goma de acacia a una concentración de 0.2%.

La quitina un producto de desecho y un material barato que produce 6 - 6.9% (w/v) de etanol después de aproximadamente 30 h a 30 °C en melazas que contienen 18% de azúcares reductores comparada con otras fermentaciones a las que no se les adiciona quitina, reduce el tiempo de fermentación y puede disminuir el costo de la producción de etanol.(20)

Otro estudio realizado con la velocidad de fermentación fué el de Saita et al (1984) en el que al llevar a cabo una fermentación de D-Glucosa y maltosa en un medio definido, con una cepa de S. cerevisiae NCYC 1108, observaron que la velocidad de glicólisis no estaba relacionada con  $NH_4$  intracelular, pero las fermentaciones que se llevaron a cabo adicionándole  $NH_4$  aumentaba la velocidad de esta y no porque el amonio activara las enzimas glicolíticas sino que sirve de sustrato para la síntesis de proteínas.(21,22)



Por su parte Domberk e Ingram (1986) realizaron un estudio para conocer la aparente toxicidad del etanol formado durante una fermentación utilizando una cepa de levadura S. cerevisiae. Observaron que el declinamiento en la velocidad de la fermentación que empieza a bajas concentraciones de alcohol no es causada por la presencia de etanol, por crecimiento en presencia de etanol o por muerte celular.

La conclusión a la que pudieron llegar es que está relacionado en parte con una deficiencia de magnesio aunque también están involucrados otros factores. La adición de magnesio a fermentaciones en lote prolonga el crecimiento exponencial, permitiendo una acumulación más grande de células sin afectar la viabilidad celular; además las células crecidas en medios suplementados con magnesio mantienen velocidades más altas de fermentación. (23)

Es evidente que el consumo creciente y las limitaciones para incrementar el volumen de mieles destinado a esta producción justifican el desarrollo de las investigaciones que permiten elevar la eficiencia de la industria alcohólica.

Por lo general la producción de alcohol en los ingenios se realiza siguiendo esquemas de fermentación con bajos rendimientos y con cepas de levadura que la mayoría de las veces no tienen buenos rendimientos y tienen bajas productividades.

Son muchos los problemas que afectan la producción de alcohol en los ingenios pero entre las más importantes podemos definir las siguientes:

- 1.- La formulación inadecuada del medio de crecimiento y de fermentación.
- 2.- El empleo de una cepa de levadura con bajas productividades de etanol.
- 3.- Un sistema de fermentación inadecuado (involucrando sistemas de fermentación no apropiados , inoculos no activos, y contaminación microbiana.
- 4.- Procesos de fermentación con bajas productividades.
- 5.- Destilación con bajas eficiencias y con equipos deficientes.
- 6.- Almacenamiento inadecuado.

De estos problemas el que se pretende atacar es el segundo punto mediante la comparación de cuatro cepas para así seleccionar la que presente más alta productividad de etanol, siendo esto una parte del proyecto "Optimización de la producción de alcohol en los ingenios de caña de azúcar". (CONACYT PI22CCOT884225).

Realizado en el CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.).

### III.- HIPOTESIS.

Al menos una de las levaduras del banco de cepas presentará mayores rendimientos en cuanto a producción de alcohol, en comparación a la levadura utilizada en el ingenio.

### IV.- OBJETIVOS.

#### OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo, es comparar tres cepas de catálogo obtenidas en un banco de cepas, contra la cepa de panificación usada en el ingenio "José María Martínez", y seleccionar la que resulte con mejores rendimientos en cuanto a su producción de alcohol para su prueba en el ingenio.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Estandarización de métodos analíticos.
- 2.- Estandarización del inóculo.
- 3.- Realizar una fermentación a nivel matraz de las cepas.
- 4.- Realizar una fermentación de la cepa del ingenio y la cepa seleccionada a nivel 15 litros.
- 5.- Comparación a nivel industrial de la cepa del ingenio y la cepa seleccionada.

## V.- MATERIALES Y METODOS.

### MICROORGANISMOS:

Los microorganismos utilizados fueron los siguientes:

S. cerevisiae BCGC L-001, (CINVESTAV L-533, ATCC 834). Levadura de champagne. Productora de etanol a partir de suero de leche. (Biotechnol Bioeng. 19:1017 - 1035, 1977)

S. cerevisiae BCGC L-002, (CINVESTAV L-534, ATCC 26 603). Alta productora de etanol a partir de melazas. (J. Appl. Bact. 35: 499 - 503, 1977)

S. cerevisiae BCGC L-024, productora de etanol a partir de melaza

S. cerevisiae levadura de panificación proporcionada por el ingenio José María Martínez de Tala Jalisco.

### REACTIVOS:

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y obtenidos de fuentes comerciales conocidas.

## EQUIPO:

Espectrofotómetro Perkin - Elmer 559A UV/VIS, baño de temperatura constante Buchi 011, balanza analítica Chyo Jupiter SDT 200, balanza granataria Chyo Jp - 5000, balanza granataria Mettler Pc 4400, estufa de alta temperatura Felisa, potenciómetro Orp Test Kit Cole Palmer, potenciómetro pH 103 Corning, agitador magnético Felisa, autoclave Infra, estufa de incubación Felisa, estufa incubadora Presicion, microscopio compuesto One Ten American Optical, campana de flujo laminar, centrífuga Sol - bat, centrífuga Ependorf 5414, hematocitómetro American Optical, micropipetas Gilson, orbital rotatorio New - Brunswik.

## TECNICAS:

1.- Técnica de azul de metileno para conteo directo de células.

Los reactivos utilizados son:

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| a.- Azul de metileno | 10 g/l |
| b.- Citrato de Na    | 50 g/l |

## Procedimiento:

En un matraz aforado de 50 ml, poner 5 ml de muestra, 2.5 de azul de metileno y aforar con agua destilada.

Tomar con una micropipeta de 20  $\mu$ l una muestra y con ayuda de la cámara de Newbawer, contar la población total, ésta técnica nos permite conocer la

viabilidad ya que la pared celular de las levaduras muertas absorbe el colorante y de esta forma es fácil identificar las células muertas de las vivas.

## 2.- Técnica para determinar los azúcares totales por medio del método de fenol-sulfúrico.

Los reactivos utilizados en esta técnica son:

- a.- Acido sulfúrico concentrado
- b.- Fenol al 5%

Procedimiento:

A 1 ml de la solución problema se le adiciona 1ml de fenol al 5%, en seguida se agregan 5ml de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de la hidrólisis. Se deja enfriar durante 5 min. a temperatura ambiente, se agita y enseguida se pone a baño de agua fría durante 10 minutos.

Finalmente se lee absorbancia a 490 nm. (24)

## 3.- Técnica para determinar los azúcares reductores libres por medio del método DNS (Acido dinitrosalicílico).

Los reactivos utilizados en ésta técnica son:

- a.- NaOH 10 g/l
- b.- 3,5 Dinitrosalicílico 10 g/l

- c.- Tartrato de Na y K                    200 g/l
- d.- Metabisulfito de Na                0.5 g/l
- e.- Fenol                                    2 g/l

Mezclar uno a uno y aforar en matraz de 1000 ml.

Procedimiento:

A 0.5 ml de muestra se adicionan 1.5 ml de solución de DNS, se agita, y se pone en baño maría a punto de ebullición durante 10 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente, se agregan 8 ml de agua destilada y se agita.

Leer absorbancia a 550 nm. (25,26,27)

4.- Técnica para determinación de etanol por dicromato de potasio.

Los reactivos utilizados son:

- a.- Dicromato de potasio  $K_2CrO_7$                     33.768 g/l
- b.- Acido sulfúrico                     $H_2SO_4$                     325 ml

Se diluye el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 ml de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200ml de agua destilada; y se afora en matraz a 1000 ml.

## Procedimiento:

A 1 ml de muestra se le agregan 2 ml de solución de dicromato y se agita, se deja reposar durante 10 minutos y posteriormente se agregan 5ml de agua destilada, para finalmente agitar. Leer absorbancia a 585 nm.(28)

### 5.- Técnica para determinación de peso seco.

La muestra se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos, el sedimento se resuspende en agua destilada y se centrifuga dos veces más a las mismas condiciones.

Finalmente se resuspende el paquete celular, se depositan en pesa filtros, que han sido previamente puestos a peso constante y se colocan en una estufa a 80 °C hasta evaporar completamente el agua (aproximadamente 8 h), y obtener las células secas.

El peso seco se determina por la diferencia de pesos entre le pesa filtro con muestra seca y pesa filtro a peso constante, dividido entre el volumen inicial de muestra, y multiplicado por 1000, para reportarlo como g de células/l.



## METODOLOGIA

### 1.- Estandarización de métodos analíticos.

#### 1.1.- Curva de calibración para determinación de azúcares totales.

Se realizó una curva de calibración para determinar azúcares totales por medio del método Fenol-Sulfúrico, usando una solución patrón de sacarosa a una concentración de 0.1 g/l.

El rango de concentraciones a probar fué de 0.01 a 0.1 g/l de sacarosa para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal, que prediga la cantidad de azúcares totales presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

#### 1.2.- Curva de calibración para determinación de azúcares reductores libres.

Se realizó una curva de calibración para determinar los azúcares reductores libres por medio de la técnica de DNS usando una solución patrón de dextrosa anhidra a una concentración de 1 g/l el rango de concentraciones a probar fué de .1 a 1 g/l, para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de azúcares reductores libres presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

### 1.3.- Curva de calibración para determinación de etanol.

Se realizó una curva de calibración para determinación de etanol por medio de la técnica de Dicromato de Potasio, usando una solución patrón de etanol de 20 g/l. El rango de concentraciones a probar fue de 2 a 20 g/l para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de alcohol presente en una muestra a partir de una absorbancia dada.

## 2.- Estandarización del inóculo.

### 2.1.- Determinación de la población y porcentaje de viabilidad de las cepas en medio sólido y líquido.

Se determinó población total y porcentaje de viabilidad a las cuatro cepas a diferentes tiempos de incubación con el fin de determinar su tiempo más adecuado de crecimiento.

#### 2.1.1.- Crecimiento en tubos con agar inclinado.

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento y proliferación de las cepas utilizadas, consistió de melaza a 21 \*°Bx enriquecida con sales de sulfato de amonio 1.31 g/l, fosfato de amonio 0.24 g/l y fosfato de calcio 0.12 g/l, agar 35%, a diferencia del medio de fermentación el cual consistía únicamente en melazas diluidas con agua.

\*°Bx: porcentaje de sólidos totales presentes en una muestra

Se sembraron por estriás, varios tubos para cada una de las cepas, a partir de un cultivo de un tubo de conservación de estas cepas crecidas en el mismo medio. Se incubaron por un período de 54 h, sacando muestras a diferentes tiempos de crecimiento, para realizar el conteo de la población total y el porcentaje de viabilidad. La suspensión celular se preparó adicionando a cada tubo crecido, 5 ml de solución fisiológica estéril.

La población celular se determinó por contéo directo al microscopio en la cámara de Newbawer y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno.

#### 2.1.2.- Crecimiento en medio líquido.

Se inocularon matraces de 500 ml, conteniendo 180 ml de medio de melaza con 20 ml de la suspensión celular de cada una de las cepas probadas, la suspensión celular se preparó añadiendo 5 ml de solución salina etéril a tubos crecidos en el tiempo determinado como óptimo para cada cepa, inoculando matraces diferentes para cada una de ellas.

El crecimiento en medio líquido se determinó por peso seco debido a la propiedad de floculación que presentaban algunas cepas, haciendo ésto difícil la cuenta al microscopio; se obtuvo la curva de crecimiento sacando muestras cada 2 h durante 12 h, determinandoles a éstas peso seco y porcentaje de viabilidad.

### 3.- Fermentación de las cepas a nivel matraz.

Se inocularon matraces erlenmeyer de 500 ml conteniendo 180ml de medio de melaza a 23 oBx (sin nutrientes), con 20 ml de inóculo estandarizado de cada una de las cepas. El inóculo procedía de dos propagaciones consecutivas a partir de una resuspensión realizada de la manera ya descrita. Se incubaron estáticamente a 35 °C y se sacaron muestras a diferentes tiempos a las cuales se les determinó: azúcares totales y concentración de alcohol.

Se determinó la velocidad de producción de alcohol mediante un análisis de regresión a la región lineal de la curva de producción de alcohol, cuya pendiente correspondió a la velocidad expresada como g de alcohol/l.h.

También se calculó el rendimiento de fermentación en base a la producción de alcohol y al consumo de azúcares. (ver anexo 1)

### 4.- Fermentación a nivel 15 litros.

En base a los resultados obtenidos de las fermentaciones anteriores, se eligió una cepa como la mayor productora de alcohol y se comparó con la del ingenio a nivel 15 litros.

Propagación: las cepas se sembraron en tubos con agar inclinado y se incubaron a 30 °C. Posteriormente se inoculó un matraz erlenmeyer de

500 ml conteniendo 180 ml de medio de melaza a 21 °Bx más nutrientes y se incubó a 30 °C a 300 rpm, posteriormente se inocularon dos matraces erlenmeyer de 2 litros conteniendo cada uno 800 ml de medio de melaza más nutrientes a 21 °Bx, los cuales se incubaron a las mismas condiciones que el anterior. Con estos matraces se inoculó un botellón conteniendo 13.5 l de medio con 1.5 l de inóculo.

