

1987-2

REG. No. 080230354

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"EVALUACION DE LA TOLERANCIA AL ETANOL DE DOS CEPAS
DE *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

DAVID SANTOS RODRIGUEZ GARCIA

GUADALAJARA, JALISCO,

1990.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número 1256/90.....

SR. DAVID SANTOS RODRIGUEZ GARCIA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO DE EVALUACION DE LA TOLERANCIA A ETANOL EN DOS CEPAS DE -- Saccharomyces cerevisiae" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la M. en C. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara Jal., 30 de Agosto de 1990
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORTA

c.c.p. La M. en C. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil; Directora de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno
cglr.



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

Septiembre 10 de 1990

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS C.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Estimado Ing. Adolfo Espinoza:

Por este medio comunico a usted que el joven David Santos Rodríguez García, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de la tesis titulada: "EVALUACION DE LA TOLERANCIA AL ETANOL DE DOS 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 para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E


M.C. INGRID M. RODRIGUEZ BUENFIL.

A G R A D E C I M I E N T O S

A MIS PADRES

Por darme la vida y ser la guía de mis acciones.

JESUS Y ROSARIO

Por su dedicación y apoyo constante.

A MIS HERMANOS

Con cariño.

A todas aquellas personas que significan un impulso de superación en la vida (abuelos, José, Esperanza, Jhovany, Manuel).

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., por permitir todas las facilidades para realizar este trabajo.

A la M. C. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil por su aprendizaje recibido, el apoyo y dedicación, y por todas las atenciones prestadas como guía en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos por el apoyo y consejos que me brindaron para la realización de esta tesis.

Verdaderamente muchas gracias.....

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

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

CON LA DIRECCION DE LA M.C.
INGRID M. RODRIGUEZ BUENFIL.

EVALUACION DE LA TOLERANCIA AL ETANOL
DE DOS CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

DAVID SANTOS RODRIGUEZ GARCIA

RESUMEN

Se evaluó la tolerancia al etanol de dos cepas de Saccharomyces cerevisiae, una de registro de CIATEJ (BCGC-L-024) y la otra utilizada industrialmente en el ingenio de Tala, Jalisco, tomando como base las respuestas de velocidad de crecimiento, porcentaje de viabilidad y velocidad de producción de alcohol.

El etanol fué adicionado al medio en concentraciones del 5 al 14 % v/v para las pruebas de velocidad de crecimiento y porcentaje de viabilidad; y del 4 al 21 % v/v para las pruebas de velocidad de producción de alcohol. El efecto de inhibición se estableció comparándose contra un testigo al que no se le adicionaba etanol.

La cepa BCGC-L-024 demostró tener mayor tolerancia al etanol que la cepa del Ingenio, teniendo un rango de tolerancia del 5 al 14 % para crecimiento y viabilidad; y para la velocidad de producción de alcohol del 4 al 7 % y del 14 al 18 %.

Mientras que la cepa del Ingenio tiene un rango de tolerancia del 5 al 14 % para viabilidad, solo tolera el 5 % para crecimiento y para la habilidad fermentativa no presenta unidades aceptables para su tolerancia.

Los rangos de tolerancia se definieron tomando como parámetro una inhibición máxima del 50 % para la velocidad de crecimiento y de producción de alcohol, y un 20 % para la viabilidad.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
III. HIPOTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
V. MATERIALES Y METODOS	23
VI. RESULTADOS	33
VII. DISCUSION	47
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. FIGURAS	59
X. TABLAS	85
XI. ANEXOS	99
XII. BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUCCION

I. I N T R O D U C C I O N

En la actualidad el hablar de recursos energéticos a nivel local y mundial es un punto central que guarda un elevado interés, ya que de éstos dependen en cierta forma el desarrollo, y la estabilidad económica de los países que los poseen y de quienes no.

Recientemente con la crisis energética a nivel mundial, y en particular la del petróleo, a suscitado que varios países que ven disminuidos sus recursos energéticos opten por encontrar fuentes alternas que suplan sus necesidades.

