

1989 - 1

REG. No. 081491119

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

" RECIRCULACION DE VINAZAS TEQUILERAS
EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA "

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MARIA RAQUEL SANCHEZ FLORES
GUADALAJARA, JALISCO 1991



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección

Expediente

Número ...0828/90.....

SRITA. MARIA RAQUEL SANCHEZ FLORES
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "RECIRCULACION DE VINAZAS TEQUILERAS EN LA PRODUCCION ALCOHOLICA"- para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al M. en C. Fernando Peraza Luna.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara Jal., 4 de Junio de 1990.

EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPIRITOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

c.c.p. M. en C. Fernando Peraza Luna
c.c.p. El expediente del alumno

cgr.

Registrar este oficio cifrese fecha y número



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

DIVISION DE BIOTECNOLOGIA
Departamento de Microbiología y Fermentaciones.
M. y F. 046/91

Abril 17 de 1991.

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
PRESENTE.

Estimado M. en C. Carlos Beas Zárate:

Por este medio le comunico a Usted que la pasante de la Licenciatura en Biología, MARIA RAQUEL SANCHEZ FLORES, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de la tesis titulada: "RECIRCULACION DE VINAZAS TEQUILERAS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA", realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Asimismo 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.

ATENTAMENTE


M. en C. FERNANDO A. PERAZA LUNA.



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS:

Infinitas gracias a mis padres y hermanos.

Gracias a todos los que conforman el departamento de Microbiología y Fermentaciones del CIATEJ, por su colaboración en la realización del presente trabajo. Muy especialmente mi gratitud y admiración a mi Maestro y Asesor FERNANDO ANTONIO PERAZA LUNA que enriqueció con su experiencia desinteresada y su apoyo incondicional, a cada paso, la elaboración de la presente; de cuyos conocimientos me hizo partícipe; haciendo posible seguir en la línea de superación, dando a mi existencia un motivo de satisfacción.

**RECIRCULACION DE VINAZAS TEQUILERAS EN LA FERMENTACION
ALCOHOLICA.**

MARIA RAQUEL SANCHEZ FLORES.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA
EN TECNOLOGIA Y DISEÑO, DEL ESTADO DE
JALISCO A. C.
EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y
FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE
BIOTECNOLOGIA.
CON LA DIRECCION DE EL M. en C. FERNANDO
A. PERAZA LUNA.

RESUMEN.

En el presente trabajo se analizó la posibilidad de producir alcohol recirculando vinazas tequileras al sistema de fermentación. Se estudiaron diferentes volúmenes de vinaza para diluir el mosto tequilero (25, 50, 75, 100%(v/v)), a fin de seleccionar el volumen de vinaza a recircular. Para esto, se compararon los rendimientos obtenidos para cada nivel de dilución mediante un análisis de varianza, concluyéndose que a nivel laboratorio no existen diferencias significativas en cuanto a los rendimientos etanol-sustrato (Y p/s), obtenidos con respecto al patrón (mosto tequilero ordinario). Entonces, para la recirculación de las vinazas tequileras, se eligió el nivel de dilución del 75%(v/v), con un rendimiento promedio de 0.47 g etanol/g azúcar consumido.

Mediante un análisis de cromatografía de gases, los destilados obtenidos después del quinto ciclo de recirculación fueron comparados con los de dos tequileras, observándose poca diferencia entre ellos; lo cual demuestra, preliminarmente, que la vinaza no influye significativamente sobre la composición del producto de la fermentación del agave tequilero.

Por otro lado, en el tercer ciclo de recirculación, se obtuvo una remoción de la DBO_5 (Demanda Bioquímica de Oxígeno) de un 23%.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
III. JUSTIFICACION	12
IV. OBJETIVOS	14
V. HIPOTESIS	15
VI. MATERIALES Y METODOS	16
VII. RESULTADOS	28
VIII. DISCUSIONES	32
IX. CONCLUSIONES	35
X. TABLAS	37
XI. FIGURAS	42
XII. APENDICES	55
XIII. APARTADOS	58
XIV. BIBLIOGRAFIA	59

I.- INTRODUCCION.

En el proceso de producción de tequila, se obtiene un subproducto comúnmente llamado VINAZA TEQUILERA, líquido residual que actualmente está provocando en la región serias alteraciones ecológicas por las altas temperaturas, elevadas cargas orgánicas y bajos valores de pH, condiciones a las que se vierten en ríos y suelos. Debido a la gran cantidad de materiales orgánicos e inorgánicos disueltos que poseen y volúmenes producidos por litro de alcohol (10 a 15 l de vinaza por l de alcohol), presentan dificultades para su tratamiento. Por lo tanto, se han realizado estudios que presentan grandes posibilidades para obtener un aprovechamiento de este tipo de residuo, empleándolo en procesos tales como la producción de levadura forrajera (12), en la producción de combustible por digestión anaerobia (28) o en el mismo proceso de fermentación a través de su incorporación al medio de fermentación, y posterior recirculación, con el fin de disminuir los volúmenes y efectos contaminantes, lográndose además un aprovechamiento de los nutrientes y azúcares que tal residuo posee.

En cuanto a la recirculación de vinazas, ha sido estudiada en varios países como Brasil (Sistema Biostil), Cuba, México (por la Industria Sauza) y en Europa. Sin embargo, son pocos los reportes técnicos sobre las experiencias con relación a esta alternativa de aprovechamiento (15,16).

II.- ANTECEDENTES.

1.- PROCESO DE FERMENTACION ALCOHOLICA.

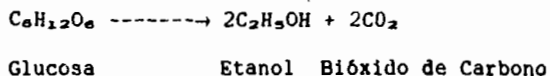
El alcohol es conocido por el hombre desde hace muchos siglos y tuvo su origen a través de la fermentación natural de los azúcares para la producción de licores y bebidas (1). En la actualidad, la producción de bebidas es una de las económicamente más importantes en el sector de la Biotecnología industrial (2). Tal producción está basada en la fermentación de gran diversidad de fuentes de azúcares, los cuales pueden ser obtenidos de materias primas sacaroideas, amiláceas y celulósicas. Por lo general, las materias sacaroideas requieren poco o ningún tratamiento aparte de la dilución. Por otro lado, las materias amiláceas y celulósicas deben ser hidrolizados, mediante procesos químicos o enzimáticos, para la obtención de azúcares fermentables (3,4).

En la fermentación alcohólica los azúcares son los substratos empleados por las levaduras para producir alcohol. Las levaduras más utilizadas son las del género Saccharomyces, especialmente las especies S. cerevisiae y S. uvarum Pero, en ciertas ocasiones, también se emplean otras, como S. amensis y Schizosaccharomyces pombe (1).

Entre los productos del proceso fermentativo citado se encuentran las bebidas alcohólicas. La bebida específica se debe a la presencia de una mezcla compleja de sustancias, las cuales son originadas de diferentes fuentes. Aunque algunos de los componentes que determinan las características de sabor y olor de estas bebidas vienen directamente de la materia prima, la mayoría provienen de la acción de la levadura. Como ejemplo se pueden mencionar, el ron que es producto de la destilación de jugo de caña de azúcar; los whiskys involucran un grupo de bebidas alcohólicas destiladas de mostos fermentados de granos, los brandys son el producto de la destilación del vino de uva, mientras que el tequila es producido a partir de jugo de agave (5).

A.- Esquema general del proceso de fermentación.

Se denomina fermentación alcohólica a la formación de alcohol, bajo condiciones anaerobias, y en presencia de fuentes de substrato en concentraciones mayores de 5 g/l (6). Saccharomyces cerevisiae utiliza ciertos azúcares (glucosa, fructuosa y sacarosa) para producir preferencialmente etanol y bióxido de carbono; la sucesión de reacciones que se llevan a cabo en la fermentación se pueden resumir mediante la ecuación de Gay-Lussac:



Esta ecuación establece un rendimiento máximo teórico de conversión de 0.51 g de etanol/g-azúcar consumido. En la práctica los rendimientos obtenidos nunca sobrepasa el 94.7% del valor máximo. Esto se debe al requerimiento del 4 al 5% de sustrato para la síntesis de nuevas células y formación de subproductos, siendo este el límite conocido como "rendimiento Pasteur". Las condiciones de fermentación tales como: concentración inicial del sustrato, concentración de inóculo, temperatura, pH, contenido de oxígeno y de bióxido de carbono, disueltos en el medio, pueden favorecer una síntesis de biomasa y por consiguiente una disminución en la producción de etanol.

Una fermentación alcohólica convencional usualmente se inicia a partir de mostos que contienen entre 100 y 200 g/l de azúcar, generalmente glucosa y sacarosa; se ajusta el pH entre 4 y 4.5 y se adicionan nutrientes como fósforo, nitrógeno y vitaminas.

En una fermentación típica, el mosto es inoculado con levadura activa y, rápidamente, comienza la transformación de los azúcares, con desprendimiento de bióxido de carbono y formación de alcohol etílico. El rango de duración de esta etapa varía entre 36 y 50 h, a temperatura controlada. Aunque la producción de alcohol no requiere oxígeno, 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 (propagación del inóculo). Durante la fermentación se desprende bióxido de carbono y se establecen pronto las condiciones

anaerobias (7).

Al término de la fermentación se obtiene el mosto fermentado, que pasa a una primera columna de destilación para separar el alcohol y otros compuestos volátiles. El alcohol obtenido pasa a una segunda columna de destilación hasta dar una concentración final de etanol del 95% (4).