Fermentación: se realizó a 35 °C en forma estática, se siguió durante 12 h y se muestreo cada hora durante las primeras 6 y posteriormente cada 2 horas. A los muestreos se les determinó: azúcares totales y etanol.

El procedimiento de propagación fué similar para ambas cepas así como el de fermentación.

Se calculó la velocidad de producción de alcohol y el rendimiento de producto en base al sustrato para cada una de las cepas. (ver anexo)

#### 5.- Comparación a nivel industrial de la cepa del ingenio y la cepa seleccionada.

La propagación de la cepa seleccionada se realizó de la manera ya descrita (mediante pases consecutivos), hasta llegar a un volumen de 30 l, la incubación fué a 30 °C durante 8 h, posteriormente fueron transportados al ingenio de Tala Jalisco.

El inóculo se siguió propagando en el ingenio en tambos de 200 l poniendo 100 l de mosto 21 °Bx

adicionado de nutrientes (urea 0.3 g/l, fosfato monocálcico 0.24 g/l y diamónico 0.24 g/l) con aproximadamente 30 l de inóculo el cual tenía una población de  $210 \times 10^6$  cel/ml con el 100% de viabilidad; después de 8 h de crecimiento se transfirió el volúmen a cuatro tambos de 200 l teniendo cada una aproximadamente 150 l de mosto más nutrientes y 33 l de inóculo, después de 7 h de crecimiento se transfirieron los cuatro tambos a una tina de propagación, quedando con 1 700 l de mosto fresco y 800 l de inóculo.

Este inóculo se estuvo creciendo por 6.5 h después de lo cuál se completo el volúmen a 5 000 l lo que significa que se adicionaron 2 500 l de mosto fresco. El crecimiento fué por 4.5 h después de lo cuál se llenó el tanque nuevamente con mosto fresco hasta un volúmen total de 7 700 l en donde el crecimiento fué por 6.5 h.

El volúmen total de inóculo adicionado a la tina de fermentación fué igual a 21 600 l y de mosto fresco fué de 72 450 l lo que hizo un volúmen total final de 94 000 l.

La propagación de la cepa del ingenio se hizo de manera similar a la de la cepa seleccionada a partir del crecimiento en la tina de propagación. El volumen de inóculo adicionado a la tina de fermentación fué igual a 17 800 l y de mosto fresco fué de 75 450 l lo cuál hace un volúmen total en la tina de 93 250 l.

Se siguió el desarrollo de las dos tinas de fermentación, una con la cepa del ingenio y la otra con la cepa seleccionada.

Se sacaron muestras cada hora durante las primeras 8 horas y posteriormente cada 2 h; a estas muestras se les determinó población total, °Bx, concentración de etanol (°GL y g/l) y azúcares totales y reductores.

Se calculó el rendimiento del producto en base al sustrato, la eficiencia de fermentación, la velocidad de producción de alcohol y la productividad total. (ver anexo 1)

## VI.- RESULTADOS.

### 1.- ESTANDARIZACION DE METODOS ANALITICOS.

Las curvas de calibración usadas para la determinación de azúcares reductores totales y libres, así como etanol, se muestran en las figuras 2, 3 y 4 respectivamente.

La ecuación hallada para la curva de calibración de azúcares reductores totales es  $Y = -7.163625 \times 10^{-3} + 7.813636(X)$  y es aplicable en los rangos de absorbancia de 0.08 a 0.69 que corresponderían a una concentración de 0.01 y 0.09 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión 0.99956 para 10 puntos.

En el caso de los azúcares reductores libres la ecuación hallada fué  $Y = -4.6613 \times 10^{-2} + 0.7211364(X)$  siendo aplicable dentro de los rangos de absorbancia de 0.02 a 0.68 que correspondería a una concentración de 0.1 y 1.0 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.9953 para 10 puntos.

Para la determinación de etanol la ecuación encontrada fué  $Y = 7.690917 \times 10^{-3} + 4.82445 \times 10^{-2}(X)$  aplicable para los rangos de absorbancia de 0.10 a 0.85 que corresponde a 2 y 18 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.9988 para 10 puntos.



## 2.- ESTANDARIZACION DE INOCULO.

### a.- Medio sólido.

En la figura 5a se observa el crecimiento y el porcentaje de viabilidad para la cepa Ingenio durante 50 h como se puede apreciar no presenta fase de adaptación, empezando su fase logarítmica en las primeras horas para llegar a la estacionaria a las 24 h alcanzando una población máxima de  $115 \times 10^6$  cel/ml manteniendo una viabilidad de 100%, sin embargo en la figura 5b se observa que la fase logarítmica continúa después de las 24 h hasta las 40 h alcanzando una población del 90%.

Para la cepa BCGC L-001 se muestra en la figura 6a el crecimiento y porcentaje de viabilidad durante 48 h en medio sólido, como se puede observar el crecimiento logarítmico de la levadura termina a las 30 horas, alcanzando la máxima población de  $115 \times 10^6$  cel/ml a las 40 horas con una viabilidad del 90%, mientras que en otra cinética de crecimiento representada en la figura 6b se observa que su fase exponencial sobrepasa a las 30 horas permaneciendo en esta fase hasta las 36 h con una viabilidad muy aceptable.

En la figura 7a tenemos el crecimiento celular y el porcentaje de viabilidad para la cepa BCGC L-002. Como se observa su fase de adaptación es corta con una fase logarítmica que empieza a las 10 h y termina a las 25 h que es cuando alcanza su

máxima población de  $525 \times 10^6$  cel/ml con una viabilidad del 100%; en la figura 7b se puede comparar el crecimiento de esta misma cepa en la que se observa una fase de adaptación larga y cuya fase logarítmica no termina aún a las 32 h. alcanzando una población de  $650 \times 10^6$  cel/ml hasta esta hora con una viabilidad de 90%.

En cuanto a la cepa BCGC L-024 se muestra en la figura 8a el crecimiento celular y el porcentaje de viabilidad durante 48 h en medio sólido, presentando una fase logarítmica muy corta que empieza a las 25 h y termina a las 30 h alcanzando entonces la población máxima con una viabilidad del 90%; mientras que en la figura 8b se observa un comportamiento similar, su fase logarítmica es corta alcanzando una población máxima de  $450 \times 10^6$  cel/ml con una viabilidad del 100%, empezando su fase estacionaria a las 32 horas.

#### b.- Medio líquido.

En la figura 9 tenemos el crecimineto en peso seco y porcentaje de viabilidad para la cepa Ingenio, como se aprecia, su fase logarítmica empieza a las 4 h con una duración de 6 h alcanzando al término de ésta la población máxima que fué de 12.0 g/l de células con una viabilidad del 100%.

Para la cepa BCGC L-001 nos muestra la figura 10 el crecimiento en peso seco (g/l) y el porcentaje de viabilidad iniciando con una población de 1.8 g/l de células y en la que su fase

estacionaria empieza en un tiempo muy corto de 8 h con una población de 7.5 g/l, alcanzando su población máxima de 7.8 g/l a las 10 h con una viabilidad de 90%.

La figura 11 nos muestra el crecimiento en peso seco (g/l de célula) y el porcentaje de viabilidad de la cepa L-002, dando inicio su fase logarítmica a las 4 h con una población de 4 g/l de células para alcanzar su población más alta de 12.0 g/l a las 10 h con una viabilidad del 100%, tiempo en el que termina esta fase.

En cuanto a la cepa L-002 el crecimiento en peso seco y el porcentaje de viabilidad, se muestra en la figura 12 en la que podemos observar una fase logarítmica con duración de 4 h que termina a las 8 h con una población de 12.0 g/l de células y una viabilidad del 100% alcanzando su máxima población a las 10 h con un crecimiento de 12.2 g/l de células.

### 3.- FERMENTACION A NIVEL MATRAZ.

La figura 13 nos muestra el consumo de azúcares reductores totales así como el alcohol producido por la cepa utilizada en el Ingenio, en una fermentación a nivel matraz; como se puede observar hay un consumo constante de azúcares mientras la producción de alcohol se va incrementando hasta 17.8 g/l a las 6 h y a partir de lo cual tiende a estabilizarse, habiendo consumido un finalmente 60% de sus azúcares.

En la figura 14 se aprecia el consumo de azúcares reductores totales así como el alcohol producido en una fermentación a nivel matraz de la cepa BCGC L-001, como se observa los azúcares disminuyen paulatinamente alcanzando un valor final de 97.59 g/l, (lo que representa un consumo de 40% de los azúcares) y el alcohol producido alcanza su máximo valor de 18.0 g/l a las 12 h.

Para la cepa BCGC L-002, se muestra en la figura 15 el consumo de azúcares totales así como el alcohol producido en una fermentación a nivel matraz; como se aprecia la fermentación inició con un contenido de azúcares reductores totales de 153.4 g/l quedando finalmente 90.0 g/l a las 10 hrs. mientras que la producción de alcohol se estabiliza a este tiempo alcanzando una concentración de 17.19 g/l, con un consumo final del 60% de los azúcares totales.

La figura 16 nos muestra el consumo de azúcares totales y el alcohol producido por la cepa BCGC L-024 durante una fermentación a nivel matraz; como podemos observar la producción de alcohol se estabiliza a las 5 horas alcanzando una concentración de 17.3 g/l y habiendo consumido tan solo el 50% de los azúcares del medio.

En la tabla IV se compara el rendimiento del producto en base al sustrato ( $Y_{p/s}$ ), la eficiencia de fermentación así como la velocidad de esta. Como se puede observar las tres cepas de catálogo alcanzarán valores más altos en cuanto a rendimiento y eficiencia respecto a la cepa utilizada en el Ingenio.

Mientras que la levadura del ingenio tuvo un rendimiento de 0.173 y una eficiencia de 34%, las levaduras de catálogo alcanzaron un rendimiento de 0.243, 0.266 y 0.5 así como una eficiencia de 48%, 58% y 98% para las cepas L-001, L-002 y L-024 respectivamente; siendo la velocidad de fermentación más alta de 2.96 g/l para la cepa L-024.

#### 4.- FERMENTACION A NIVEL 15 LITROS.

Para la fermentación a nivel 15 litros las figuras 17 y 18 nos muestran el consumo de azúcares reductores totales y la producción de alcohol para las cepas Ingenio y L-024 respectivamente; como podemos observar la cepa utilizada en el Ingenio necesitó de 24 h para alcanzar una concentración de alcohol de 23.72 g/l mientras que la cepa BCGC L-024 a las 12 h tenía ya una concentración similar alcanzando finalmente una concentración de 27.79 g/l a las 24 horas, habiendo consumido tan solo un 50% de los azúcares existentes en el medio.

La tabla V nos muestra la comparación de estas dos cepas en cuanto a eficiencia, rendimiento ( $Y_p/s$ ) y velocidad de fermentación.

## 5.- FERMENTACION EN EL INGENIO

En las figuras 19 y 20 tenemos los parámetros de °Bx y °rados Gay - Lussac para las cepas L-024 e Ingenio respectivamente, a nivel industrial (94 000 l).

Como podemos observar la cepa Ingenio alcanzó 6.6 °GL, bajando los °Bx hasta 13.6 a las 20 h que fue cuando se estabilizó su producción de alcohol; mientras que la cepa L-024 tubo una reducción a 12.8 °Bx alcanzando 7.6 °GL como producción final de alcohol.

Por otra parte en la figura 21 para la cepa L-024 y la figura 22 para la del Ingenio nos muestra el consumo de azúcares reductores totales y directos así como la producción de alcohol en g/l, como podemos ver en la cepa Ingenio hubo un consumo constante de azúcares hasta las 22 h que fué cuando se alcanzó la máxima producción de alcohol 53.33 g/l, mientras que en la cepa L-024 a las 22 h se seguían consumiendo azúcares alcanzando hasta entonces 60.5 g/l de etanol.

La comparación de estas dos cepas en cuanto al (Yp/s) eficiencia de fermentación y productividad a nivel industrial se puede observar en la tabla VI donde se comprueba que la cepa L-024 alcanzó una eficiencia de 89% y una productividad de 2.63 g/l h comparativamente más altos que los alcanzados por la cepa Ingenio que fueron de 68.65 y 2.5 de eficiencia de fermentación y productividad respectivamente.

## VII.- DISCUSION

### 1.- Estandarización de Métodos analíticos.

Debido a que los coeficientes de regresión fueron altos de .99956, .9953 y .9988 para las curvas de azúcares reductores totales, azúcares reductores libres y etanol respectivamente; se pudo concluir que si existe una correlación entre la concentración y la absorbancia para las determinaciones de azúcares totales y reductores así como etanol.

Por lo tanto la ecuación hallada para cada uno de los casos es confiable para predecir la concentración a partir de una absorbancia dada.

### 2.- Estandarización de inóculo.

Con el propósito de conocer la fase de crecimiento así como la viabilidad, que reflejan el estado fisiológico de la levadura, se optó por realizar su estandarización en cuanto a estos parámetros se refiere para conocer el tiempo en que la célula está en óptimas condiciones. En primer lugar se realizó la estandarización en medio sólido.

En las cinéticas de la cepa Ingenio inicialmente se observó la estabilización de su crecimiento exponencial a las 20 h pero con los posteriores ensayos se pudo ver que a las 36 está todavía en su fase logarítmica de crecimiento con

la población más alta alcanzada de  $170 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad del 98% motivo por el cual se eligió el tiempo de 36 h como el más adecuado.