Una posible alternativa de fuente de energía es el alcohol producido por fermentación, el cual puede ser obtenido a partir de diversas fuentes de azúcares de bajo costo y de gran abundancia en la naturaleza.

La biotecnología se ha caracterizado últimamente por el desarrollo de procesos novedosos, y por la optimización de los procesos ya existentes en materia de fermentación, haciendo que éstos logren aumentar su productividad, eficiencia y rentabilidad.

ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

Con el adelanto de la química orgánica a mediados del siglo XIX, el alcohol se constituye como producto químico indispensable usándose como combustible, solvente y en algunos casos como materia prima para producir compuestos orgánicos.

A principios de siglo la demanda de alcohol se ve incrementada debido a las conflagraciones mundiales y se opta por la producción de alcohol sintético, el cual se obtiene a partir del etileno (Sturion, 1988).

Posteriormente con la crisis energética del petróleo en la década de los 70's y por consiguiente el aumento del etileno, la industria de la producción de alcohol por fermentación ha cobrado gran importancia sobre todo en países en donde sus recursos energéticos han disminuido en los últimos años. Brasil, India, Estados Unidos, Union Soviética, Nueva Zelanda, entre otros son países ejemplo, donde utilizan el etanol como combustible en sustitución de, o mezclado con, gasolina para automóviles, reduciendo de este modo el consumo de gasolina. (Moreira y Goldemberg, 1981).

Actualmente el problema energético a nivel mundial cada vez va en aumento, nuevas fuentes están siendo empleadas con el objeto de diversificar el abasto de energía cuya demanda se ha vuelto un problema de primer orden; las soluciones a esto se han suscitado en distintas ramas de la ciencia y la tecnología.

En las últimas décadas la biotecnología ha venido ofreciendo

nuevas y mejores alternativas para industrias como la alimenticia, farmacéutica, agrícola, minera y de alcohol entre otras más.

Es específicamente en la industria del alcohol en donde la biotecnología ha desarrollado procesos novedosos y está optimizando los ya existentes en materia de fermentación, haciendo que logren aumentar su productividad, eficiencia y rentabilidad (Concheiro, 1985).

Los procesos de fermentación requieren, en general, una serie de operaciones unitarias cuyo objetivo es la conversión de un sustrato dado (fuente de carbono) en un producto final, utilizando un microorganismo como biotransformador.

Estas operaciones unitarias pretenden, tanto cubrir los requerimientos nutritivos necesarios para el crecimiento y la formación del producto, como el control del medio ambiente para la optimización del proceso. (Pellón, 1986).

Dentro de las operaciones unitarias del proceso de fermentación, el microorganismo es el punto central de este estudio el cual será evaluado para determinar los valores de tolerancia al etanol, esto como una etapa que permita elevar la productividad y los rendimientos de la industria.

2.1 FACTORES EMPLEADOS EN LA FABRICACION DE ETANOL.

(Presscot y Dunn, 1976; Kirk y Othmer, 1981; Correa, 1978).

Los procesos empleados en la fabricación de etanol por fermentación dependen esencialmente de varios factores:

1.- Materias primas.

Son productos agrícolas o subproductos industriales, como mieles, bagazo, maderas, melazas, líquido de maceración del maíz, etc..

El bajo precio, el rendimiento elevado, la comodidad en la manipulación, la posibilidad de obtener un suministro continuo durante todo el año, la proximidad del mercado y la pureza, son los principales factores que intervienen en la selección de la materia prima.

Las materias primas sacaroides (melazas, jugo de caña y mieles) requieren, por lo general, poco o ningún tratamiento preliminar aparte de la dilución, siendo el agua el diluyente más usual.

Las materias amiláceas (papa, maíz, yuca, etc.) y las celulósicas (bagazo, maderas, etc.) tienen que ser hidrolizadas a azúcar fermentable antes de que actúen sobre ellas las levaduras.

2.- Concentración óptima de azúcar.

El contenido de carbohidratos determina el rendimiento y en la mayoría de los casos el valor de la materia prima.

3.- De un pH óptimo.