2.- PROCESO DE ELABORACION DEL TEQUILA.

A.- Producción regional de tequila.

El tequila es un producto destilado tipo regional y a ello se debe que el 99% del producto total se elabore en el Estado de Jalisco, que es donde se localiza geográficamente la zona tequilera (8).

La materia prima utilizada para la elaboración de tequila es el maguey o agave que, aunque no es privativo de México, en ninguna tierra se ha integrado mejor tanto al paisaje como al sentir y vivir de su gente. El maguey es una planta xerófila originaria de América, que se cultiva principalmente en la región Central y Occidental de la República Mexicana, en estados como Jalisco, Oaxaca, Sonora, Puebla, San Luis Potosí, Chihuahua, Sinaloa, Coahuila y Durango (8,9).

No obstante que para los ojos de los inexpertos todos los maqueyes parecen iguales, según los conocedores existen más de 17 géneros y especies distintas, pero la más utilizada por la industria tequilera es el Agave tequilana, Weber, al cual se le ha agregado la denominación azul, debido a que su tendencia a este color constituye su característica diferencial más aparente(9).

Vale subrayar que de la producción que corresponde a Jalisco, es en Tequila donde se produce la mayor cantidad de esta bebida y, en términos generales, la industria del tequila ha mantenido un ritmo de crecimiento considerable. Ello puede apreciarse, aunque a grandes rasgos, en las cifras que se muestran en la figura 1.

Este aumento de producción se ha sustentado fundamentalmente en la exportación a los Estados Unidos de Norteamérica. Es también interesante remarcar cómo se ha incrementado, en los últimos años, la exportación del "vino de nuestro suelo". De los 20'524,000 de litros fabricados en 1968, apenas el 11.15% (2'290,000 litros) fue sacado del país, mientras que, en 1974, de los 38'483,000 litros que se destilaron, fue exportado el 43.71% (16'819,000 litros) y en 1987 salieron del país 33'483,000 litros, casi el 60% de la producción total (9).

B.- Proceso convencional para la obtención de tequila

(Figura 2).

a) Manejo del agave.

La elaboración del tequila se inicia con la cosecha de los agaves maduros (crecidos entre siete y diez años de edad), los cuales se deshojan perfectamente separándose las pencas (acto denominado jima), quedando de esta manera sólo las cabezas o piñas. Estas últimas son sometidas a un proceso de cocción, con el fin de hidrolizar los polisacáridos, proceso que se efectúa en un horno o autoclave (8). Cocidas, las cabezas se desmenuzan utilizando desgarradores y pasan enseguida a la molienda para extraer los azúcares, obteniéndose un jugo azucarado, cuyo contenido en azúcares de agave no debe ser menor del 51% del total de azúcares a utilizar en la preparación del mosto.

b) Preparación de la miel.

Esta se prepara disolviendo mascabado (azúcar no refinada) y piloncillo a un determinado porcentaje de azúcares, en un tanque de agitación, suplementado con vapor.

c) Preparación del mosto.

Se prepara mezclando el jugo extraído y la miel, en los tanques preparadores, obteniéndose así el mosto el cual se diluye con agua para obtener los grados Brix deseados (porcentaje de sólidos presentes en una muestra) y un pH de 4 a 4.5 (10).

d) Obtención del tequila.

Los mostos se llevan a tanques de fermentación, en donde se adicionan las levaduras seleccionadas que llevarán a cabo el proceso fermentativo, durante un tiempo aproximado de 36 h a temperatura controlada (8). Una vez terminada la fermentación, se obtiene un líquido alcohólico llamado mosto fermentado, el cual se somete a una primera destilación continua, obteniéndose aguardiente ordinario, metanol, cabezas y colas. El aguardiente ordinario se somete a una segunda destilación obteniéndose el tequila, con no más de 55°GL, y como subproductos cabezas y colas (10).

3.- APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS INDUSTRIALES DE DESTILERIA.

Uno de los subproductos más importantes obtenidos en las destilerías, son las vinazas que son obtenidas durante la destilación alcohólica de un mosto fermentado, y representan la fracción no volátil del material que se obtiene del fondo de la primera columna de destilación. Dependiendo de la materia prima empleada en el proceso, pueden derivarse las siguientes clases de vinazas: de caña o remolacha, de granos (cebada, maíz) y de jugos de frutas, entre otras. Cada una de las vinazas mencionadas difieren principalmente en calidad y sólo una minoría ha sido considerada de importancia para la investigación y el desarrollo tecnológico (5,11).

A.- Vinazas tequileras

Las aguas residuales obtenidas en la destilación del mosto fermentado del tequila, o vinazas, son residuos con una elevada carga orgánica e inorgánica contaminante, pues su contenido en sólidos aunque bajo (2% a 3%) se vuelve significativo por los volúmenes producidos que varían entre 10 a 15 l de vinaza por litro de alcohol (12,13).

Para dar una idea de los volúmenes producidos de vinaza, en la tabla 1 se muestra la producción de tequila y vinaza de los últimos años. Por lo común debido a su alta demanda de oxígeno (DBO₅ alrededor de 35,000 mg/l), su pH ácido y elevada temperatura a la que se someten llegan a afectar severamente a los sistemas acuáticos, pues en la mayoría de los casos se arrojan a ríos y a drenajes sin ningún previo tratamiento (14).

A pesar de ser la vinaza un desecho industrial y gran fuente de contaminación es, a la vez, fuente de nutrientes pues posee algunos componentes químicos aprovechables, tales como nitrógeno, potasio (K₂O), calcio (CaO), magnesio (MgO) y fósforo (P₂O₅), así como azúcares residuales que pueden ser aprovechados. El valor del residuo en términos de nutrientes se muestran en la Tabla 2.

En algunos países como Brasil, las vinazas son aprovechadas a través de su adición a los medios de fermentación, en una dilución hasta del 50% (más comúnmente entre 10 a 20%) para proveer nutrientes, incrementar la capacidad reguladora del pH y

reducir el consumo de agua (29). Sin embargo, las vinazas tequileras pueden ser utilizadas sustituyendo hasta un 100% del volumen de agua a utilizar en la preparación de los mostos de melaza (17).

Dadas las dificultades que presenta el tratamiento de vinazas, debido a las altas concentraciones de materia orgánica e inorgánica disuelta que poseen, se han diseñado programas que permiten su utilización. Actualmente existen diversos procesos de tratamiento que están siendo utilizados para el aprovechamiento y la eliminación del efecto contaminante de las vinazas; entre ellos se pueden señalar:

- a) Reciclaje.
- b) Utilización en la producción de levadura forrajera.
- c) Producción de combustible por digestión anaerobia.
- d) Utilización de la vinaza como agua para irrigación de campos cañeros.
- e) Aprovechamientos de la vinaza en la elaboración de productos potenciales como: bacterias, hongos y levaduras.
- f) Lagunas de tratamiento.
- g) Lodos activados.
- h) Tratamientos físico-químicos.

A partir de lo anterior, también puede plantearse la incorporación de este residuo al medio de fermentación y su recirculación por cierto número de ciclos.

Algunos autores sugieren que la vinaza puede ser recirculada sustituyendo del 10% al 20% (hasta un 50%) del agua de dilución de las melazas. Otros investigadores han reportado que la máxima cantidad a utilizar de vinazas no alcanza más de un 50% del total producida (5).

III.- JUSTIFICACION.

En las destilerías de alcohol, las vinazas son los residuos con mayor carga orgánica e inorgánica contaminante; son producidas en cantidades que fluctúan entre 135 y 1,800 metros cúbicos por día y por planta. Debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), pH ácido y su elevada temperatura, su descarga directa en un manto acuífero perjudica severamente a los ecosistemas acúaticos. Por lo tanto, resulta necesario tratarlas antes de verterlas al drenaje para mantener el equilibrio ecológico, evitando en parte la contaminación de aguas (17).

El Estado de Jalisco es el primer productor de tequila en el país; cuenta con 31 plantas tequileras que producen aproximadamente 780 millones de litros de vinaza al año.

En algunos países se han investigado diferentes alternativas que permiten el uso, así como la purificación y aprovechamiento del residuo; entre ellas se pueden mencionar: Utilización de la vinaza en la producción de levadura forrajera, en la producción de combustible por digestión anaerobia y en la producción de productos potenciales como bacterias, levaduras y hongos.

Por otro lado, se considera que una de esas alternativas de aprovechamiento de las vinazas la constituye su recirculación, lo que permitirá recircular un determinado volumen de vinaza substituyendo un volumen de agua utilizada en la preparación de mosto, con lo cual se obtienen beneficios como:

- a) Reducción del volumen de vinaza a tratar.
- b) Remoción de algunos constituyentes orgánicos e inorgánicos.
- c) Disminución de la adición de nutrientes.
- d) Disminución de los requerimientos de agua y el consumo de vapor.

IV.- OBJETIVOS.

1.- OBJETIVO GENERAL.

En el presente trabajo se propone lograr la incorporación al mosto tequilero de un determinado volumen de vinaza como agua de dilución y establecer una metodología para su recirculación en el proceso de fermentación.

2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Para alcanzar el objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- A) Prueba y selección de una cepa de Saccharomyces cerevisiae con buenos rendimientos de alcohol, empleando un mosto tequilero.
- B) Establecer el volúmen de vinaza a utilizar para diluir el mosto tequilero.
- C) Estandarizar las condiciones de propagación de la levadura seleccionada.
- D) Establecer el número de recirculaciones de la vinaza sin alterar el rendimiento de alcohol.
- E) Comparar el producto obtenido con otro obtenido a partir de un mosto tequilero sin vinaza (producto normal).