Para la cepa L-001 los resultados obtenidos inicialmente mostraron que el término de la fase logarítmica fue a las 30 h con una población de  $115 \times 10^6$  cel/ml con una viabilidad del 90% mientras que en otras curvas de crecimiento se observa que la levadura a las 36 h está todavía en su fase exponencial con una viabilidad del 85% por lo cual se tomó el tiempo de 36 h como el apropiado ya que de esta forma la levadura al ser inoculada en el medio líquido está en una fase de crecimiento en la que es más fácil adaptarse al cambio de medio.

En cuanto a la cepa L-002 se refiere se realizó una cinética durante 40 h tomando muestras cada 5 h en la cual se observó que la levadura llega a su fase exponencial a las 30 h con una población de  $550 \times 10^6$  cel/ml; con el fin de tener un conocimiento más real de la célula se realizaron algunas otras cinéticas pero ahora con muestreos cada 2 h y en estos se pudo observar que a las 32 h la levadura está todavía en su fase logarítmica con una población de  $650 \times 10^6$  cel/ml y con una viabilidad del 90% por lo tanto se decidió tomar el tiempo de 32 h como el adecuado.

Para la cepa L-024 se realizaron cinéticas con muestreos cada 5 h durante periodos de 50 y 40 h en las cuales se observó que su fase estacionaria empieza a las 30 h; pero ya sobre la marcha en la experimentación pudimos comprobar que si se modificaba el tiempo de 30 h de crecimiento por el



32 h se obtenían poblaciones más altas y con viabilidades muy aceptables, por lo que se decidió tomar éste como el tiempo óptimo.

Una vez realizada la estandarización en medio sólido se procedió a estandarizar el inóculo en medio líquido; en este caso para determinar el crecimiento celular se empleó la técnica de peso seco debido a la propiedad de floculación que presentan algunas de las cepas.

A este nivel de propagación los resultados obtenidos fueron más uniformes, las tres cepas de catálogo presentaron un tiempo óptimo de crecimiento de 8 h ya que por ejemplo la L-001 a las 8 h llega al término de su fase logarítmica con una viabilidad del 100% y con una población de 7.5 g/l. Por otra parte la L-002 llega al final de su fase logarítmica a las 8 h con una población de 13.8 g/l y una viabilidad del 100%. La L-024 al igual que las otras llega al final de su fase logarítmica a las 8 h y con una población de 11.8 g/l.

En las tres cepas sucedió el caso de que en su fase estacionaria había un ligero incremento de población alrededor de las 10 ó 12 h pero con disminución de la viabilidad, sin embargo se tomó el tiempo de 8 h debido a que la cepa está terminando apenas su fase logarítmica y está en mejores condiciones que después de haber transcurrido dos o tres horas de su fase estacionaria.

La cepa Ingenio alcanza su máxima población a las 10 h tiempo en el que termina su fase exponencial, mostrando una disminución inmediata en su población celular lo que hizo pensar en tomar un tiempo en el que la levadura estuviera todavía en su fase logarítmica de crecimiento por lo que se decidió que 8 h era un tiempo adecuado también para esta cepa.

### 3.- Fermentación a nivel matraz.

Una vez estandarizado el inóculo en medio sólido y líquido se realizó la comparación preliminar, de las cuatro cepas, con las fermentaciones a nivel matraz; ya que en caso de haber diferencia en cuanto a eficiencia de fermentación sería muy notorio aún a este nivel, como posteriormente se pudo comprobar.

Al comparar los resultados obtenidos del rendimiento y eficiencia de fermentación pudimos descartar dos de las cepas de catálogo la L-001 que fué la que presentó menor ( $Y_p/s$ ), eficiencia y velocidades de fermentación, así como la cepa L-002 que mostró valores más altos que la L-001 pero más bajos que la L-024 cuyo rendimiento fué de 0.5, con una eficiencia del 98% y una velocidad de 2.96 g/l de etanol; mientras que la cepa utilizada por el ingenio presentó un rendimiento de 0.173 y una eficiencia de 34% valores más bajos que cualquiera de las cepas de catálogo.

Por lo que se eligió la cepa L-024 para compararla con la del ingenio a nivel 15 litros y comprobar que la cepa de catálogo tiene una mayor eficiencia.

#### 4.- Fermentación a nivel 15 litros.

De la fermentación a nivel matraz se pasó a nivel 15 litros, debido a que en este nivel las condiciones de la fermentación no son tan diferentes a las del Ingenio como lo es a nivel matraz, principalmente por que el volumen utilizado en el matraz es de 200 ml mientras que el empleado en el Ingenio es de 94 000 litros, además las condiciones de fermentación en un matraz pueden ser controladas y más constantes que a nivel industrial, por lo tanto los resultados obtenidos a nivel 15 l, son más reales y similares a los obtenidos a nivel industrial.

La cinética a nivel garrafón (15 l), comprobó como se esperaba los resultados obtenidos de la fermentación a nivel matraz. Nuevamente la cepa L-024 obtuvo los mejores resultados: rendimiento de 0.46, la eficiencia del 90% con una velocidad de fermentación de 3.15 g/l.h de etanol, mientras que la cepa del ingenio presentó una velocidad más baja de 1.4 g/l.h con  $Y(p/s)$  de 0.32 y con una eficiencia del 63%.

#### 5.- Fermentación a nivel Industrial.

Una vez realizada la fermentación a nivel 15 litros se pasó directamente a nivel industrial 94 000 litros el resultado de esta fermentación mostró clara justificación para sustituir la cepa ingenio

por la L-024 que al igual que a nivel 15 litros fué la que presentó mejores rendimientos, obteniendo resultados muy similares a los de este nivel.

La cepa utilizada por el Ingenio tuvo un rendimiento de 0.35 con una eficiencia del 68.8% y una productividad de 2.5 g/l.h, por su parte la cepa de catálogo L-024 alcanzó valores más altos, el rendimiento de esta levadura fué de 0.45, una eficiencia de 89% (20% más alto que el de la cepa Ingenio) y con una productividad de 2.63 g/l.h.

## VIII.- CONCLUSIONES.

- 1.- El tiempo adecuado de crecimiento en medio sólido fué de 32 horas para la cepa Ingenio y L-001, y de 36 h para las cepas L-002 y L-024.
- 2.- El tiempo adecuado de crecimiento en medio líquido fué de 8 h para las cuatro cepas probadas.
- 3.- La fermentación a nivel matraz mostró una clara diferencia entre las cepas, la levadura L-024 resultó ser la mejor ya que presentó la eficiencia y Yp/s más alto de todas las cepas comparadas.
- 4.- A nivel industrial se comprobó nuevamente la superioridad de la levadura L-024 donde obtuvo una eficiencia de 89% a las condiciones del Ingenio.
- 5.- Debido a la gran diferencia que existe entre la cepa de catálogo L-024 y la cepa del Ingenio, se aconseja a este la utilización de la cepa L-024 ya que esto implicaría un aumento del 20.2% en la eficiencia del Ingenio.
- 6.- Algunos ingenios emplean cepas de levadura inadecuada muchas veces levadura de panificación (como en este caso) que no tienen los mismos rendimientos que las levaduras propias para producir alcohol, perdiendo de esta manera utilidades que podrían ser muy altas; lo cual podría solucionarse empleando levaduras de éste tipo que tienen altas eficiencias de fermentación.

T A B L A 1

COMPOSICION DE LAS MELAZAS DE CAÑA DE AZUCAR.	
CONSTITUYENTE	%
Agua	20
Constituyentes orgánicos:	
Sacarosa	32
Glucosa	14
Fructosa	16
No azúcares: materiales nitrogenados, ácidos libres y combinados; sustancias gomosas solubles.	10

Fuente: Honing, P. (29)

T A B L A II

CONCENTRACION DE PRODUCTOS DE UNA DESTILACION PRIMARIA.

PRODUCTO mg/ml	<u>S. cerevisiae</u>	<u>Schizo. pombe</u>
Metanol	20	15
Acetaldeido	620	200
N-propanol	235	165
1-butano	380	-
Amyloalcohol opticamente act.	125	-
1-amylalcohol	480	-
Diacetil	14	6

Amyloalcohol opticamente activo (amyloalcohol opticamente act.)

Fuente: Haraldson A. y Rosen. (18)

T A B L A 111

PRODUCCION DE ETANOL POR DOS CEPAS DE LEVADURA QUE TIENEN UNA EFICIENCIA EN CONVERSION DE AZUCARES (ECA) VALUADA EN 90% A PARTIR DE UNA FERMENTACION QUE CONTIENE 10% DE AZUCAR TOTAL.

CEPA	CLAVE	ETANOL % (W/V)	ECA (%)
<i>S. burlardi</i>	Z 1904	5.00	99.20
<i>S. carlsbergensis</i>	1Z 210	4.95	98.21
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 299	4.83	96.83
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 301	4.86	96.42
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 4126	4.85	96.22
<i>S. cerevisiae</i>	NRRL Y 604	4.84	96.03
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 3	4.82	95.63
<i>S. carlsbergensis</i>	YMLP 44	4.80	95.63
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 1716	4.79	95.03
<i>S. carlsbergensis</i>	1Z 1430	4.79	95.03
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 765	4.74	94.04
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 987	4.74	94.04
<i>S. carlsbergensis</i>	1Z 628	4.73	93.84
<i>S. carlsbergensis</i>	1Z 1834	4.66	92.46
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 864	4.66	92.45
<i>S. cerevisiae</i>	NRRL Y 2034	4.58	92.45
<i>S. cerevisiae</i>	NRRL Y 129	4.55	90.27
<i>S. cerevisiae</i>	1Z 629	4.54	90.07
Sacch. spp.	NRRL Y 897	4.54	90.07
<i>S. uvarum</i>	NRRL Y 1347	4.54	90.07

Fuente: Mancilha I. M. (19)



Tabla IV

COMPARACION DE LAS CEPAS PROBADAS EN UNA FERMENTACION A NIVEL MATRAZ.

CEPA	Y p/s	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	VELOCIDAD DE FERMENTACION (g/l.h)
1-002	$\frac{17.19 - 3.22}{14.34 - 90.84} = 0.266$	52	1.512
1-024	$\frac{17.06 - 3.51}{124.32 - 97.59} = 0.50$	98	2.96
1-001	$\frac{17.13 - 3.28}{158.69 - 101.70} = 0.243$	48	1.38
INGENIO	$\frac{17.17 - 3.53}{163.1 - 84.38} = 0.173$	34	2.13

p/s (Rendimiento del producto en base al sustrato).

TABLA V

COMPARACION DE LA CEPA L-024 Y LA CEPA DEL INGENIO A NIVEL 15 LTS.

CEPA	Yp/s	EFICIENCIA DE FERMENTACION (%)	VELOCIDAD DE FERMENTACION (g/l.h)
L-024	$\frac{27.79 - 1.89}{113.75 - 57.2} = 0.46$	90	3.156
INGENIO	$\frac{23.72 - 1.7}{101.7 - 32.09} = 0.32$	63	1.4

Yp/s (Rendimiento del producto en base al sustrato).

TABLA VI

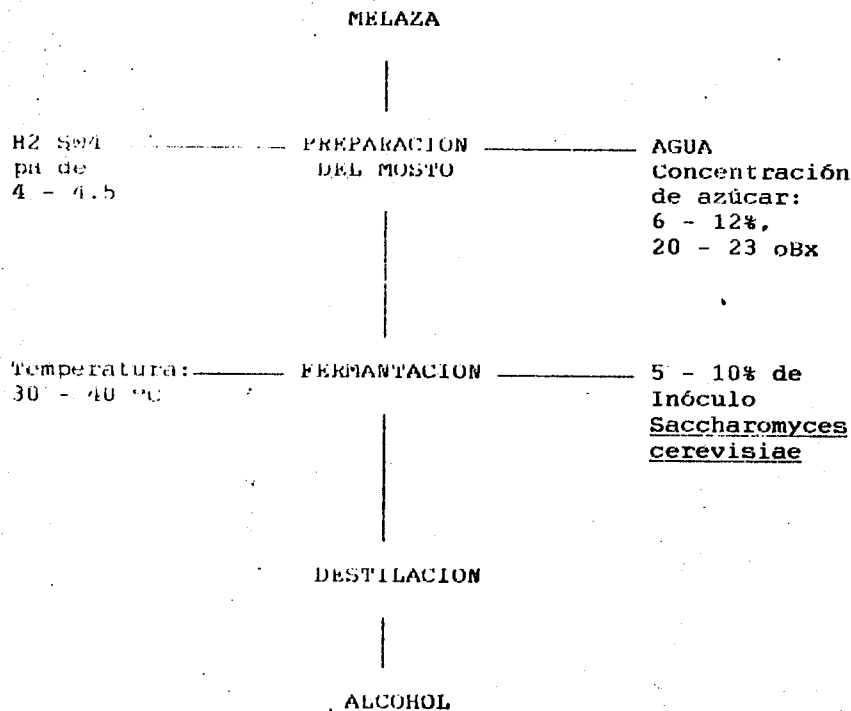
COMPARACION DE LA CEPA L-024 Y LA CEPA DEL INGENIO  
A NIVEL DE PLANTA INDUSTRIAL

CEPA	Yp/s	EFICIENCIA DE FERMENTACION ( % )	PRODUCTIVIDAD ( g/l.h )
INGENIO	$\frac{57.33 - 2.83}{181.6 - 27.1} = 0.35$	68.6	2.5
L-024	$\frac{60.5 - 3.21}{161.62 - 35.03} = 0.45$	89	2.63

Y p/s (rendimiento del producto en base al sustrato).