Los neutralizantes reducen el exceso de acidez o alcalinidad y ayudan a establecer y mantener el pH requerido en el sustrato. El exceso de acidez puede deberse a la materia prima, a los ácidos usados para la hidrólisis, a los ingredientes nutritivos añadidos al sustrato, o bien producirse por la acción de los microorganismos sobre los carbohidratos.

El exceso de alcalinidad puede tener su origen en las materias primas, en el agua empleada para la dilución, en el tratamiento

alcalino del medio y en el amoníaco, producido por la desaminación microbiana.

El pH final óptimo depende de la especie del microorganismo usado, de la reacción deseada y de las condiciones del proceso.

4.- Temperatura.

La temperatura inicial óptima depende de factores análogos a los que controlan el pH. Aunque la mayoría de los microorganismos toleran intervalos de temperatura amplios, existen intervalos óptimos tanto para el crecimiento como para la acción enzimática.

5.- Adición de sustancias nutritivas.

Los nutrientes microbianos son los compuestos del sustrato asimilables por el microorganismo. La materia prima contiene a menudo suficientes sustancias nutritivas; cuando la propagación del microorganismo es el principal objetivo conviene fomentar su proliferación, los ingredientes añadidos desempeñan un papel esencial. Para la mayoría de las materias primas, los suplementos más necesarios son los compuestos de nitrógeno y fósforo. El nitrógeno suele proporcionarse en forma de sales de amonio, urea, aminoácidos, etc; el fósforo se añade en forma de fosfato de amonio o fosfatos alcalinos.

La adición de elementos traza como Mg, Fe, Co, Ca, Ni, Zn, Cu, necesarios en la síntesis de enzimas y de factores de crecimiento, así como también vitaminas, precursores de vitaminas o precursores de antibióticos, son práctica usual.

6.- Inhibición del crecimiento bacteriano.

A veces se añaden antisépticos a un sustrato para proteger a los

principales microorganismos contra las infecciones que les disputan los nutrientes. Así se puede hacer mención que la levadura (después de varias generaciones) puede adaptarse a pequeñas cantidades de ácido sulfúrico, ác. láctico y compuestos de flúor, sustancias que se usan para impedir las infecciones por bacterias. La levadura adaptada puede entonces propagarse y hacer fermentaciones sin ninguna interferencia.

7.- Elección de un microorganismo apropiado.

La elección de un microorganismo no solo se limita a que pueda efectuar la reacción deseada, sino el que pueda efectuar el cambio bioquímico necesario en poco de tiempo y que produzca el rendimiento máximo posible con un mínimo de atención. El microorganismo apropiado debe también mantener su actividad de una generación a otra y combatir infecciones. Aunque muchas cepas de una especie no satisfacen todos los requisitos de un proceso especial, suele ser posible encontrar, adaptar o mutar cepas específicas con cualidades adecuadas.

Una levadura con gran resistencia al alcohol ofrece una ventaja neta desde el punto de vista técnico y biológico. Con esta levadura es posible obtener un mosto fermentado, con una gran riqueza alcohólica, lo que mejora considerablemente la potencia de la instalación, tanto de fermentación como de destilación; simultáneamente, se consigue una destilación más económica, puesto que hay un gasto menor de combustible. Con una levadura resistente a concentraciones elevadas de alcohol, es posible fermentar mostos con mayor concentración de azúcar, lo que evita

tener que diluir mayormente.

A. una buena levadura industrial no debe perjudicarla en su actividad fermentativa una concentración de 8 a 9 % (v/v) de alcohol.

2.2 PROCESO GENERAL DE FABRICACION DE ETANOL.

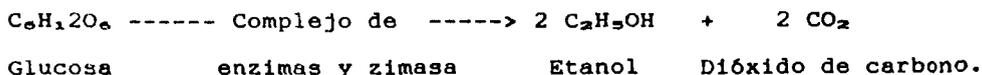
El proceso general de la fabricación de etanol en los ingenios se muestra en la fig. 1 ; el sistema de fermentación empleado aquí es el sistema clásico batch o por lote.