V.- HIPOTESIS.

La utilización de la vinaza tequilera y su recirculación al proceso fermentativo como agua de dilución, estimulará la fermentación alcohólica y no alterará los rendimientos comúnmente obtenidos en mostos tequileros, permitiendo reducir el volúmen a tratar para su libre descarga.

VI.- MATERIALES Y METODOS.

1.- MICROORGANISMO.

Los microorganismos utilizados fueron dos cepas de levadura de Saccharomyces cerevisiae, probadas individualmente y en cultivo mixto; proporcionado por el Banco de Cepas del CIATEJ (BCGC).

S. cerevisiae BCGC L-002. Alta productora de etanol a partir de melaza.

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

2.- EQUIPO.

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 A., Espectrofotómetro Bausch and Lomb Spectronic 20, balanza analítica Chyo Jupiter SDT 200, balanza granataria Mettler PL 4400, estufa de alta temperatura Felisa, potenciómetro Orp Test Kit Cole Palmer, agitador magnético Felisa, autoclave Infra, estufa de incubación Felisa, estufa incubadora de precisión GCA, Corporation, microscopio compuesto One Ten American Optical, campana de flujo laminar, centrifuga-Sol-Bat, orbital rotatorio New Brunswick.

3.- REACTIVOS.

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico obtenidos de fuentes comerciales conocidas.

4.- MATERIA PRIMA.

La vinaza, miel, jugo y mosto fermentado, utilizados fueron obtenidos de una tequilera local. Para la preparación de los mostos tequileros en el laboratorio se mezcló el jugo y la miel en una relación 1 : 3 (v/v), obteniéndose una mezcla de 54 °Brix; posteriormente se utilizó agua y/o vinaza para ajustar el medio a 12° Bx.

5.- MEDIOS DE CULTIVO.

a) Conservación.

Medio 1: Medio sólido de vinaza, para el mantenimiento y proliferación de las cepas utilizadas. Un litro de medio contenía: 1 l de vinaza tequilera, 0.4 g de Fosfato de amonio dibásico, 0.6 g de urea y agar al (4% p/v). El pH del medio se ajustó a 4.5.

b) Propagación y fermentación.

MEDIO 2: Mosto tequilero ordinario a 12°Bx con adición de 0.6 g/l de urea. pH de 4.9.

MEDIO 3: Mosto diluido con un volumen de vinaza del (25% v/v) y agua hasta 12°Bx; 0.6 g/l de urea. pH de 3.96.

MEDIO 4: Mosto diluido con un volumen de vinaza del (50% v/v) y agua hasta 12°Bx; 0.6 g/l de urea. pH de 3.89.

MEDIO 5: Mosto diluido con un volumen de vinaza del (75% v/v) y agua hasta 12°Bx; 0.6 g/l de urea. pH de 3.79.

MEDIO 6: Mosto diluido con (100% v/v) de vinaza a 13°Bx; 0.6 g/l de urea. pH de 3.6.

Como criterio de dilución del mosto con vinaza, se tomó un porcentaje con respecto al volumen de agua utilizado para la preparación del mosto.

6.- MANTENIMIENTO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS.

Las cepas fueron mantenidas en M1, con resiembras bimestrales. Durante cada resiembra, los tubos con agar inclinado fueron incubados durante 24 h a 30° C; después, los tubos se conservaron en refrigeración a 4° C.

7.- INOCULO.

Preparación. Se partió de un tubo de conservación, con la cepa en M1, almacenado en el refrigerador. Con una asada se resembró en tubos con el mismo medio, y después de incubar por 24 h a 30° C, las células se suspendieron en solución fisiológica estéril (NaCl 0.85%); de la suspensión celular se inocularon (10% v/v) matraces de 500 ml conteniendo 180 ml de M2 y M5. Para su incubación se empleó un agitador rotatorio New Brunswick, por 12 h 35° C y 300rpm.

8.- TECNICAS ANALITICAS.

A.- Determinación de etanol por el método de dicromato.

a) Los reactivos utilizados son:

Dicromato de potasio	$K_2Cr_2O_7$	33.768 g/l
Acido sulfúrico	H_2SO_4	325 ml

b) Preparación del reactivo:

Se diluyó el ácido sulfúrico en un volumen aproximado de 400 ml de agua destilada, se dejó enfriar y se le agregó el dicromato diluido en 200 ml de agua destilada. Posteriormente se aforó a un litro con agua destilada.

c) Procedimiento

A 1 ml de solución problema agregar 2 ml de solución de dicromato de potasio se agita y se deja reposar durante 10 minutos; enseguida se le agregan 5 ml de agua destilada y se agita. Leer la absorbancia a 585 nm.

d) Estandarización del método.

Se hizo una una curva de calibración para determinar alcohol usando una concentración patrón de etanol de 20 mg/ml.

El rango de concentraciones probadas fue de 2 a 20 mg/ml, obteniéndose una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que predijo la cantidad de alcohol a partir de la muestra a una absorbancia dada.

B.- Determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico (19).

a) Reactivos: Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

Fenol al 5% (p/v)

b) Procedimiento.

A 1 ml de muestra se le adicionó 1 ml de fenol al 5%; enseguida, se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de hidrólisis total. Se deja enfriar 5 min a temperatura ambiente; se agita; se pone a baño de agua fría durante 10 minutos. Leer absorbancia a 490 nm.

Se realizó una curva de calibración, usando una solución patrón de sacarosa a una concentración de 0.01 a 0.1 mg/ml. Se obtuvo una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que predijo la cantidad de azúcares totales a partir de un valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro a 490 nm.

C.- Determinación de peso seco.

La muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos; el sedimento se resuspendió en agua destilada y se centrifugó dos veces más a las mismas condiciones para remover los residuos de medio.

Finalmente, se resuspendió el paquete celular y se depositó en pesafiltros, puestos previamente a peso constante. Se colocaron en una estufa a 80°C hasta evaporar completamente el agua (24 h) para obtener las células secas.

El peso seco se determinó por la diferencia de pesos entre el pesafiltro con muestra seca y el pesafiltro a peso constante, dividido entre el volumen inicial de la muestra y multiplicado por 1000, para reportarlo como gramos de células por litro.

D.- pH. Fue determinado directamente con potenciómetro.

E.- Determinación de DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxígeno) (20).

El DBO₅ es una estimación de la cantidad de oxígeno disuelto que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra. El método se basa en la cantidad

de oxígeno requerido por los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en el agua y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de 5 días de incubación a 20°C.

a) Nutrientes

- | | | |
|--|---|----------|
| 1.- Solución fosfato amortiguadora | KH_2PO_4 | 8.5 g/l |
| 2.- Solución sulfato de magnesio | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22.5 g/l |
| 3.- Solución cloruro de calcio | CaCl_2 | 27.5 g/l |
| 4.- Solución cloruro férrico hexahidratado | FeCl_3 | .25 g/l |

b) Reactivos

- 1) Solución sulfato manganoso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 364 g/l

- 2) Preparación de la solución álcali-yoduro

KI	15 g/100 ml
KOH	70 g/100 ml
NaNO_3	1 g/100 ml

Se diluyó en poca agua el KI; después poco a poco se agrego el KOH, posteriormente se agrego el NaNO_3 . Se aforo a 100 ml.

- 3) Acido sulfúrico al 50% (v/v).

- 4) Almidón.

Se mezclan 2 g de almidón grado laboratorio y 0.2 de ácido salicílico como preservativo en 100 ml de agua destilada caliente.

5) Solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Disolver en agua hervida 24.8 gramos de ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y aforar con agua hervida desionizada; posteriormente, se titula con iodato de potasio para saber la normalidad del tiosulfato.

Procedimiento.

- 1) Poner a oxigenar agua desionizada en la cantidad requerida.
- 2) El inóculo es preparado a partir de 24 gramos de tierra disueltos en 100 ml de agua, se incuban 4 h a 37°C.
- 3) Al agua previamente aireada se le agrega 1 ml/l de cada uno de los nutrientes, así como también el inóculo de tierra a razón de 20 ml por litro.
- 4) Con el agua aireada que ya contendrá el inóculo y nutrientes, se llenan las botellas DBO_5 , hasta derrame, conteniendo la muestra a analizar (por duplicado).
- 5) Utilizar un blanco (solo agua de inóculo sin muestra)
- 6) Incubar un duplicado de cada muestra cinco días a 20°C en la obscuridad.
- 7) A las muestras que no se incuban se les agrega 1 ml de sulfato manganoso y 1 ml de solución álcali - yoduro.
- 8) Se espera a que precipite el contenido de las botellas y se agita cada una durante 30 min.

- 9) Agregar 1 ml de ácido sulfúrico al 50% tapar y volver a agitar.
- 10) Tomar 25 ml de muestra en un matraz, agregar dos gotas de almidón y titular con tiosulfafo hasta el vire.
- 11) Se lleva a cabo el mismo procedimiento con las botellas (duplicados) después de cinco días de incubacion.

Los resultados se calculan con la siguiente fórmula:

$$DBO_5, (mg/l) = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2)}{P}$$

D₁: Oxígeno disuelto inicial antes de 5 días, mg/l.

D₂: Oxígeno disuelto final después de 5 días incubado a 20°C, mg/l.

P : Porcentaje de dilución de la muestra.