F I G U R A I

ESQUEMA GENERAL DE LA PRODUCCION DE ALCOHOL



°Bx: porcentaje de sólidos totales presentes en una muestra.

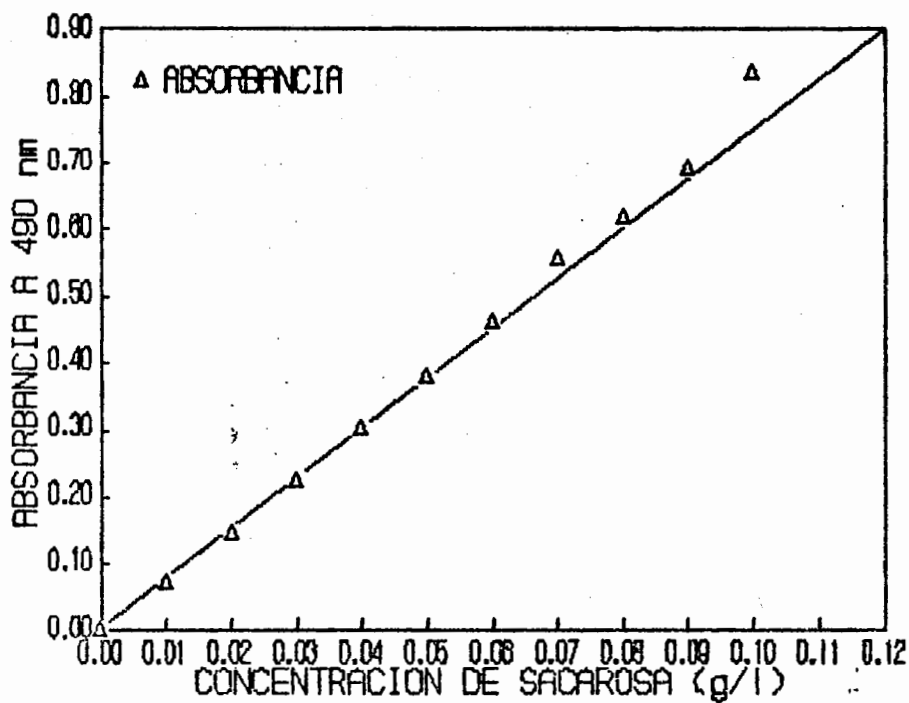


Fig. 2. Curva de calibración para determinación de azúcares totales por el método de Fenol - Sulfúrico.

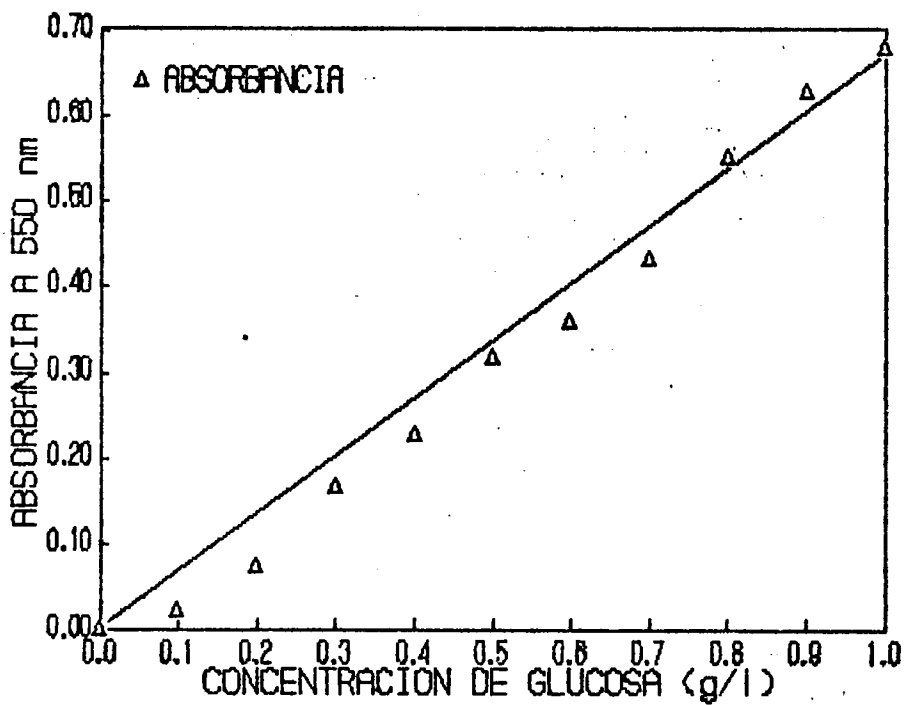


Fig. 3. Curva de callibración para la determinación de azúcares reductores libres por el método de DNS.

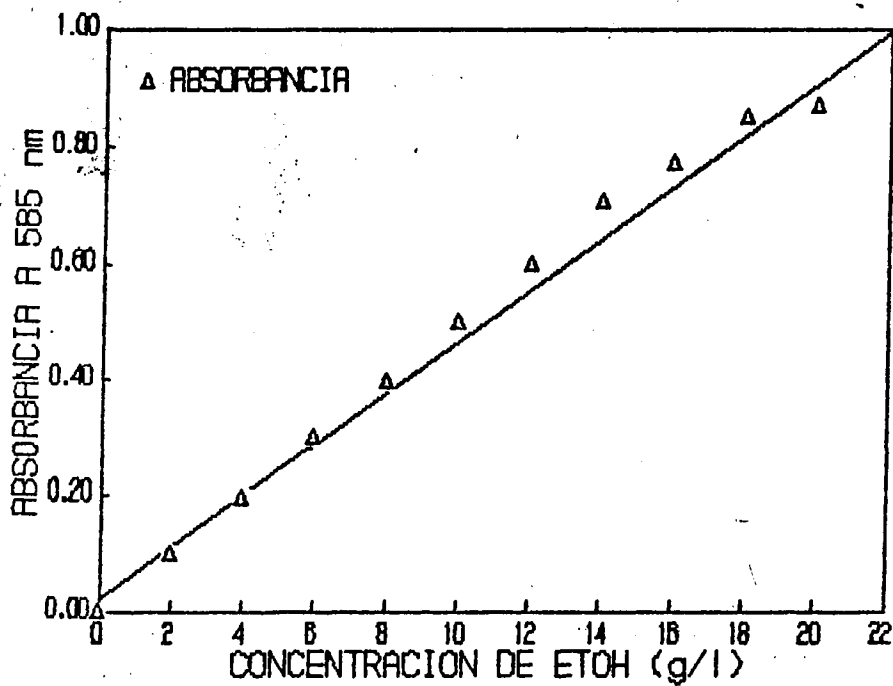


Fig. 4. Curva de calibración para la determinación de etanol por medio de la técnica de Dicromato de Potasio.

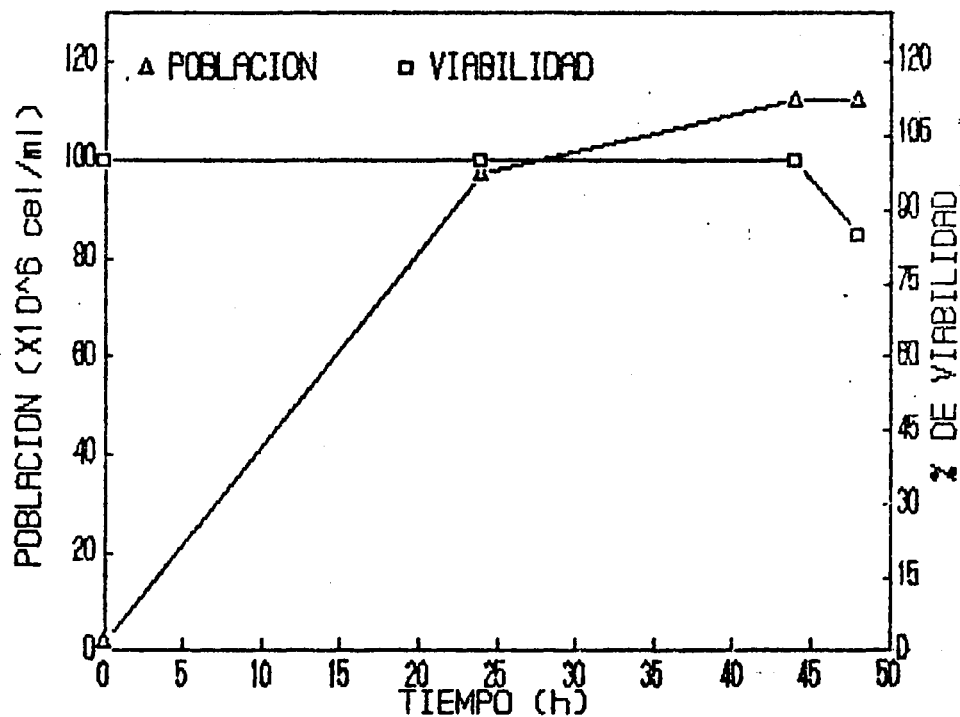


Fig. 5a. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa Ingenio, durante 50 horas en medio sólido.



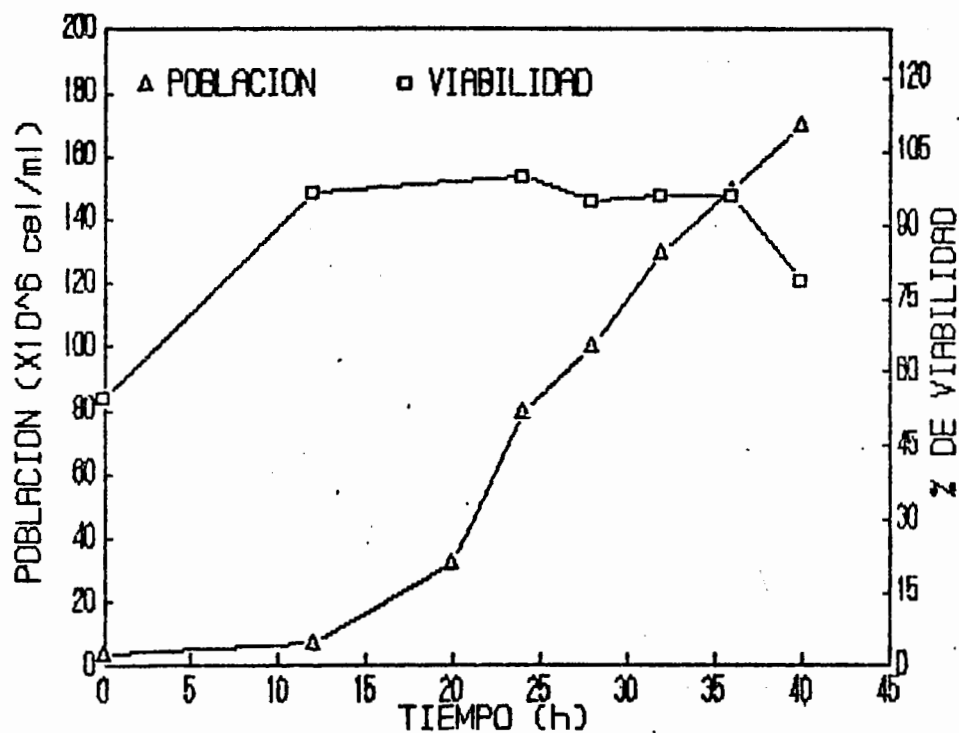


Fig. 5b. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad para la cepa Ingenio, durante 40 horas en medio sólido.

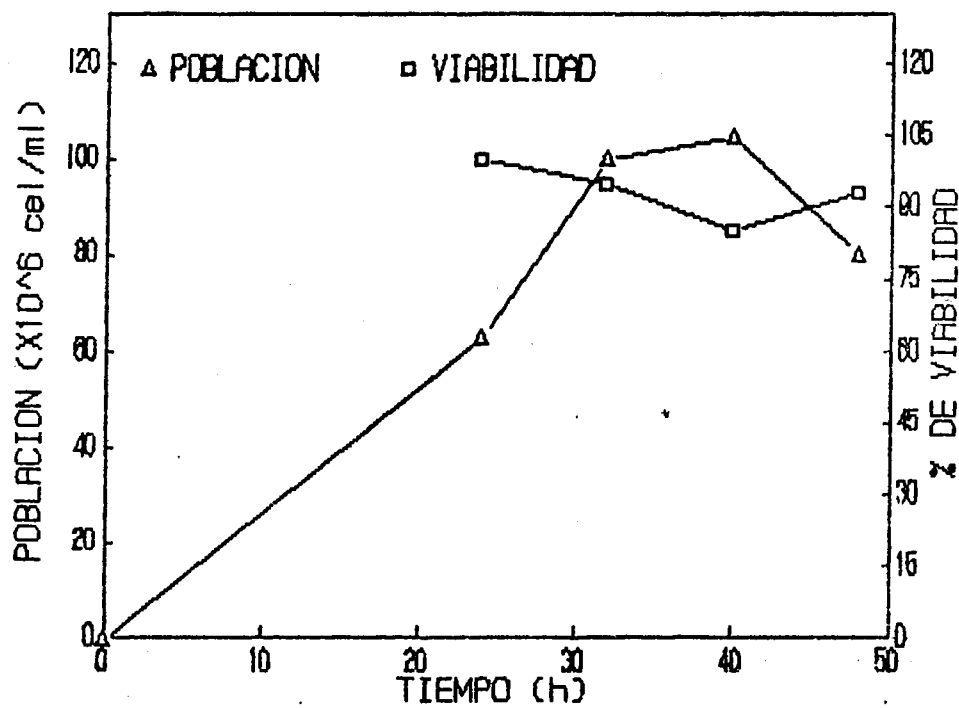


Fig. 6a. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-001, durante 48 horas en medio sólido.