Primeramente se prepara el mosto, luego es inoculado con el microorganismo e incubado permitiendo el procedimiento bajo condiciones fisiológicas óptimas. En el curso íntegro de la fermentación suele ser añadido un agente antiespumoso, oxígeno si es requerido y un ácido o base que controle el pH. (Crueger y Crueger, 1984).

Así tenemos que las melazas se ajustan a las concentraciones de azúcar deseadas por la dilución con agua, a una temperatura determinada, al pH requerido por la adición de ácido y nutrientes si son necesarios. Se mezcla una levadura iniciadora (aislada en cultivo puro) con el mosto en el tanque de fermentación, que frecuentemente alcanza cantidades de miles de litros; por lo general estos tanques son cubiertos. Se realiza la mezcla, la fermentación comienza rápidamente con el desprendimiento de grandes cantidades de CO_2 , al término de 50 hrs. o menos, la fermentación suele estar terminada (Presscot y Dunn, 1976).

2.3. MECANISMO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHOLICA

Una ecuación que representa simplemente el proceso total por el cual una molécula de glucosa es transformada en dos moléculas de etanol y dos de CO₂ es la siguiente:



En realidad, intervienen gran número de reacciones estrechamente relacionadas que las dividen en pasos de oxidación-reducción y fosforilación y ciertas reacciones especiales. Todas estas reacciones son catalizadas por enzimas muy específicas. (tabla 1) (Rose A. H., 1980)

En el esquema de la fermentación alcohólica (fig. 2) se representa todo el proceso, que se basa principalmente en los trabajos de investigación de Embden-Meyerhof-Parnás siendo la vía principal para la producción de etanol por levaduras (Lehninger A. L., 1985).

La vía de la fermentación alcohólica es idéntica a la descrita para la glucólisis excepto en la etapa final, catalizada por la lactato-deshidrogenasa, que es sustituida por otras dos etapas enzimáticas.

En la primera etapa, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y CO₂ por medio del enzima piruvato-descarboxilasa, que no se encuentra en los tejidos animales.



La descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y CO_2 es esencialmente irreversible. La piruvato-descarboxilasa precisa de Mg^{2+} y posee un coenzima unido íntimamente, el pirofosfato de tiamina. La descarboxilación del piruvato se produce a través de una serie de intermediarios unidos covalentemente al pirofosfato de tiamina.

En la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetaldehído se reduce a etanol y el $\text{NADH} + \text{H}^+$ aporta el potencial de reducción y la reacción es catalizada por el enzima alcohol deshidrogenasa:



El etanol y el CO_2 son, por tanto, los productos finales de la fermentación alcohólica, cuya ecuación global puede describirse del modo siguiente:



Las etapas de conversión de la energía que conducen a la formación de ATP, son idénticas tanto en la glucólisis como en la fermentación alcohólica.

2.4. EL MICROORGANISMO.

El microorganismo a utilizar es parte esencial en el proceso de fermentación, de aquí que se realicen manipulación genética, regulación del metabolismo por la optimización en el medio de cultivo, entre otros, para obtener el producto deseado. (Crueger y Crueger, 1984).

Tradicionalmente el etanol ha sido producido en fermentaciones con especies de levaduras, Saccharomyces cerevisiae y S. carlsbergensis (variedad uvarum) así como Candida sp. y Kluyveromyces sp., entre otras, a partir de fuentes renovables ricas en azúcares como glucosa y sacarosa (caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, maíz, trigo, etc.) (Concheiro, 1985).

Las cepas de Saccharomyces cerevisiae difieren en su habilidad para permanecer viables en la presencia de etanol. (Kalmokoff e Igledeu, 1985).

Otros autores mencionan que la tolerancia al etanol por levaduras, depende en gran medida de la composición del medio en el cuál ha sido evaluado.

Se sabe que la máxima concentración de etanol, es característica de los diferentes procesos de fermentación alcohólica, dependiendo más de la composición del medio, que de la tolerancia al etanol intrínseca de las cepas que se utilizan en la industria. (Nabais R. C. y colaboradores, 1988).