B₁: Oxígeno disuelto inicial en el blanco, antes de la incubación, (mg/l).

B₂: Oxígeno disuelto final en el blanco después del período de incubación (mg/l).

F.- ANALISIS DE LOS DESTILADOS.

Los destilados se analizarón por cromatografía de gases en un cromatografo Hewlett Packard modelo 5890 A., con columna HP-20M; a las siguientes condiciones: Atenuación de 2, velocidad de carta 0.3, flujo de nitrógeno 2, temperatura horno 40°C, temperatura inicial 40°C, tiempo inicial 6 minutos, temperatura final 100°C, tiempo final 10 minutos, incremento 15°C/minuto, temperatura del inyector 110°C, temperatura del detector 120°C, tiempo de corrida 20 minutos.

9.- METODOLOGIA.

A.- Preparación de la cepa mixta L-002/024.

Para la preparación del cultivo mixto L-002/L-024, las cepas utilizadas se crecieron por separado en medio 1 a 30°C por 24 h. Bajo condiciones de esterilidad, se suspendió cada una de ellas con solución fisiológica; después se les ajustó población a ambas por conteo al microscopio, para proceder a mezclarlas en la misma relación (1 : 1) y con esta mezcla inocular tubos que contenían medio 1.

B.- Medida del porcentaje de floculación.

Debido a que en la preparación del cultivo mixto se utilizó una cepa de característica floculante (L-002), fue necesario medir porcentaje de floculación para cada cepa en medio 2 y 5 para establecer la relación en que estarían en el fondo del recipiente de fermentación. Se siguió el siguiente procedimiento: Matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 180 ml de los medios 2 y 5, se inocularon al (10% v/v) con las cepas L-002 y L-024 por separado, fueron incubados a 35°C y 250 rpm por 12 h. Terminado el período de incubación, cada matraz fue homogenizado y se tomó una alícuota de 100 microlitros para determinar por cuenta microscópica la población total.

Después de 2 min de reposo, cuando las cepas habían floculado, se tomó muestra al sobrenadante para determinar la cuenta celular y obtener el porcentaje de células sedimentadas, en base a la

concentración total de células menos la concentración de células del sobrenadante transcurridos los 2 min.

Por otra lado, como se menciona posteriormente (apartado E), a la suspensión celular conteniendo ambas levaduras en la relación (1 : 1) también se midió porcentaje de floculación.

C.- Selección de una cepa con buena producción de alcohol.

Se realizaron cinéticas de fermentación para cada una de las cepas, así como para la mezcla de ambas. Las fermentaciones se efectuaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 180 ml de medio 2 e inoculados al 10% (v/v).

Se muestreó a diferentes tiempos de la fermentación. A las muestras tomadas se les determinó: azúcares totales, alcohol y población celular.

Se analizó el rendimiento en base al sustrato; éste se calculó a partir de la cantidad de alcohol producido al final de la fermentación respecto al consumo de azúcares (Ver Apéndice 1).

D.- Establecimiento del volumen de vinaza como agua de dilución del mosto tequilero.

Se realizaron cinéticas de fermentación simultáneas en matraces Erlenmeyer que contenían 900 ml de los medios 2, 3, 4, 5 y 6 (por duplicado), inoculados al 10% (v/v).

Los tiempos de muestreos establecidos fueron: 0, 8, 12, 24, 30 y 36 h. A las muestras tomadas se les determinó: azúcares totales, alcohol y se analizó el rendimiento.

E.- Estandarización de las condiciones de propagación de la levadura seleccionada.

Se efectuó un reciclaje celular del cultivo utilizado, asegurando que el cultivo permaneciera a una concentración celular conocida y constante. Se llevó a cabo la experimentación siguiente: Matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 180 ml de medio 5 fueron inoculados al 10%(v/v) con el cultivo mixto L-002/L-024; se incubaron a 35°C a 250 rpm 12 h. Terminado el periodo de incubación, se tomó muestra a la mezcla homogénea para determinar por cuenta microscópica la población total y medir el porcentaje de floculación de la cepa mixta. Por decantación, se vació el 90% del volumen; el volumen remanente que contenía células activas se aforó a 200 ml con medio 5, se procedió a incubar por 12 h, a 35°C y 250 rpm. Este mismo procedimiento se repitió tres veces más.

F.- Recirculación de la vinaza.

Las fermentaciones se realizaron a nivel de vitroleros de 1.8 l conteniendo 1.350 ml del medio 5 (por duplicado) e inoculados al 10% (v/v). Se utilizó un blanco que contenía 1.350 ml de medio 2 (mosto tequilero normal) e inoculado al 10%(v/v).

Al término de cada fermentación, sin homogenizar el mosto, se tomó una muestra correspondiente al tiempo final y, por decantación, se vació el 90% del volumen dejándose el 10% (v/v) restante en el recipiente, mismo que poseía levadura activa.

Se tomaron muestras al inicio y final de la fermentación y a las muestras colectadas se les determinó azúcares totales, alcohol y peso seco.

Los mostos fermentados fueron destilados separadamente y las vinazas obtenidas en la destilación de los mostos fueron utilizadas como agua de dilución para la preparación de nuevo medio 5 para aforar a 1.5 l el volumen dejado en la anterior fermentación. De esta manera se incorporó la vinaza a un siguiente proceso fermentativo. La vinaza producida en la destilación del blanco se desechó, guardándose solo una pequeña cantidad para realizar los análisis necesarios. Este mismo procedimiento se repitió hasta recircular cinco veces la vinaza.

A las muestras colectadas se les determinó: azúcares totales alcohol, rendimiento y peso seco.

G.- Comparación del producto obtenido con otro obtenido a partir de un mosto tequilero sin vinaza (producto normal).

Los destilados obtenidos en el último ciclo de recirculación fueron comparados con los destilados de dos tequileras locales por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 A., con columna de acero inoxidable HP-20M.

VII.- RESULTADOS.

1.- PREPARACION DEL CULTIVO MIXTO L-002/024.

Para la preparación del cultivo mixto ambas cepas fueron mezcladas en la siguiente proporción: 150×10^6 cel/ ml de la cepa L-002 con 165×10^6 cel/ ml de la cepa L-024, dando una población total para el cultivo mixto de 157×10^6 cel/ ml.

2.- MEDIDA DEL PORCENTAJE DE FLOCULACION DE LAS CEPAS Y ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES DE PROPAGACION DE LA LEVADURA SELECCIONADA.

La tabla 3 muestra los porcentajes de floculación para cada cepa y medio utilizados. Los porcentajes de floculación de la cepa L-002, clasificada como floculante, fueron de 65 y 93% en los medios 2 y 5, respectivamente. Los porcentajes de floculación de la L-024 fueron del 9 y 10.5% en los medios 2 y 5, respectivamente. Los valores obtenidos con el cultivo mixto fueron del 57% y 53%, respectivamente. Con este último cultivo se llevaron a cabo experimentos de recirculación celular, concluyéndose que el porcentaje de floculación del cultivo del primero al quinto ciclo permaneció constante con un promedio del 57% (tabla 6). De este porcentaje, el 90% de la población total correspondía a la cepa L-002 y el 10% a la L-024 (figura 3).

3.- SELECCION DE UNA CEPA CON BUENA PRODUCCION DE ALCOHOL.

Los resultados de eficiencia y rendimiento alcohólico se mostraron iguales al 74% con el cultivo mixto y la cepa L-024. Se seleccionó el cultivo mixto, pues éste une la característica de la L-024 (alta productora de alcohol, de acuerdo a trabajos recientes realizados por algunos investigadores donde se obtuvieron rendimientos de 0.5 con eficiencias de 98% (24)) y la propiedad floculante, de la cepa L-002, ya que se pretendió efectuar fermentaciones semicontinuas asociadas a un reciclaje celular.

Es importante destacar que la población celular inicial, para cada ciclo, mantuvo un ritmo de incremento de población con cada ciclo. Además, se mantuvo un porcentaje de viabilidad favorable del 90% (Veáse figura 3). Estos factores podrían indicar que el medio de fermentación con vinazas estimula en cada ciclo un mayor desarrollo celular, así como la producción de alcohol. Sin embargo, esto no se observó claramente dado que existió evaporación del alcohol porque la temperatura de fermentación es lo suficientemente alta como para permitir este fenómeno, ya que que las condiciones de trabajo evitaron un control adecuado de esta variable.

4.- SELECCION DEL VOLUMEN DE VINAZA A UTILIZAR

Por otro lado, de los experimentos donde se probaron los diferentes medios, se observó que con el M2 (blanco) se obtuvo un rendimiento de 0.455 con una eficiencia del 80% mientras que con

el M5, que contenía vinazas tequileras en un 75%, los valores fueron mejores, de 0.475 y 93%. Resultados semejantes se han obtenido en investigaciones anteriores con vinazas de ingenio, donde el nivel de dilución más alto utilizado fué del 50% obteniendo buenos rendimientos (5). Los mejores rendimientos obtenidos en este trabajo se pueden deber principalmente a las características propias que posee la vinaza tequileras y a la influencia de algún componente de las vinazas, así como a la capacidad de fermentación de la levadura en este medio (25).

5.- RECIRCULACION DE LA VINAZA.