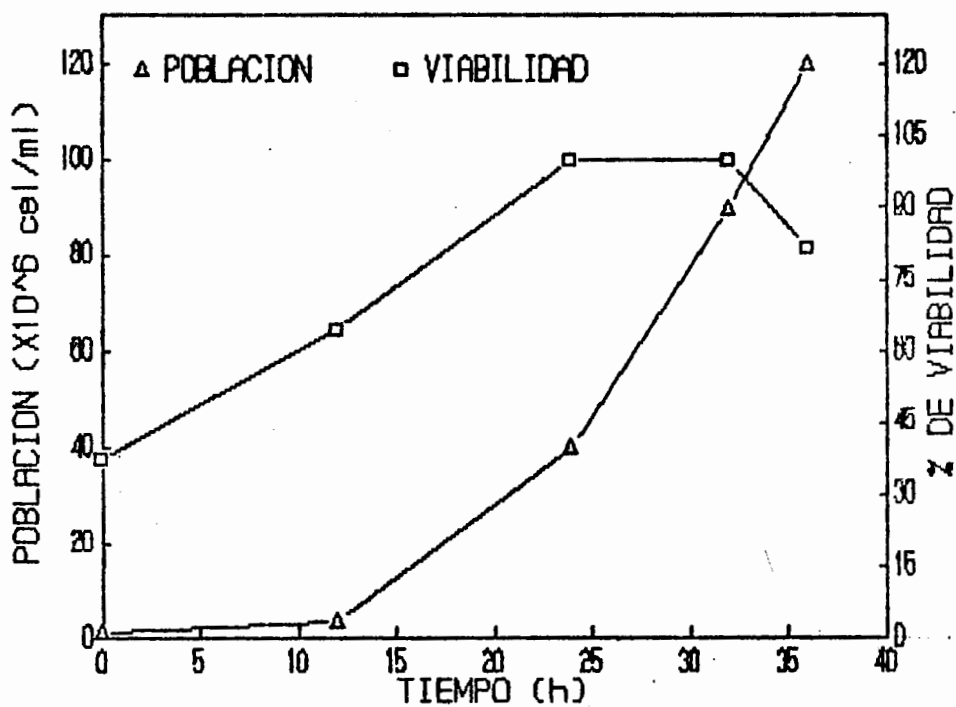


Fig. 6b. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-001, durante 40 horas en medio sólido.

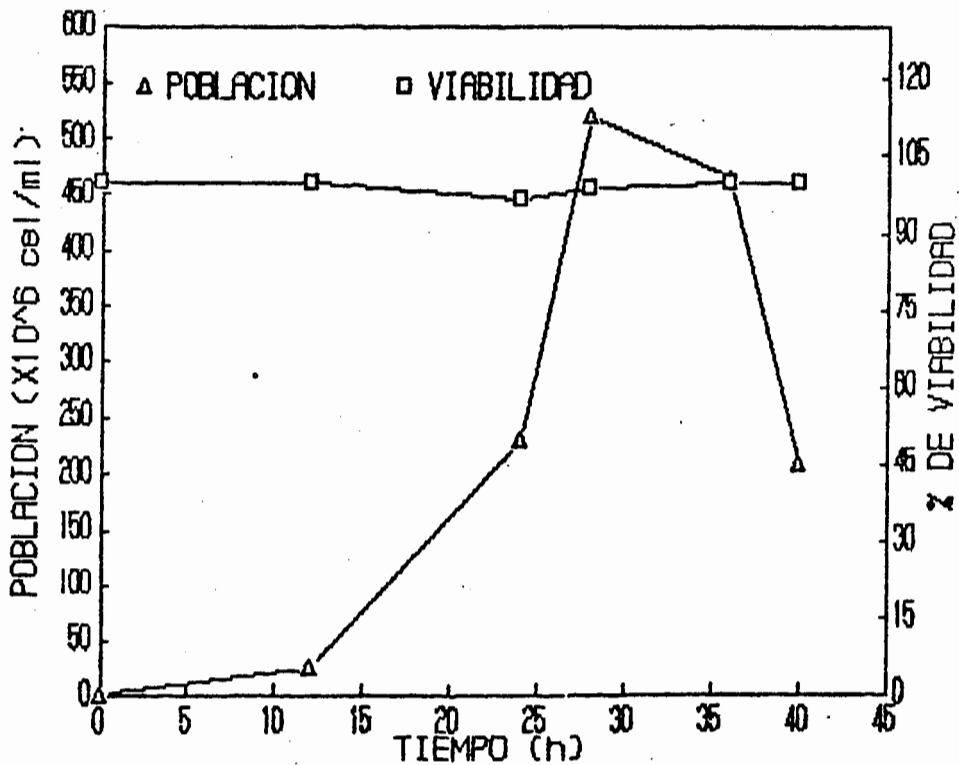


Fig. 7a. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-002, durante 40 horas en medio sólido.

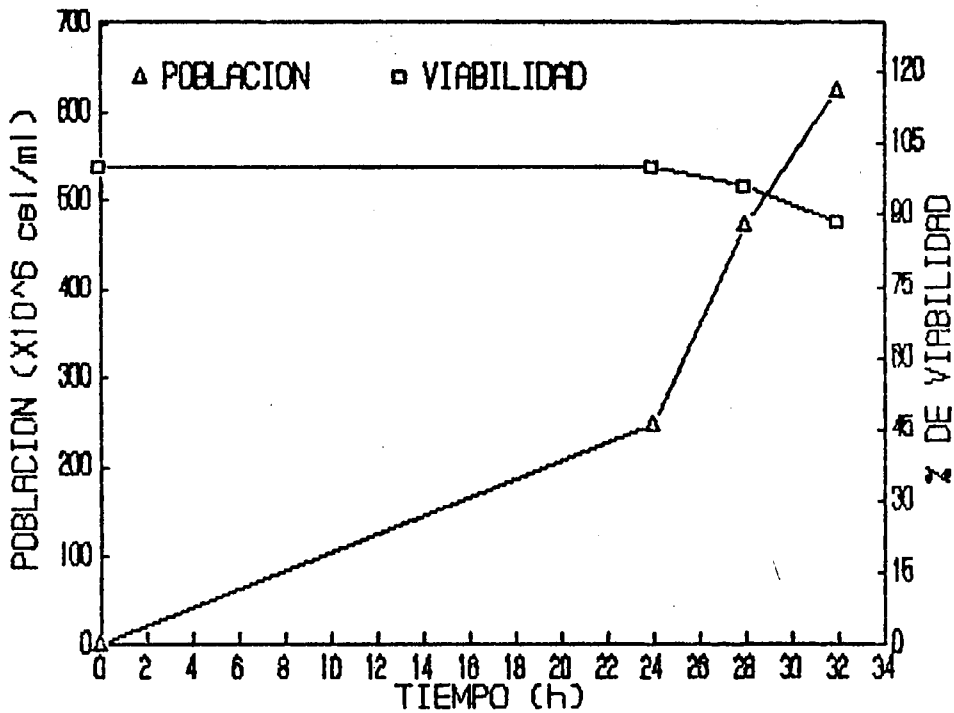


Fig. 7b. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-002, durante 32 horas en medio sólido.

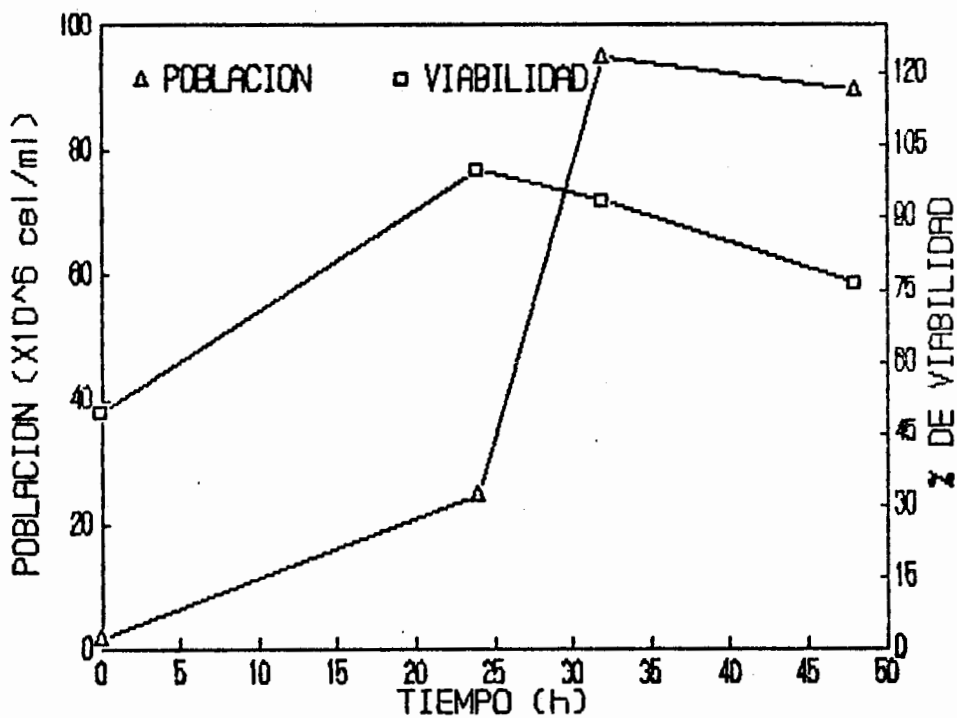


Fig. 8a. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-024, durante 48 horas en medio sólido.

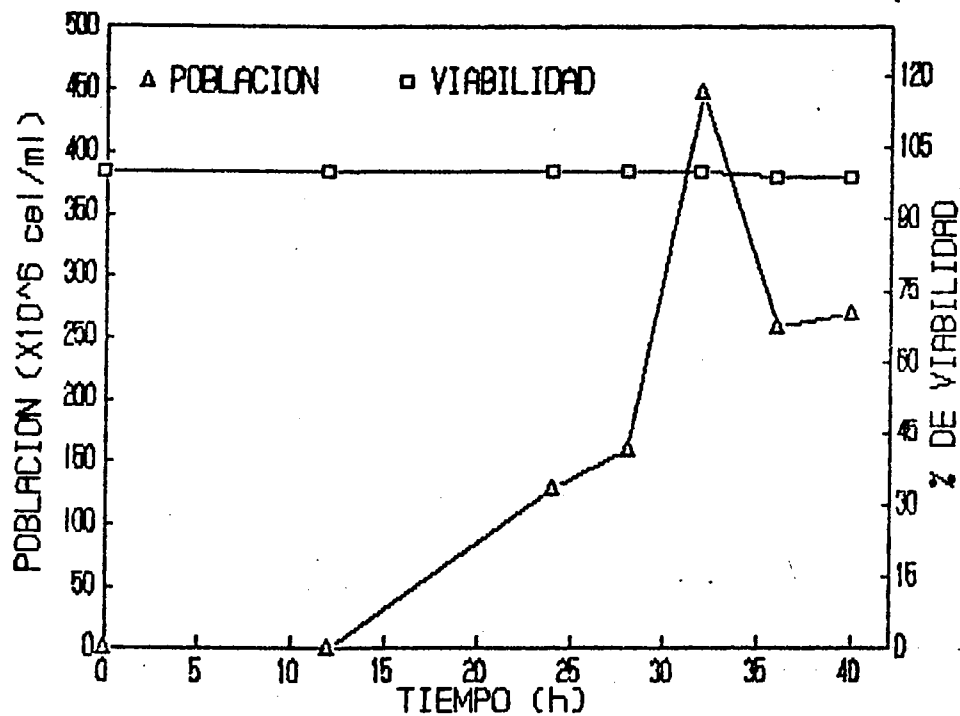


Fig. 8b Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-024, durante 40 horas en medio sólido.