Los mayores efectos que ocasiona el etanol en levaduras son:

- 1.- Disminución en el índice de crecimiento.
- 2.- Disminución de los niveles de viabilidad.
- 3.- Disminución en el índice de fermentación. (Kalmofoff e Iglew, 1985).

El método clásico para evaluar el efecto del etanol en las levaduras es el de incorporarlo al medio, en el crecimiento de una fermentación controlada o por lote.

Otros investigadores han elegido la propiedad de la tolerancia al etanol sobre la actividad fermentativa de las células. Por ejemplo, Nojivo y Ouchi (1962) (en Stewart y Russell, 1985) encontró que la tolerancia de las cepas de levadura caen dentro del rango de 20-30 % (p/v) de etanol; sin embargo fué difícil encontrar diferencias en la tolerancia de varias cepas de levaduras, entre las cuales están las de cervecera, saké, destilerías y de panificación.

En general las levaduras utilizadas en cervecera tienen una moderada tolerancia, mientras que estas mismas al ser utilizadas en destilerías tienen una gran tolerancia. (Stewart y Russell, 1985).

2.5. PARAMETROS UTILIZADOS PARA DEFINIR LA TOLERANCIA AL ETANOL.

El grado en el cual el etanol afecta la actividad fermentativa ha sido utilizado como índice de tolerancia a etanol (Kalmokoff e

Igledew, 1985).

Varios investigadores han definido la tolerancia como el índice de la actividad fermentativa entre las células con y sin la presencia de etanol. Existen dos problemas asociados con los sistemas de medición de este tipo:

- 1.- La tolerancia es establecida en términos de proporción y no como una concentración precisa de etanol.
- 2.- Comparaciones a un solo nivel de etanol no pueden ser indicativo para toda la inhibición cinética. (Kalmokoff e Igledew, 1985).

2.6. BASES FISIOLÓGICAS DE LA TOLERANCIA AL ETANOL.

Se han realizado investigaciones dentro de las bases fisiológicas de la tolerancia al etanol en levaduras. Existen dos áreas de fisiología celular que parecen estar influenciadas por las altas concentraciones de etanol.

I.- La primera de éstas se da en macromoléculas intracelulares y en particular de las enzimas glucolíticas.

En las levaduras existen enzimas que catalizan reacciones convirtiendo la glucosa en etanol y CO_2 . Nagadawitana y colaboradores, (1977) (en Stewart y Russell, 1985) mencionaron una inhibición no competitiva de la actividad de la hexoquinasa por etanol.

Además se encontró que la fosfofructoquinasa no fue afectada en las condiciones de este estudio. Un estudio más extensivo del efecto del etanol en la vía glucolítica ha sido reportado por

Miller y colaboradores, (1982)(en Stewart y Russell, 1985), en donde la frutosa-1-6-difosfatoaldosa, la gliceraldehído-p-deshidrogenasa y la piruvato-descarboxilasa fueron las más sensibles a la presencia de etanol.

Además Nabais y colaboradores, (1988) señalan que para un crecimiento y fermentación óptimas, las levaduras requieren de cantidades muy pequeñas de varios cationes inorgánicos que pueden actuar en la actividad enzimática participando en las reacciones catalíticas, como activadores o estabilizadores .

2.- La segunda área en la interacción del etanol corresponde al grado y la manera en la cuál el narcótico llega a asociarse con la membrana plasmática.

El etanol es una molécula anfipática, pero es más hidrofílica que hidrofóbica. Sin embargo, el etanol puede llegar a concentrarse en el grosor de la membrana biológica, y por lo tanto la concentración de etanol es mayor en las regiones más acuosas de la membrana. (Stewart y Russell, 1985).

Se han realizado estudios sobre el efecto en el proceso de transporte de la membrana plasmática de S. cerevisiae, Rose (1980 ; 1982)(en Stewart y Russell, 1985) reportó que en las células de levaduras en las cuales la membrana plasmática fué enriquecida con ácido linoléico (C18:2) son más resistentes al efecto del etanol que las enriquecidas con ácido oléico (C18:1).