En la recirculación de la vinaza, los rendimientos obtenidos en cada ciclo comparados con respecto al patrón fueron similares, lo que demuestra que a nivel laboratorio la utilización de la vinaza no influye en los rendimientos etanol-sustrato (5). Esto es de gran importancia ya que permitirá utilizar este desecho como agua de dilución en la fermentación alcohólica. Sin embargo, los estudios aquí efectuados deberán ser probados a escalas de experimentación más altas para comprobar los resultados obtenidos, pues este trabajo sólo es preliminar. En Jalisco, la empresa Sauza utiliza periódicamente la vinaza como agua de dilución, sin embargo se desconoce el porcentaje en que se adiciona al mosto así como el propósito.

Por otro lado, se observó también una remoción de la DBO₅ (23%) después de la tercera recirculación. Debido a que se perdieron las muestras de dos últimos ciclos no fue posible apreciar el comportamiento de las DBO₅ de esos ciclos. En experimentos

realizados con recirculación de vinazas se ha venido observando que el uso periódico de la vinaza en el sistema de fermentación influye en la disminución de las DBO₅, aunque en ellos no se especifica los volúmenes empleados, ni números de recirculaciones alcanzados (5).

6.- COMPARACION DEL PRODUCTO OBTENIDO CON OTRO OBTENIDO A

PARTIR DE UN MOSTO TEQUILERO SIN VINAZA (PRODUCTO NORMAL).

La cromatografía de gases demostró que sí existen diferencias cualitativas en cuanto a composición del producto, pues se observó que hubo la reducción de un componente en el área de los picos correspondiente a los tiempos de retención (TR) de 8.99, 9.00 9.04, 9.04 y 9.02 (Ver figuras 9 a la 13). Sin embargo, comparando los patrones, figuras 9, 10 y 13, también se logra observar diferencias entre ellos, pues en la cromatografía de la figura 9 se observa la presencia de un compuesto con un TR de 6.92 ausente en la figura 10; en contraste, en esta última se encuentra un pico con un RT de 0.35 que no se encuentra presente en la figura 9. No fue posible determinar el compuesto mencionado, por no contar, en el momento de la realización del trabajo, con las columnas adecuadas para su análisis. Sin embargo, sería interesante llevar a cabo un estudio posterior para evaluar organolépticamente la calidad del producto obtenido en el proceso con recirculación de vinazas, en caso que esta prueba pueda realizarse en una planta tequilera.

VIII.- DISCUSIONES.

1.- TIEMPO DE DURACION DEL PROCESO FERMENTATIVO.

El proceso fermentativo fue llevado a cabo a 35°C con un tiempo de duración de 36 h tiempo utilizado por la mayoría de las industrias tequileras, dado que a las 36 h existe un elevado consumo de azúcares y un alta producción de alcohol (8). La adición de las vinazas al medio no retarda la fermentación sino que influye positivamente sobre el proceso, debido a los nutrientes que posee y que podrían estimular la producción de alcohol (29).

2.- MEDIDA DEL PORCENTAJE DE FLOCULACION DE LA CEPAS Y

ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES DE PROPAGACION DE LA LEVADURA SELECCIONADA.

En el experimento donde se midió el porcentaje de floculación, se apreció con claridad la propiedad floculante de la cepa L-002 que presentó un porcentaje de floculación del 65% en M2. En M5 el porcentaje de floculación fue mayor 93%, probablemente ello se debió a que en este medio existió una mayor cantidad de iones calcio que se incrementaron posiblemente con la adición de la vinaza al medio. El mosto tequilero también podría poseer este ion aunque en menor cantidad. La mayoría de los autores que han realizado estudios sobre el fenómeno, desde el punto de vista fisico-químico, coinciden en señalar por lo general, en que la floculación esta influenciada por los iones calcio (21,22 y 23).

3.- SELECCION DE UNA CEPA CON BUENA PRODUCCION DE ALCOHOL.

De las cepas estudiadas, se analizó la eficiencia y rendimiento alcohólico, cuyos valores se muestran en la tabla 4. Se aprecia que, con el cultivo mixto y con la cepa L-024 el rendimiento y eficiencia alcohólica es igual 74%. Finalmente, se seleccionó el cultivo mixto para posteriores experimentos.

4.- SELECCION DEL VOLUMEN DE VINAZA A UTILIZAR.

Los resultados promedios de los rendimientos obtenidos en las fermentaciones, donde se utilizaron los medios M3, M4, M5 y M6, que contenían vinazas, y el M2 (mosto tequilerero normal), se dan en la tabla 5. Se observa que con M5 se obtuvo el mayor rendimiento (Y p/s) de 0.475 con una eficiencia del 93%, ligeramente más alto al rendimiento y eficiencia obtenidos con el patrón que fuerón de 0.455 y 89%, respectivamente. La producción de alcohol para cada uno de los medios utilizados aparecen en las figuras 4, 5, 6, 7 y 8.

5.- RECIRCULACION DE LA VINAZA.

La recirculación de la vinaza durante cada ciclo no influyó en los rendimientos obtenidos comparados con el patrón, obteniéndose valores máximos hasta de un 80% de eficiencia con M5 en la cuarta recirculación comparado con el valor máximo del patrón que fué también del 80%. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Por otro lado, existió una disminución de la DBO₅ de las vinazas del primer ciclo 15.412 mg/l al tercer ciclo 11.771 mg/ml, existiendo una remoción del 23% (tabla 8). Las vinazas de los otros ciclos no fue posible analizarlas debido a su pérdida por contaminación durante el almacenamiento.

6. COMPARACION DEL PRODUCTO OBTENIDO CON OTRO OBTENIDO A PARTIR DE UN MOSTO TEQUILERO SIN VINAZA (PRODUCTO NORMAL).

Los análisis de cromatografía de gases de los destilados del último ciclo de recirculación, comparados cualitativamente con los cromatogramas de los destilados de dos tequileras locales, mostraron diferencias poco significativas (Figuras 9 a la 13). En las figuras se puede observar que la diferencia más visible se encuentra en la disminución del área de los picos que poseen los tiempos de retención de 8.99, 9.00, 9.04, 9.04 y 9.02 (marcado con flecha).

IV.- CONCLUSIONES.

1.- Dependiendo de la materia prima empleada en el proceso fermentativo, pueden derivarse diferentes clases de vinazas. Cada una de las vinazas difiere principalmente en calidad y sólo una minoría ha sido considerada de importancia para la investigación; un ejemplo lo constituyen las vinazas tequileras, que son fuente de contaminación pero a las vez fuente de nutrientes que pueden ser aprovechados en la fermentación alcohólica.

2.- El análisis de varianza aplicado a los rendimientos obtenidos con los medios M2, M3, M4, M5 y M6 demostraron que el uso de la vinaza en la fermentación alcohólica no influye sobre los rendimientos obtenidos; sin embargo, sí se notó una diferencia significativa en cuanto a la producción de alcohol debido a los diferentes medios probados.

3.- En la recirculación celular el porcentaje de floculación permaneció constante (57%), lo que indicó la posibilidad de usar el cultivo mixto a valores mayores.

4.- La recirculación de la vinaza no afectó al proceso fermentativo, pues se obtuvieron rendimientos muy semejantes con los medios M2 (blanco) y M5 que contenía vinazas. Asimismo, se notó una remoción de la DBO₅ hasta el tercer ciclo (23%).

5.- El análisis de cromatografía de gases, aplicado a los destilados producto de los mostos fermentados de los medios 2 y 5, comparados con los destilados de dos tequileras locales mostraron algunas diferencias. También existieron diferencias entre los patrones utilizados.

Tabla 1. PRODUCCION DE VINAZA EN EL ESTADO DE JALISCO.

Año	Producción tequila (millones de litros)	Vinaza (millones de litros)
1980	59	835
1981	47	671
1982	53	747
1983	62	875
1984	61	861
1985	52	741
1986	43	612
1987	56	787
1988	53	750

FUENTE: Muria, J. M. 1990. El Tequila. Boceto histórico de una industria. Cuadernos de difusión científica. U. de G. 18: 11 - 85.

Tabla 2. COMPOSICION QUIMICA DE LA VINAZA.	
Principales componentes:	g/l
Sólidos totales	44 - 106
Nitrógeno	0.6 - 10
Azúcares totales	9 - 18
Azúcares reductores	2 - 10
Cenizas	14 - 29
CaO	0.5 - 0.8
MgO	2 - 7
K ₂ O	6.4 - 7
P ₂ O ₅	1.4 - 3.2

FUENTE: Cabib, G., H. J. Silva, A. Guilletty & R. Ertola. 1983.
 The use of sugar cane stillage por single cell protein
 production. J.Chem. Technol. Biotechnol. 33 B(1): 21-28.

Tabla 3. PORCENTAJES DE FLOCULACION DE LAS CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.		
CEPA	% floculación	
	MEDIO 2	MEDIO 5
L-002	65	93.2
L-024	9	10.5
L-002/L-024	53	56

CONDICIONES: 35°C, incubadas 12 h a 250 rpm.

Tabla 4. RENDIMIENTOS Y EFICIENCIAS OBTENIDOS CON LAS CEPAS DE SACCHAROMYCES.		
CEPA	Y p/s (g/g)	E (%)
L-002	.360	71
L-024	.378	74
L-002/L-024	.378	74

CONDICIONES: Medio M2, 36 h, 35°C, inóculo 10%(v/v).
 Y p/s: Rendimiento = $\frac{g \text{ Etanol producido}}{g \text{ Azúcar consumido}}$.

E: Eficiencia = $\frac{\text{Rendimiento}}{0.51} (100)$

Tabla 5. RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS CON VINAZAS.		
MEDIOS (vinaza)	Y p/s (g/g)	E(%)
M2 (0%)	.455	89
M3 (25%)	.434	85
M4 (50%)	.386	78
M5 (75%)	.475	93
M6 (100%)	.376	74

CONDICIONES: 36 h, 35°, inóculo del 10%(v/v).