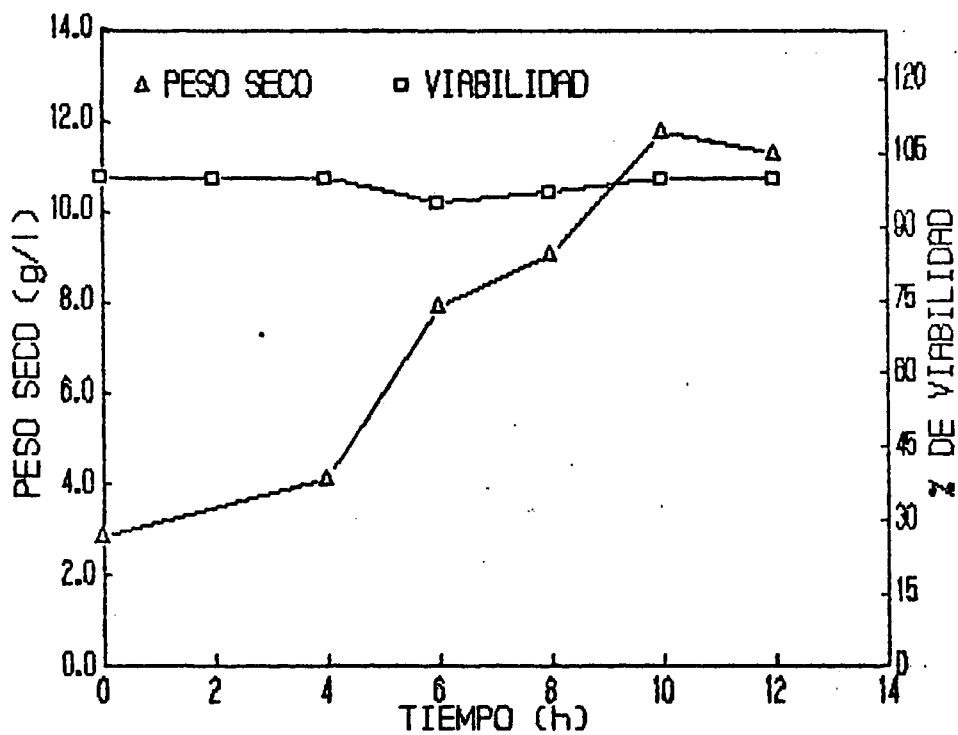


Fig. 9. Población celular y porcentaje de viabilidad de la cepa Ingenio, en medio lípido durante 12 horas.



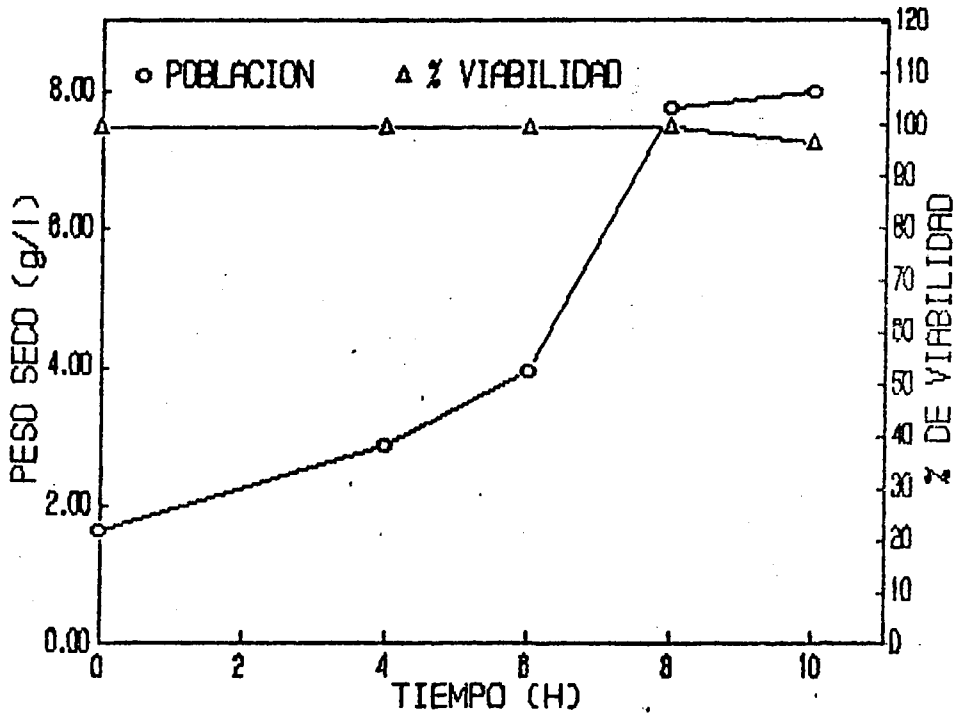
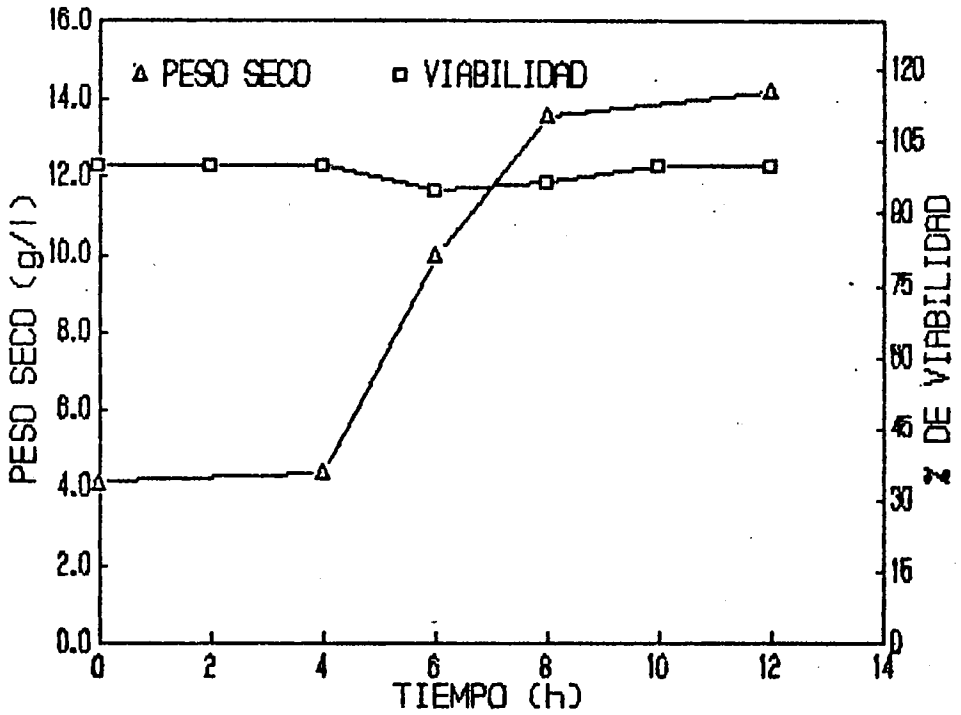


Fig. 10. Población celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-002, durante 10 horas en medio líquido.



ig. 11. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-002 en medio líquido durante 12 hora

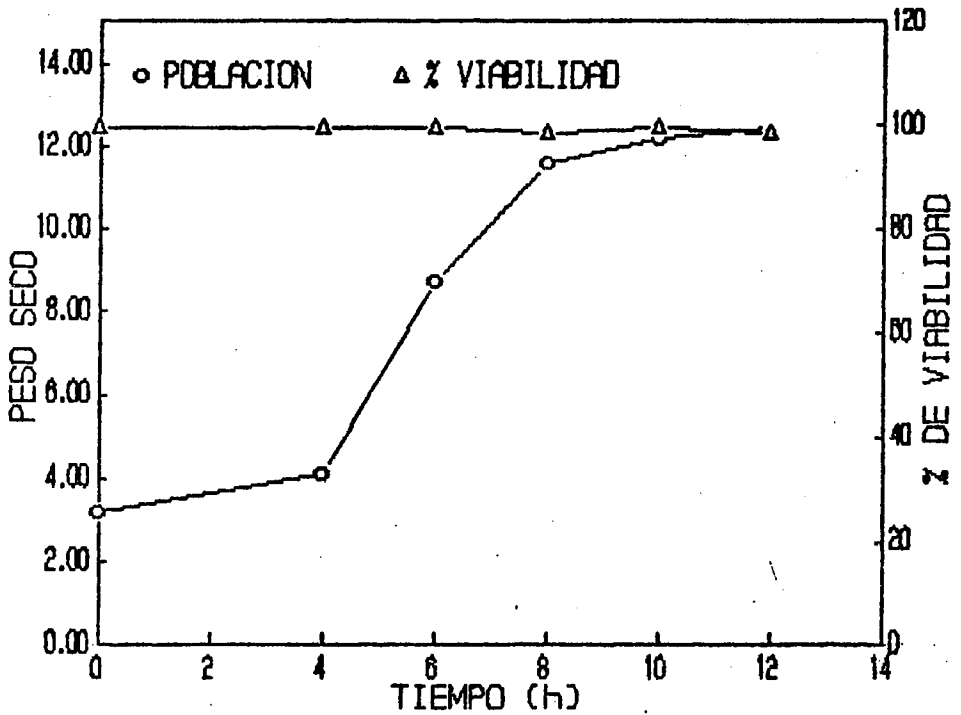


Fig. 12. Población celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCG L-024 en medio líquido, durante 12 horas.

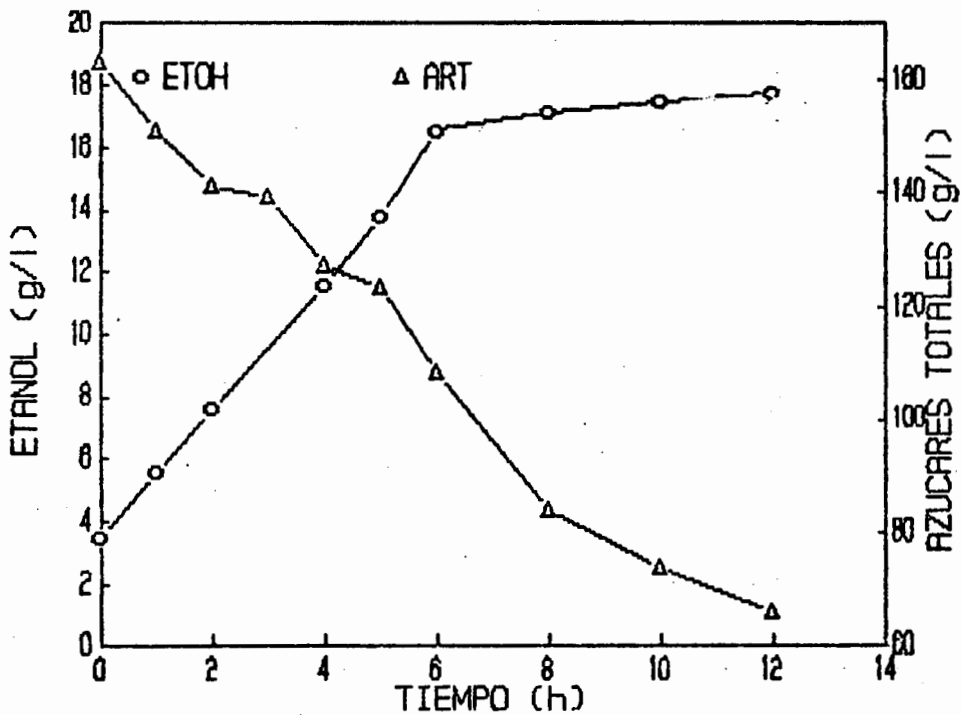


Fig. 13. Consumo de azúcares reductores totales y producción de alcohol por la cepa utilizada en el Ingenio durante una fermentación a nivel matraz.

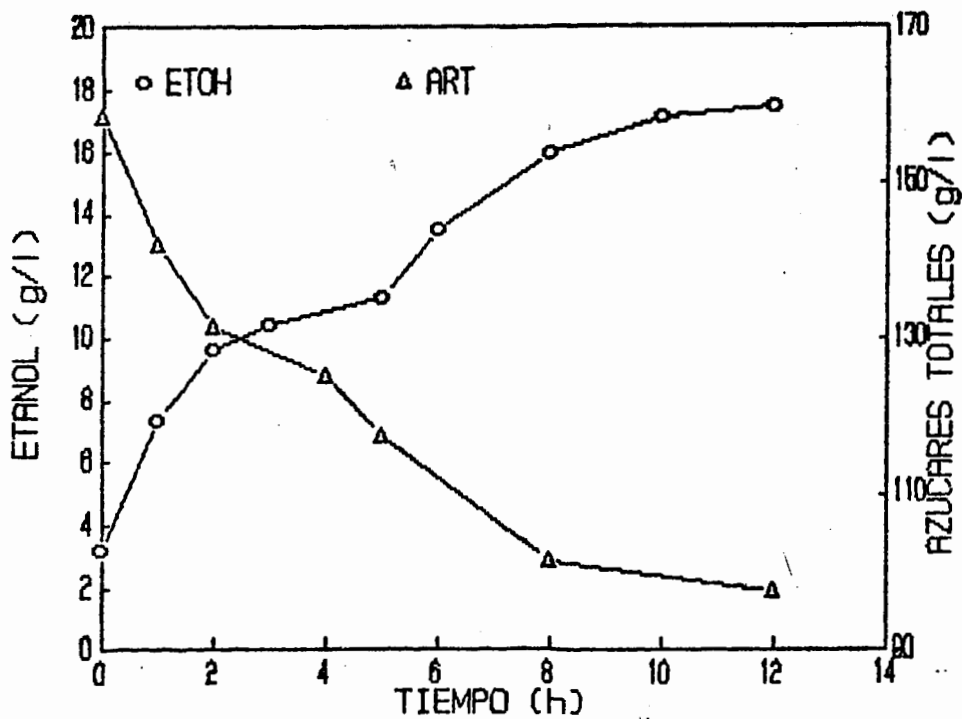


Fig. 14. Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores totales durante una fermentación a nivel matraz, por la cepa BCGC L-001.

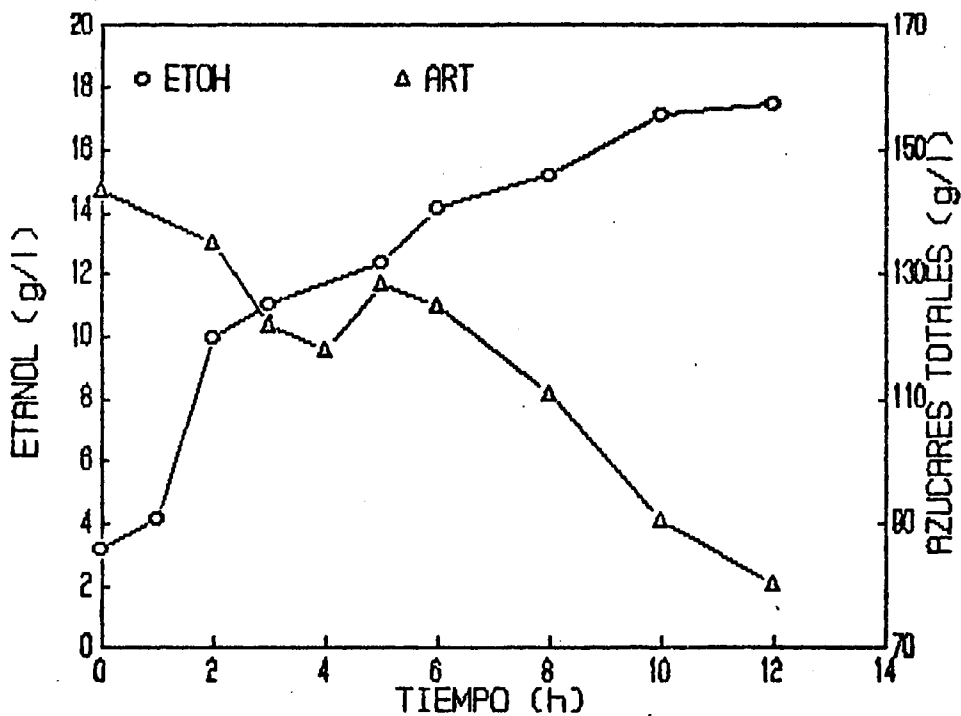


Fig. 15. Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores totales por la cepa BCGC L-002, durante una fermentación anivel matraz.

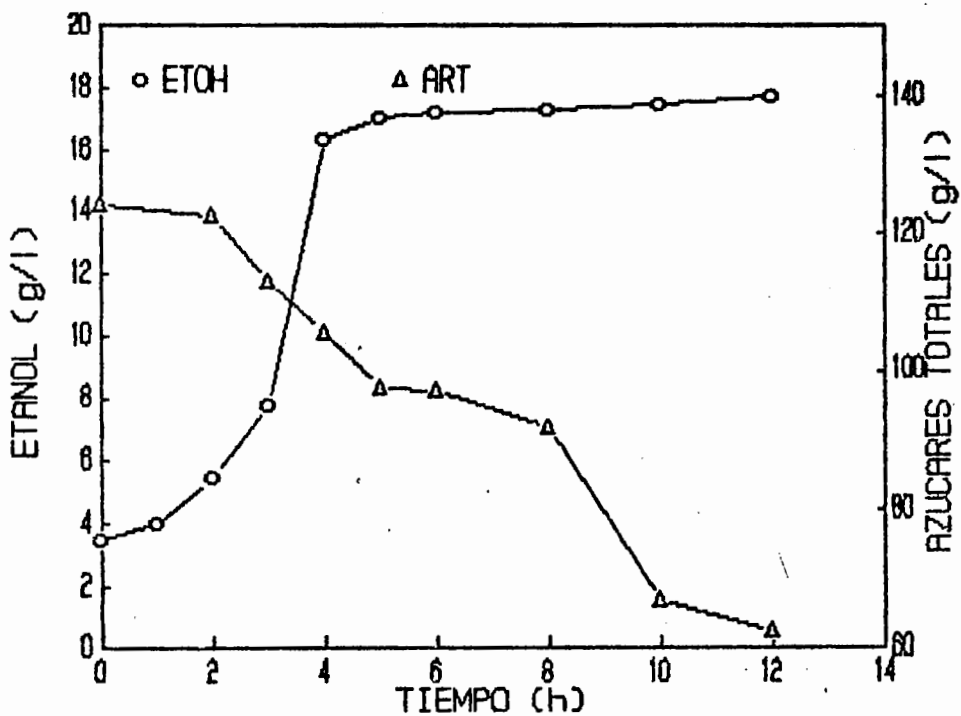


Fig. 16. Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores totales por la cepa BCGC L-024, durante una fermentación anivel matraz.

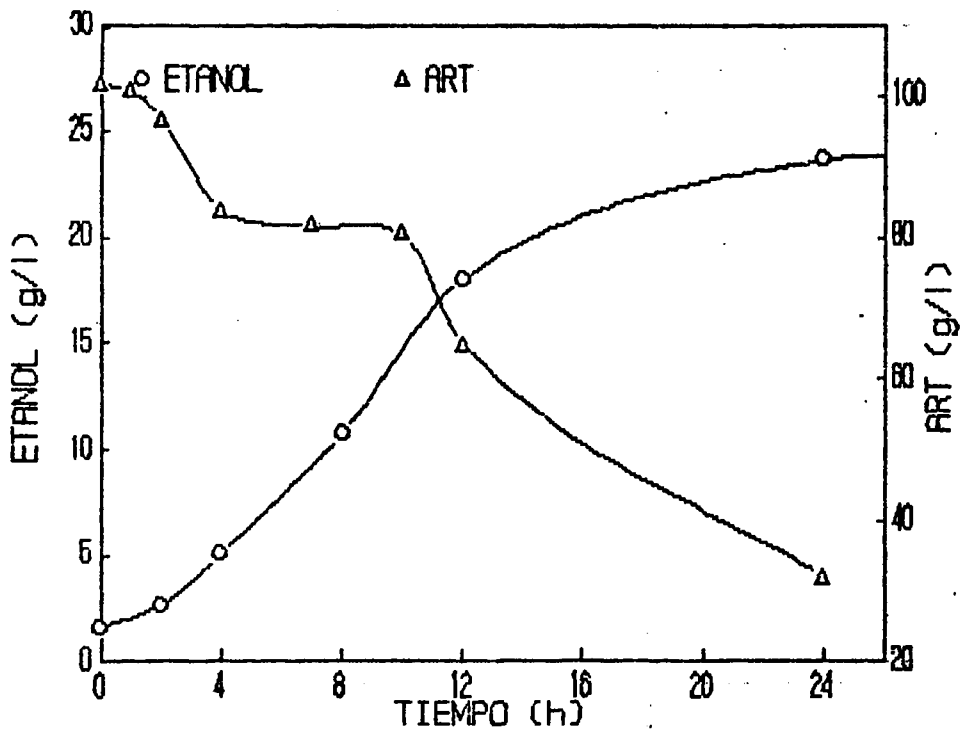


Fig. 17. Producción de alcohol y consumo de azúcares reductores totales por la cepa Ingenio, durante una fermentación a nivel 15 litros.



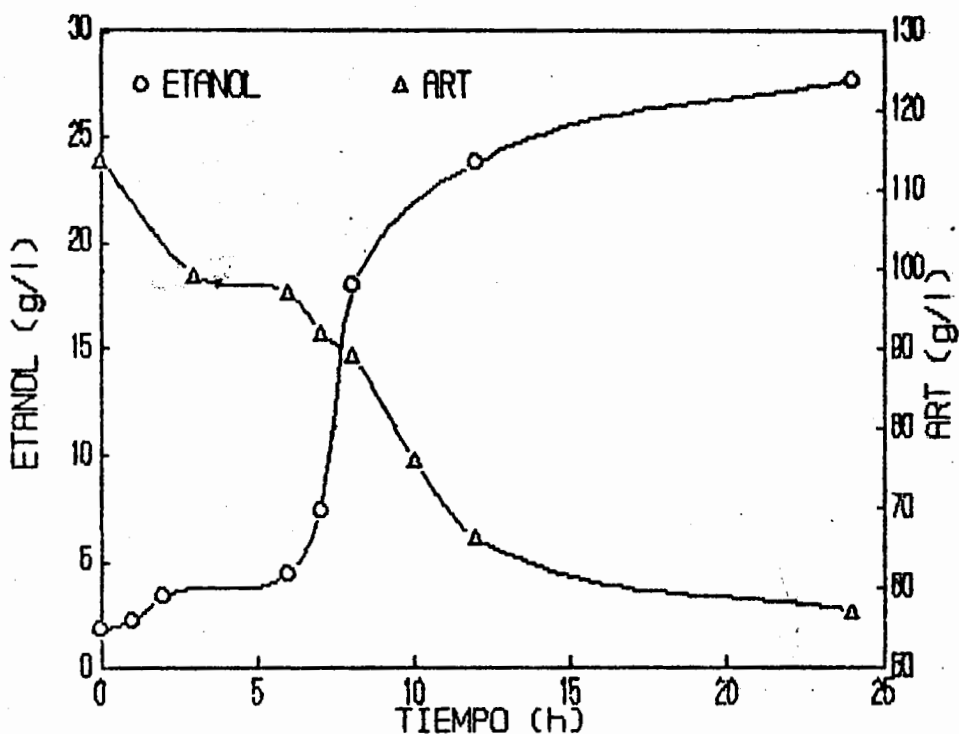


Fig. 18. Consumo de azúcares reductores totales así como la producción de alcohol por la cepa BCGC L-024, durante una fermentación a nivel 15 litros.

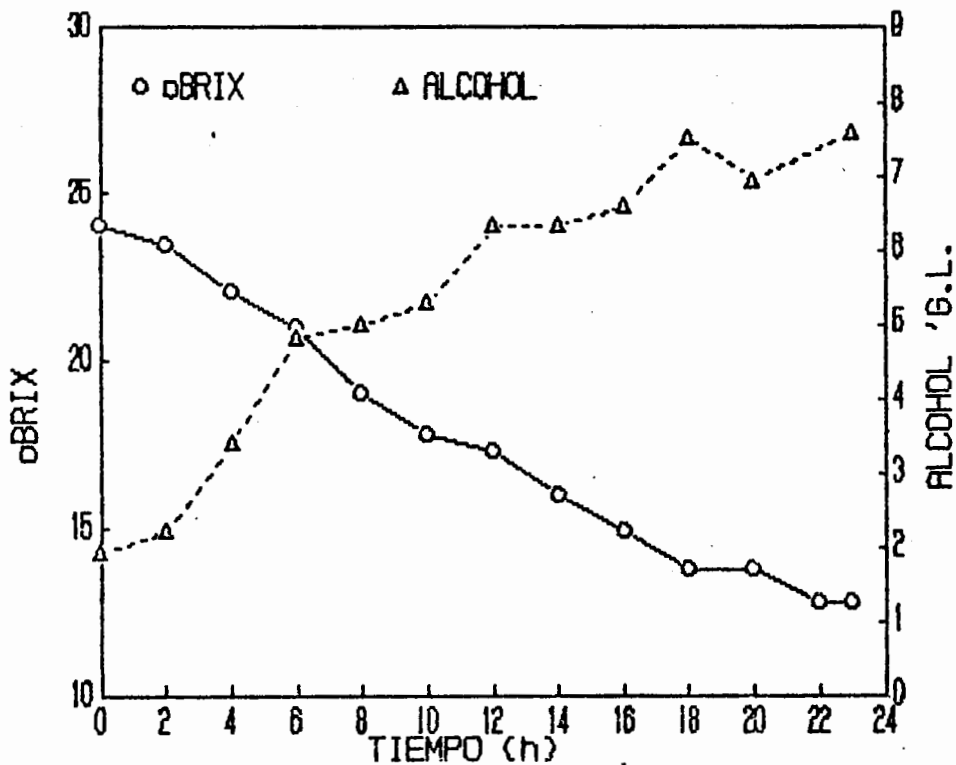


Fig. 19. Producción de alcohol así como el consumo de °Bx por la cepa BCGC L-024 durante una fermentación anivel industrial.

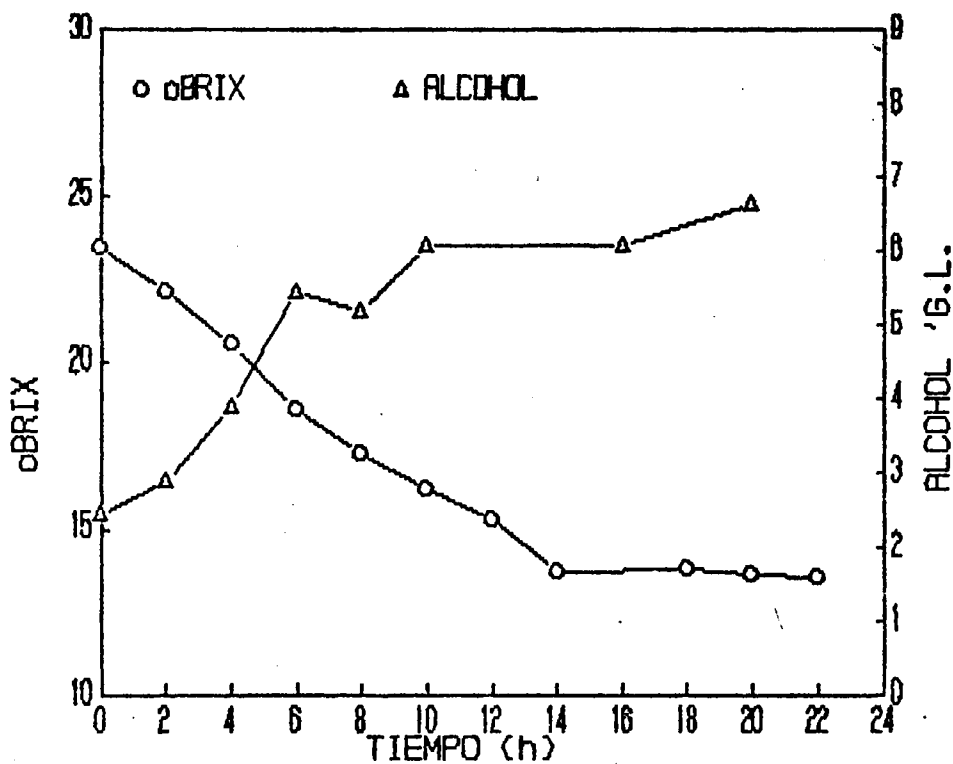


Fig. 20 Producción de alcohol y consumo de °Bx, por lincepa del Ingenio durante una fermentación a nivel industrial.