Tabla 6. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA RECIRCULACION CELULAR L-002/024.	
CICLO	Porcentaje de floculación
1	57
2	58.3
3	55
4	60
5	54

CONDICIONES: M5, 35°C, incubadas 12 h a 250 rpm.

Tabla 7. COMPARACION DE RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LA RECIRCULACION DE LA VINAZA.			
CICLO	MEDIO	Y p/s (g/g)	E (%)
1	M2 (Blanco)	.337	66
	M5	.360	70
2	M2	.434	80
	M5	.406	79
3	M2	.475	79
	M5	.373	73
4	M2	.287	56
	M5	.413	80
5	M2	.355	69
	M5	.380	75

CONDICIONES: 36 h, 35°C.

Tabla 8. RESULTADOS DE LAS DBO ₅ DE LAS VINAZAS DEL PRIMER Y TERCER CICLO DE RECIRCULACION.		
Ciclo	MEDIO	DBO ₅ (mg/l)
1	Blanco	26690
	M5	15412
3	Blanco	28264
	M5	11798

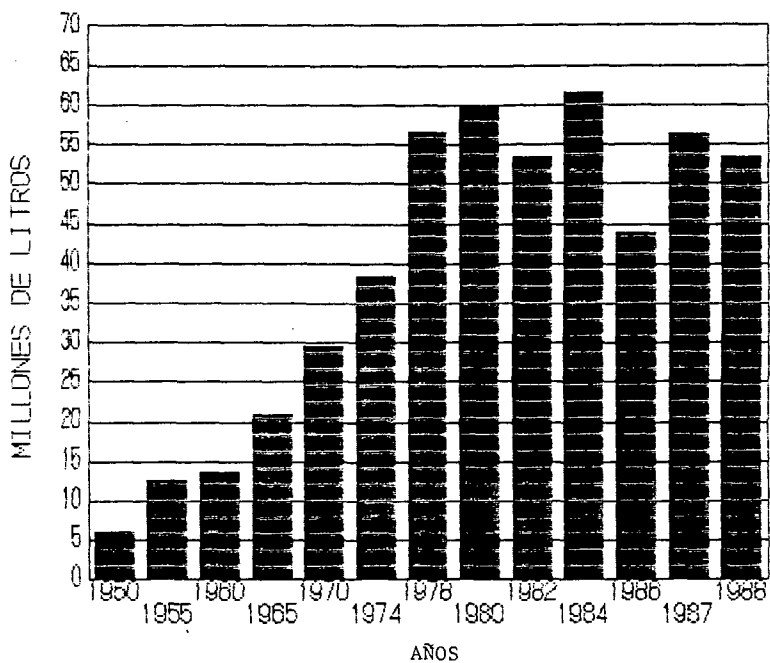


FIGURA 1. Incrementos en la producción de tequila en el período de 1950 a 1988.

FUENTE: Muria, J. M. 1990. El Tequila. Boceto histórico de una Industria. Cuadernos de difusión científica. U. de G. 18 11 - 85.

Procesamiento del agave.

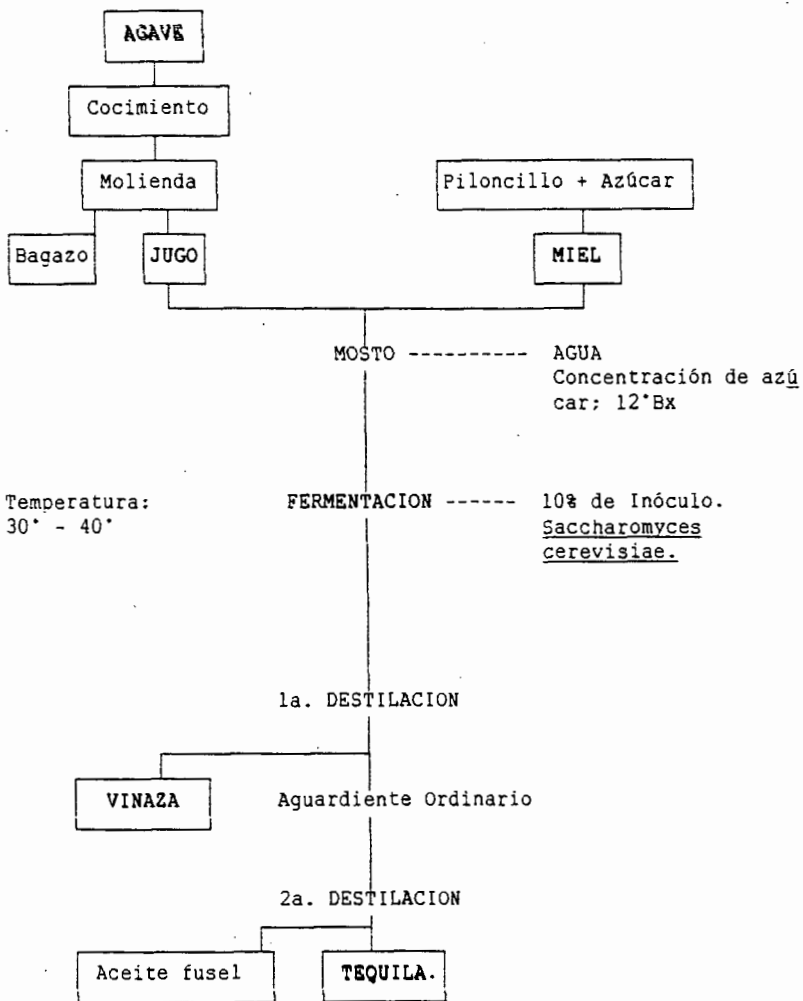


FIGURA 2. ESQUEMA DEL PROCESO DE PRODUCCION DE ALCOHOL A PARTIR DE JUGO DE AGAVE.

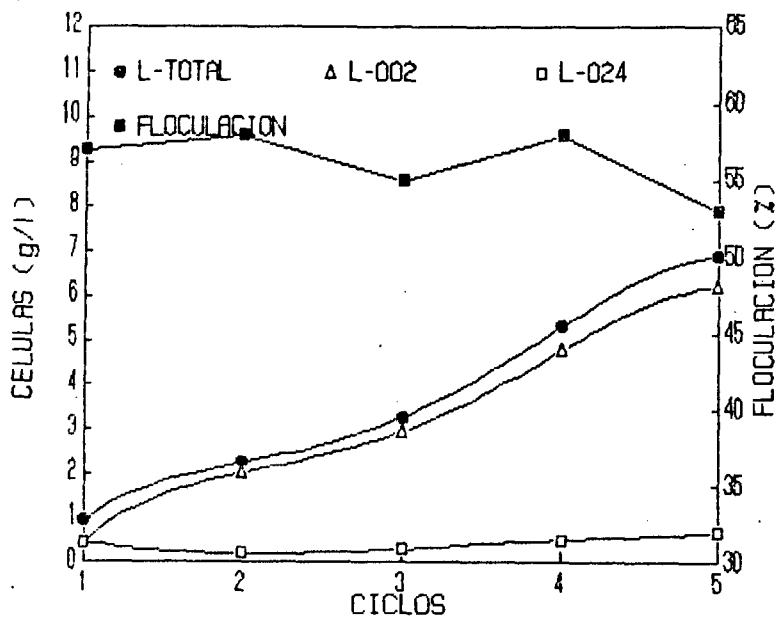


FIGURA 3. Nivel de floculación y concentración de inóculo en los experimentos de recirculación de vinazas.

CONDICIONES: M5, cepa L-002/024, 35°C.

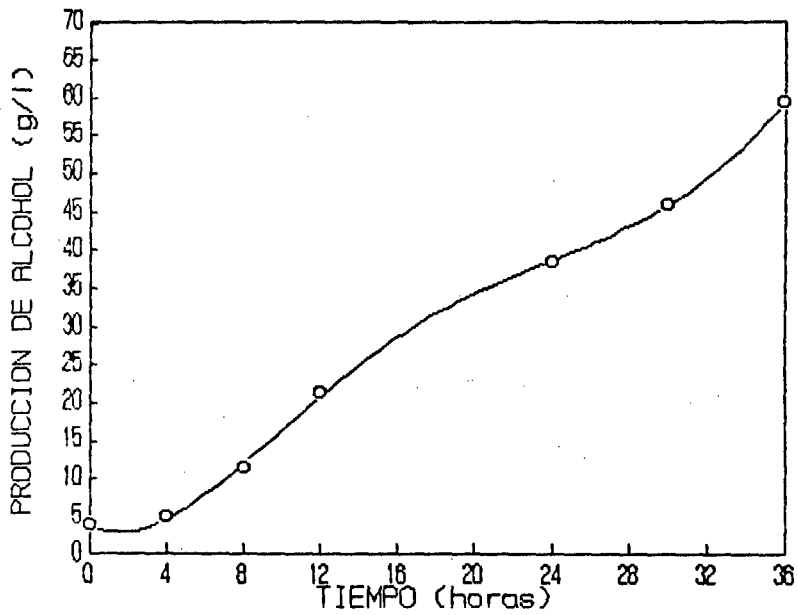
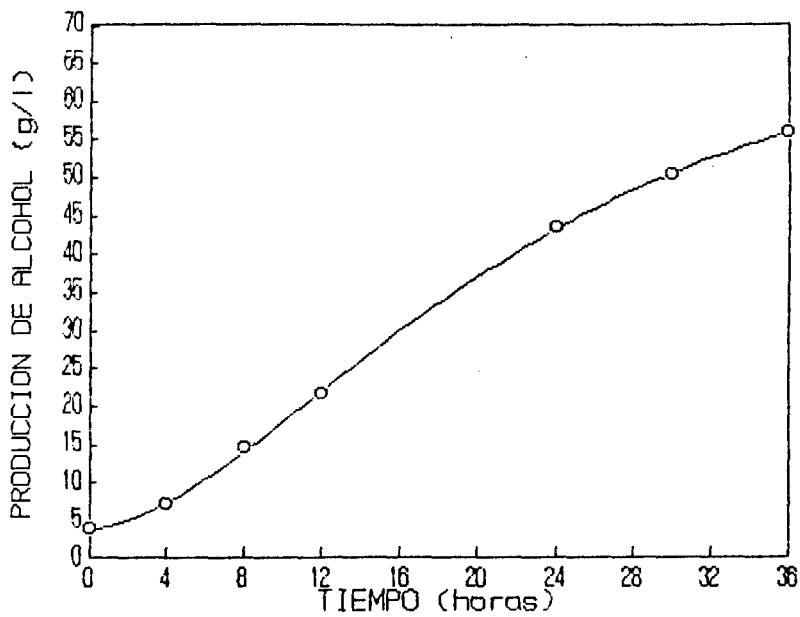