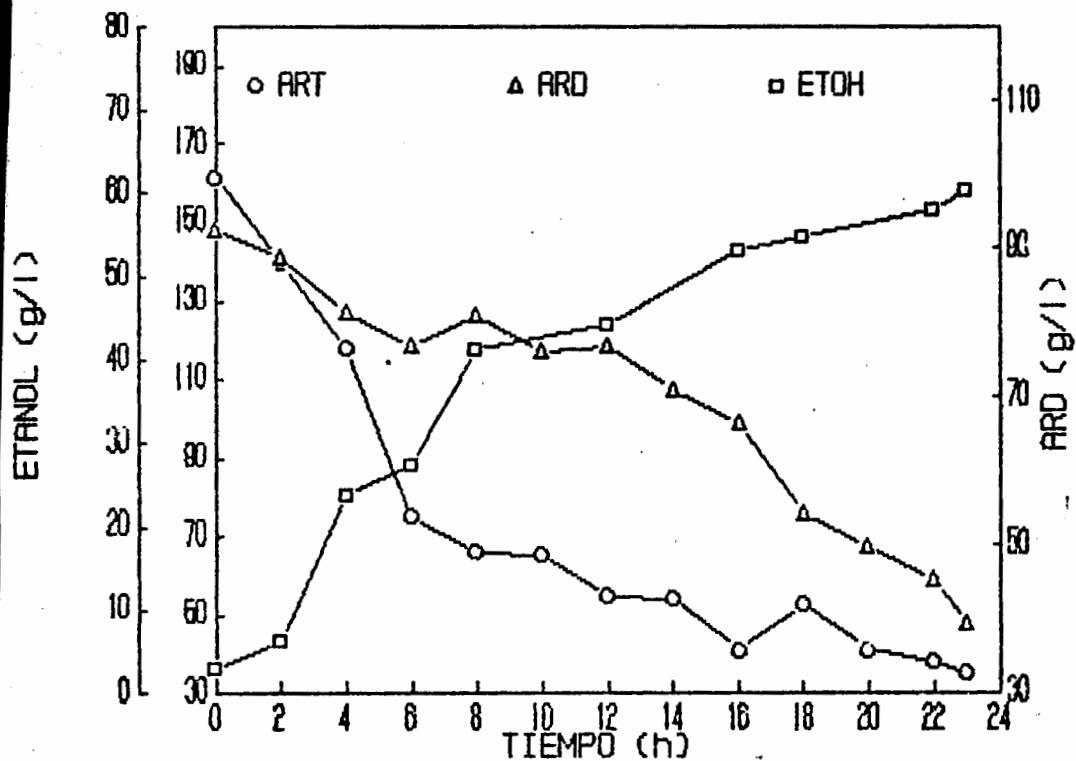


Fig. 21. Consumo de azúcare reductores totales y directos asi como la producción de alcohol para la cepa BCGC L-024 a nivel industrial.

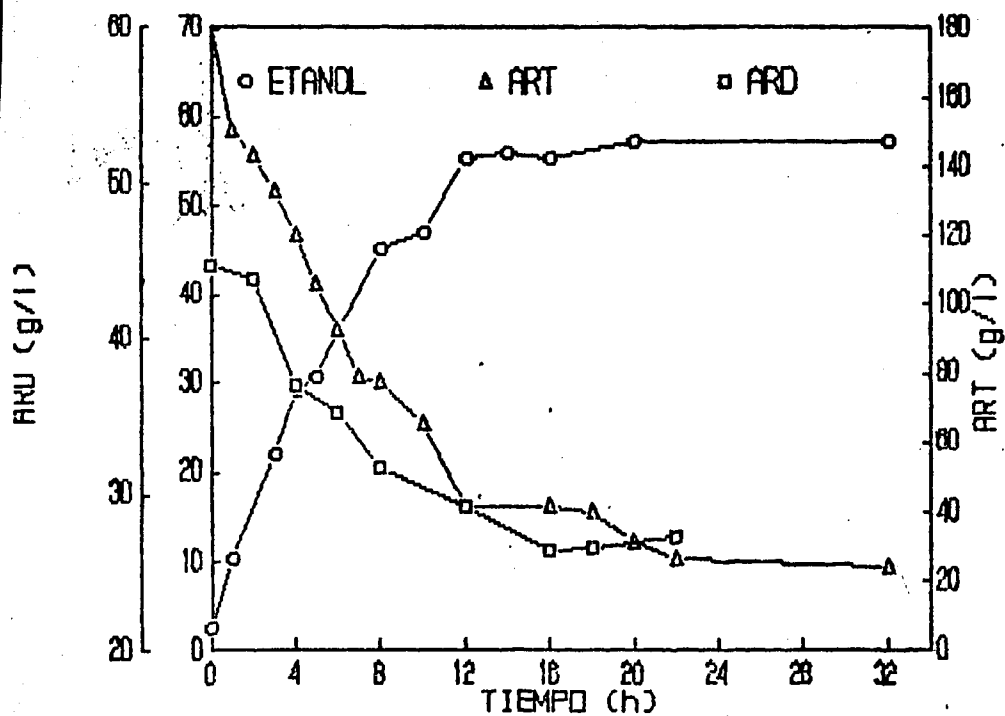


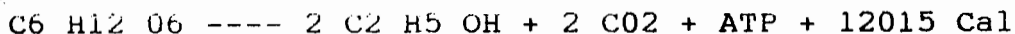
Fig. 22. Consumo de azúcares reductores totales y directos, así como la producción de alcohol por la cepa Ingenio, durante una fermentación a nivel industrial.

ANEXO 1

- 1.- Rendimiento (Y p/s): son los gramos producidos del metabolito en cuestion entre los gramos de sustrato consumidos.

$$Y \text{ p/s} = \frac{\text{g ETOH (final)} - \text{g ETOH (inicial)}}{\text{g ART (inicial)} - \text{g ART (final)}}$$

- 2.- Eficiencia de fermentación: se calcula en base al máximo teórico por una regla de tres.



$PM = 180.16 \quad 2 \times PM = 46.07$

$$Y \text{ p/s máximo teórico} = \frac{92.14}{186.16} = 0.51$$

0.51 ----- 100% de eficiencia

Y p/s ----- X.

3.- La velocidad de producción de alcohol: se calcula por medio de una regresión a la región lineal de la curva de producción de alcohol, en donde la pendiente correspondera a la velocidad máxima de producción de alcohol. Se calcula con la ayuda de un programa de computadora (NUMERICO).

4.- Productividad se calcula dividiendo la concentración máxima de alcohol entre el tiempo de fermentación requerido para alcanzarla.

$$P = \frac{\text{g de ETOH}}{\text{tiempo h}}$$

## IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sturion C. A., Tecnología de la producción de alcohol por fermentación. GEPLACEA. pag. 25 - 38. (1988).
- 2.- Kirk - Othmer. Alcohol Industrial. Producción de alcohol. Enciclopedia de la tecnología química. UTEHA Vol. I pag.745 - 781. (1981).
- 3.- Maiorella B. L. Blanch H.W., Wilke C. R. Economic Evaluation of Alternative Etanol Fermantation Processes. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 26. pag.1003 - 1025. (1984).
- 4.- Blanco G. y Herryman M. Evaluación Económica de la Producción de alcohol con diferentes tecnologías. Revista ICIDCA Vol. XXXL No. pag. 52 - 65. (1987).
- 5.- Maiorella B. Ch., Wilke R. H., Bl;anch W. Alcohol Production and Recovery Advances in Biochem Engin. Edited by Fiecher Bioenergy pag. 43 - 92. (1981).
- 6.- Kar R. y Viswanathan L. Etanolic Fermentation by Termotolerant Yeast. J. Chem. Tech, Biotechnol 35 - B No. 4 pag. 235 - 238. (1985).
- 7.- Presscot y Dunn. Producción Industrial de alcohol por fermentación. Microbiología Industrial. pag. 110 - 133. (1976).



- 8.- Biofuels. Production from sugar cane and Agroindustrial Wastes UNEP/UNESCO Train Course. Lecture I, III, PROMI, San Miguel de Tucuman Argentina. (1981).
- 9.- Pelczar M. J. Reid R. N. Microbiología Ed. Mc. Grawhill. México pag. 211 - 222. (1978).
- 10.- Kate Prescott, S. Cecel Gordon, D. Microbiología Industrial, Ed. Aguilar. 3a Edición, Madrid España. pag. 15 - 21. (1962).
- 11.- R. P. Jones N. Pamment and P. F. Greefield, PhD, Alcohol Fermentation by Yeast - the effect of Enviromental and other variables. Process Biochemistry. Vol. 16, No. 3 pag.42. (1981).
- 12.- Stewart G. G. Rusell, The Biology of Saccharomyces. Biotechnology series. Biology of industrial Microorganisms. Biotechnology. Chapter 17. pag. 511 - 536 (1985).
- 13.- Moulin G., Helene Boze and Galzy P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering. Vol.22 pag. 2375 - 2381. (1980).
- 14.- Phaff, H. J., Miller, M. W. and Mark, E. M. The life of Yeast Second Ed. Harvard University Press Cmbridge Massachusetts and London, England. (1978).

- 15.- Sharma S. y Tauro P. Detection and Biochemical Characterisation of fast and slow Ethanol producing Yeast. *Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotech.* Vol II No. 2 pag. 155 - 160. (1987).
- 16.- Rose, Anthony and Harrison J.S., *The Yeast, Fisiology and Biochemestry of Yeast*, Vol. 2, Academic Press - London and New York, pag. 122 -124. 1971.
- 17.- Gregory P. Casey, Carol A. Magnesium, and W. M. Ingledew. High Gravity Brewing. Effect of Nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Appl. Envirom. Microbiol.* Vol. 48, 3. pag. 639 -646. (1984).
- 18.- Haraldson A y Rosen C. G. Studies on continuous ethanol fermentation and product removal in a laboratory scale plant. *European J. Appl. Microbiol Technol* 14. pag. 224 - 240. (1982).
- 19.- Mancilha L. M. de, Pearson A. M., Waller J. and Hogboam G. J. Increasing alcohol yield by selected yeast fermentation of sweet sorghum. Evaluation of yeast strains for ethanol Production. *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. XXVI. pag. 642 - 634. (1984).
- 20.- S. G. Patil, D. V. Gokhale and B. G. Patil. Enhancement in ethanol production from cane molasses by skim milk supplementation. *Enzyme and Microbiol Techn.* 8 (8) pag. 481 - 484. India . (1985).

- 21.- M. Saita and J. Slaughter, Aceleration of the rate of fermentation by Saccharomyces cerevisiae in the peresence of amonium ion. Enzyme Microb. Technol. Vol.6 pag. 375 - 378, (1984).
- 22.- C. M. Abate, D. A. S., Callieri S. Acosta & M. de Vie. Production of ethanol by a flocculent Saccharomyces sp. in a continuiuos upflow reactor using sucrosa, sugar - cane juice, and molasses as the carbon source. Mircen Journal of App. Microbiol. and Biotechnol. Vol. 3, No. 4 pag. 401 - 409. (1987).
- 23.- K. M. Domberk and L. O. Ingram. Magnesium limitation and its role in aparent toxicity of etanol during yeast fermentation. Applied and Enviromental Microbiology Vol. 52. No. 5. pag. 975 - 981. (1986).
- 24.- Michel Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. Colorimetric Method ior determination of sugar and related substances. Vol. 28. No. 3. (1956).
- 25.- Warwick L. Marsden, Peter P. Gray, Greg J. Nippard and Mark R. Quinlan. Evolution of the DNS Method for analysing lignocellulosic hydrolisates. J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 32. No. 11. pag. 1016 - 1022. (1982).

- 26.- Gail Lorenz Miller. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Pioneering Research Division, Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Mass Analytical Chemistry. Vol. 31 No. 3 pag. 426 - 428. (1959).
- 27.- Otero. Miguel A., Reyes Adelaida y Martínez Servando. Limitaciones del Acido 3 - 5 dinitro - salicílico en mieles finales. Revista ICIDCA Vol. XX No. 1 pag. 20 -25. (1986).
- 28.- Amarine M. A. y C. S. Ough. Determinación de etanol en el destilado. Análisis de vinos y mostos. Editorial Acribia, España, pag. 54 - 59. (1976).
- 29.- Honing P., Principios de Tecnología Azucarera, Tomo III, CECSA, México pag. 347 - 457. (1974).