FIGURA 4. Producción de alcohol en M2(Mosto tequilero normal).

CONDICIONES: Cepa L-002/024, 35°C, inóculo del (10% v/v).



-FIGURA 5. Producción de alcohol en M3(Mosto diluido con un 25% de vinaza).

CONDICIONES: Cepa L-002/024, 35°C, inóculo del (10% v/v).

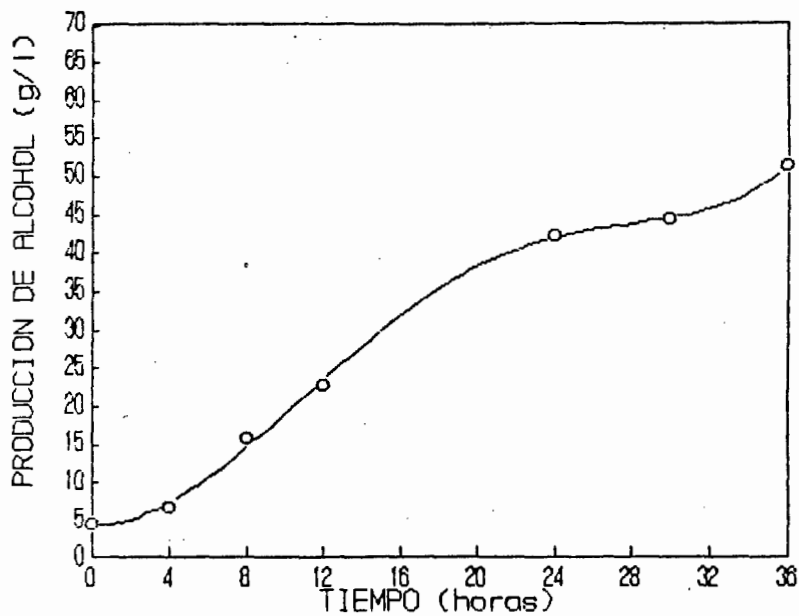


FIGURA 6. Producción de alcohol en M4(mosto diluido con un 50% de vinaza).

CONDICIONES: Cepa L-002/024, 35°C, inóculo del (10% v/v).

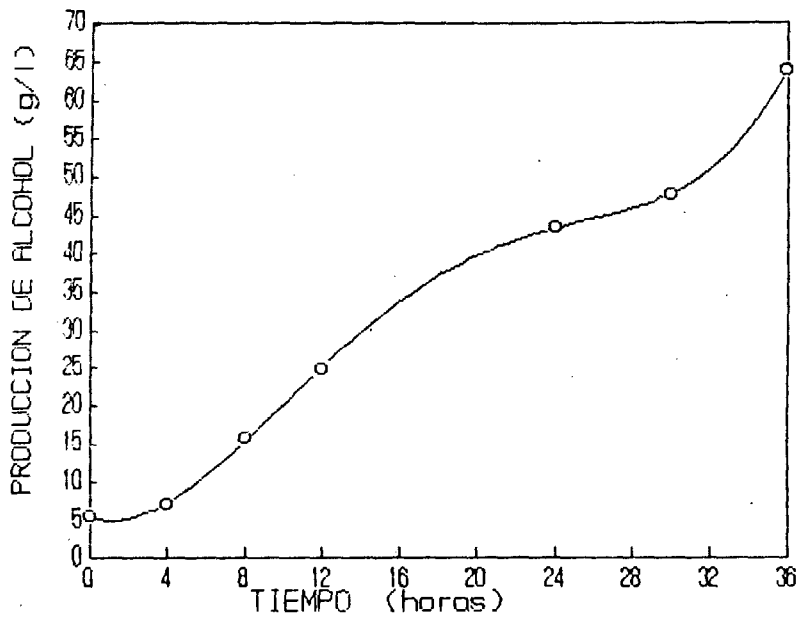


FIGURA 7. Producción de alcohol en M5 (Mosto diluído con un 75% de vinaza).

CONDICIONES: Cepa L-002/024, 35°C, inóculo del (10% v/v).

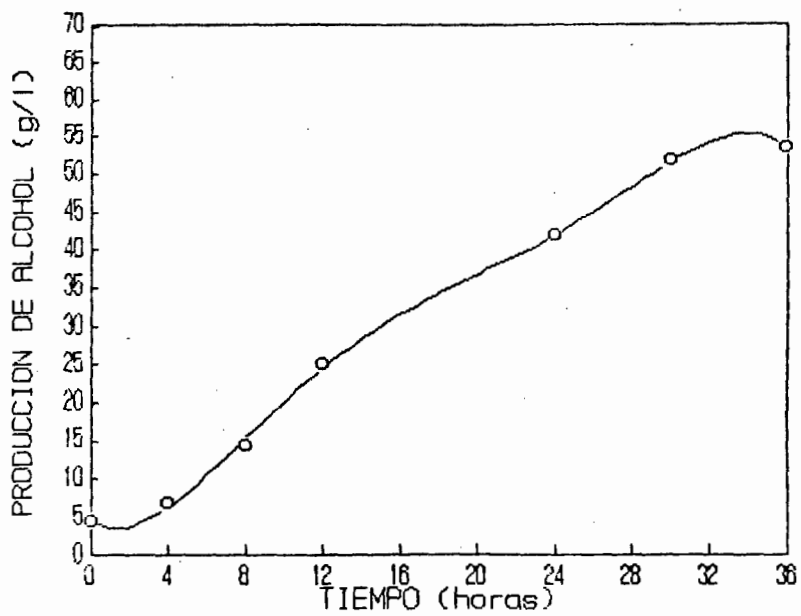


FIGURA 8. Producción de alcohol en M6(Mosto diluido con un 100% de vinaza).

CONDICIONES: Cepa L-002/024, 35°C, inóculo del (10% v/v).

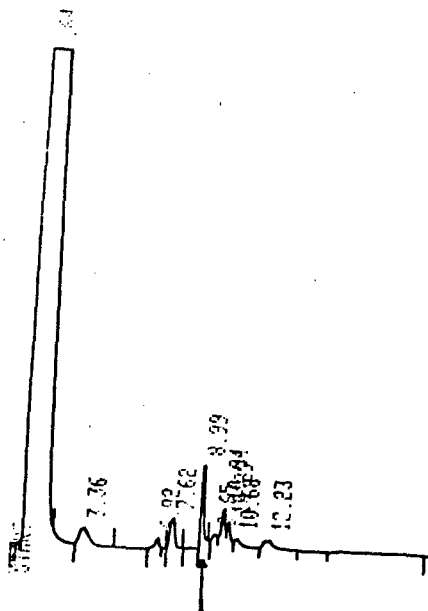


FIGURA 9. Cromatografía de destilado de alcohol a partir de mosto tequilero, obtenido de una la. tequilera local.

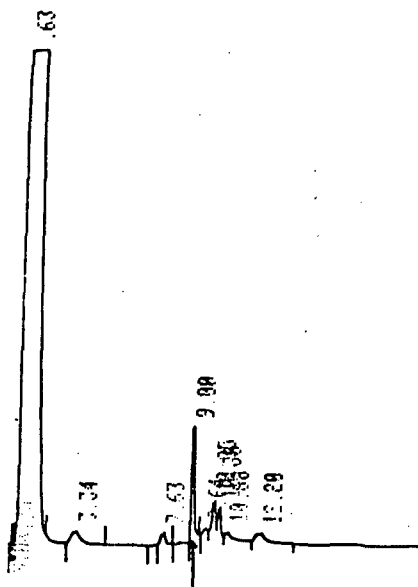


FIGURA 10 Cromatografía de destilado de alcohol a partir de mosto tequilero, obtenido de una 2da. tequilera local.

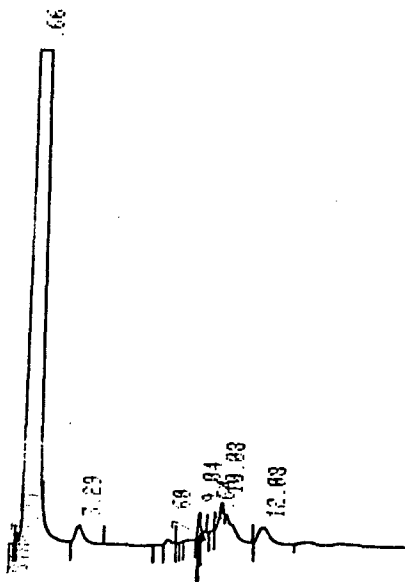


FIGURA 11 Cromatografía de destilado de alcohol a partir de de M5 después de la última (5a.) recirculación de la vinaza.

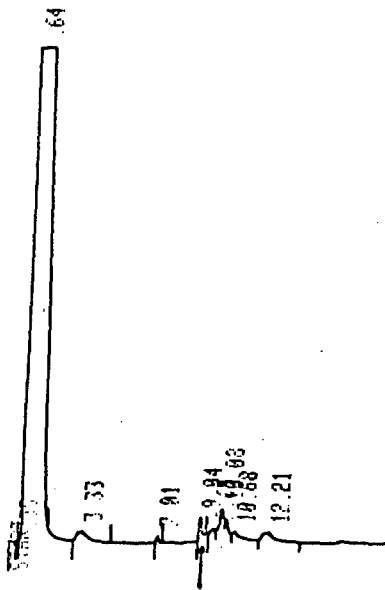


FIGURA 12 Cromatografía de destilado de alcohol a partir de de M5, (1a.) recirculación de la vinaza.

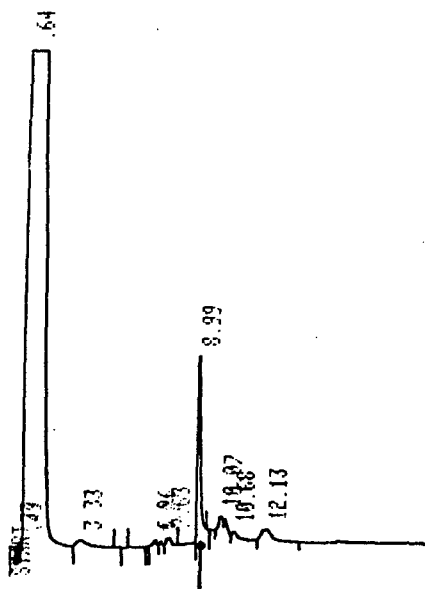


FIGURA 13 Cromatografía de destilado de alcohol a partir de de M2 (mosto tequilero normal preparado en el laboratorio).

APENDICE 1

CALCULO DEL RENDIMIENTO Y EFICIENCIA ALCOHOLICA.

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

$$Y \text{ p/s} = \frac{\text{g Alcohol producido}}{\text{g Azúcar consumido.}}$$

- 2.- (E) de fermentación se calcula en base al máximo teórico por una regla de tres.

*0.51 ----- 100% de eficiencia

Y p/s ----- X

* El 0.51 se obtiene:



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

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

APENDICE 2

ANALISIS ESTADISTICO DE RENDIMIENTOS Y EFICIENCIAS.

- 1.- Análisis de varianza aplicado a rendimientos obtenidos con los medios M2, M3, M4, M5 y M6.

VARIABLE RESPONSABLE: Rendimiento.

FUENTE	SUMA	GRADOS	MEDIA	F-CAL. ¹	Fo.05 TAB. ²
VARIACION	CUADRADOS	LIBERTAD	CUADRADOS		
TOTAL	.0221809	9			
MEDIOS	.0170447	4	.0042612	4.148	5.19
ERROR	.0051362	5	.0010272		

Debido a que la F- calculada 4.148 obtenida en este análisis de varianza es menor a la de tablas 5.19 se establece que no existe diferencia significativa en cuanto a rendimientos debido a los diferentes medios probados.

F¹ = F- Calculada.

F² = F- Tablas

2.- Análisis de varianza aplicado a la producción de alcohol obtenido con los medios M2, M3, M4, M5 y M6.

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: Etanol.

FUENTE	SUMA	GRADOS	MEDIA	F-CAL.	Fo.05TAB.
VARIACION	CUADRADOS	LIBERTAD	CUADRADOS		
TOTAL	179.20323	9			
MEDIOS	160.16371	4	40.040927	10.515	5.19
ERROR	19.03952	5	3.807903		

Debido a que la F- calculada 10.515 obtenida en el análisis de varianza es mayor a la de tablas 5.19 se establece que si existen diferencias significativas en la producción de alcohol debido a los diferentes medios probados.

APARTADO E

PORCENTAJES DE FLOCULACION DE LAS CEPAS DE
SACCHAROMYCES EN SOLUCION SALINA.

CEPA	FLOCULACION (%)
L-024	17.5
L-002	50.1
L-002/024	30

REFERENCIAS.

1. Sturi6n, C. A., 1988. Tecnologia de producci6n de alcohol por fermentaci6n. GEPLACEA. 25 - 28
2. Bowen, R. W., & R. J. Coodee 1989. Estudios de *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 33 706 - 715
3. Maiorella, B. Ch., R. H. Wilke, W. Blanch. 1981. Production and recovery advances in *Biochem. Engen*, edited by *Flecher Bioenerg.* 43 - 92
4. Presscot & Duun. 1962. Producci6n industrial de alcohol por fermentaci6n. *Microbiologia Industrial*. 3ra. Edici6n. 110-133.
5. Sheehan, G.J. & Greenfield. 1979. Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. *Departament of Chemical engineering, University of Queensalnd. St. Lucia QLD 4067. Australia*, 257 - 273.
6. Maia, A.B.R.A.; P. Strehalano and G. Goma. 1987 *Tecnologias alternativas para a fermentacao alco6lica em Saccharomyces cerevisiae. Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 175 - 182

7. Moriella, B.L., H. W. Blanch., C. R. Wilke. 1984. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*. 26 1003 - 1025
8. Rivera, C.J. 1988. Los agaves mezcaleros en México. *Información Científica y Tecnológica*. 10 (147): 5 - 8
9. Muria, J. M. 1990. El Tequila. Boceto histórico de un a industria. Cuadernos de difusión científica. U. de G. 11-85
10. Pérez de la Vega B. A. 1988. Efectos de las descargas de las industrias tequileras sobre las poblaciones de macroinvertebrados bentónicos en el arroyo de Atizcoa, Municipio de Tequila, Jalisco. México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U. de G. Guadalajara, Jal.
11. Lewicky, W. 1988. Production application and marketing of concentrated molasses-fermentation-efluent (vinasses), 12 - 13
12. Almazan, O. 1968. Utilización de mostos residuales para la producción de levadura de Forraje (Torula) ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar. 2(2): 17 - 26

13. Sánchez, E., L. Travieso, C. Ramos, M. León, R. Sánchez, I. Berdan, M. López. 1989. Tratamiento anaerobico avanzado del residual de destileria. Centro Nacional de Investigaciones Cientificas. La Habana Cuba.
14. Lozano, P.E. 1988. Tratamiento anaerobio de vinazas tequileras en un reactor empacado Jalisco. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U. de G. Guadalajara, Jal.
15. Mansur, M., M. Suárez, M., L. M. Hernández, I Williams, I. Z. Zuaznaba. 1988. Uso de vinaza de destileria en la producción de alcohol. ICIDCA, Cuba. 135 - 139
16. Peraza, L.F. 1991. Comunicación personal.
17. Peraza, L.F. 1989. Estudio de alternativas tecnológicas (Procesos y Equipos) para el tratamiento de vinazas de la industria azucarera y tequilera. Propuesta CONACYT. CIATEJ. A.C.
18. Thomas, L. C., G.J. Chamberlin. 1980. Colorimetric Chemical Analytical Methods. 9th edition.
19. Dubois, M., J. K. Hamilton., P. A. Rebers, & F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytit Chem. 28(3); 350 - 356

20. APHA Standard methods. (1989) American Public Health Association. AWWA 17th ed.
21. Stratford, M. & H. M. Brundish. 1990. Yeast Flocculation: Cationic Inhibition. 6 77 - 86.
22. Stratford, M. (1989) Yeast Flocculation: Calcium Specificity. Yeast 5: 487-496.
23. Amri, M.A., R. Bonaly, B. Duteutre, & M. Moll. 1979. Growth and Flocculation of two Saccharomyces uvarum Strains. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7; 227-234.
24. Pinal, Z. L. 1990. Comparación de la producción de alcohol de cuatro cepas de Saccharomyces cerevisiae . Tesis Profesional. U de G. Guadalajara, Jal.
25. Tamayo, C. E. (1984) Estudio Microbiológico de las levaduras productoras de alcohol, encaminado a obtener una cepa de alto rendimiento. Tesis, UAY Mérida, Yucatán.
26. Peraza, L. F. & Juárez S. M. (1991) Aprovechamiento de las vinazas tequileras en la fermentación alcohólica. Tesis Profesional. U de G. Guadalajara, Jal.

27. Cabib, G., H. J. Silva, A. Guilietty & R. Ertola. 1983. The use of sugar cane Stillage for single cell protein production. J. Chem. Technol. Biotechnol. 33; 21-28.

28. Satyawati, S. 1989 Biomethane Production from fermented substrates. Journal of Fermentation an Bioengineering. 68 295-301.

29. Jones, R. P., Pamment & Greenfield. 1981. Alcohol Fermentation by yeast - The efect of Environmental and other variables. Process Biochemistry 16 (3).