Además el crecimiento exponencial con residuos de ácido linoléico fué inhibitorio en menor extensión que cuando los cultivos fueron suplementados con residuos de ácido oléico.

Recientemente se ha demostrado que diferentes compuestos mejoran la productividad de las fermentaciones alcohólicas: ácidos grasos no saturados, esteroides, proteínas, aminoácidos, vitaminas e iones metálicos. Un medio complejo como el jugo de Jerusalem o un suplemento complejo con harina de soya y peptona tiene la capacidad de mejorar la fermentación alcohólica por el aumento de la tolerancia al etanol por las levaduras.

Además las levaduras requieren cantidades muy pequeñas de varios cationes inorgánicos que pueden desempeñar un papel importante en la protección de los fosfolípidos de la membrana celular con carga negativa y de ciertas estructuras de la pared celular. La protección se debe aparentemente al incremento de la estabilidad de la membrana, manteniendo la permeabilidad bajo condiciones adversas, protegiendo los fosfolípidos y regulando las interacciones lípido-proteína. Como lo demostró la adición de una suspensión celular en una solución amortiguadora a 60°C y se encontró que se pudo evitar la pérdida de compuestos citoplasmáticos. (Nabsis R.C. et al., 1988).

Así mismo se estableció que el etanol y las altas temperaturas interfieren con la organización de la membrana, aumentando la fluidez y permeabilidad a los iones y metabolitos pequeños e inhibiendo el transporte de los nutrientes.

El etanol puede interactuar con las membranas por inserción en el interior hidrofóbico, incrementando la polaridad de estas regiones, debilitando la barrera de las mismas en el intercambio libre de moléculas polares, debilitando las interacciones y

afectando la posición de las proteínas dentro de la membrana. La pérdida de la integridad de la membrana, afecta la habilidad de las células para mantener un gradiente de concentración a través de la membrana plasmática y varios sistemas involucrados en el transporte de solutos, se ven afectados. (Nabais R.C. et al, 1988).

Por otra parte Jiménez J. y Benítez T.,(1987) estudiaron la adaptación de las membranas de levaduras en etanol.

Ellos encontraron que cierta levadura con una gran tolerancia al etanol (cepa del vino) después del crecimiento en la presencia de etanol obtiene una mayor tolerancia.

Se probó también una cepa de Saccharomyces de laboratorio con una menor tolerancia, y no obstante al ser crecida en presencia de etanol fué capaz de aumentar un poco más su tolerancia. Cabe señalar que esto es un proceso reversible.

Los resultados que obtuvieron indican que tanto la cepa del vino como la de laboratorio parecen alterar su tolerancia de membrana después de ser crecidas en etanol. Sin embargo las membranas de la cepa de laboratorio tienden a ser mas sensitivas que las del vino, lo cuál indica que la capacidad de adaptación de las membranas celulares dependen de cada cepa.

El método utilizado para evaluar la tolerancia al etanol es el de las curvas de acidificación de Leao y Van Uden, (1984), en el que señalan que "el etanol induce un aumento exponencial de la difusión constante del flujo de protones".

Examinando y proponiendo una ecuación en la cuál el pH final se

incrementa como una función lineal a la concentración de etanol. Por otra parte se han estudiado los efectos de la acumulación intracelular de etanol durante la fermentación en S. cerevisiae. Se han tenido ciertas discrepancias de los resultados obtenidos, ya que unos dicen que cuando es adicionado el etanol a cultivos de S. cerevisiae les es menos tóxico para las células, que el producido por ellas mismas; diciendo que la razón del fenómeno en el efecto letal, es el aumento de los productos tóxicos, el agotamiento de nutrientes y la acumulación intracelular de etanol durante la fermentación (Nagadawithana y Steinkraus, 1976).

Otro trabajo que confirma lo anterior, es el propuesto por Novak M., y colaboradores, (1981), demostrando que el etanol producido durante la fermentación batch o por lote, es más inhibitorio que el etanol adicionado; postulando que la acumulación de etanol en las células contribuye a una elevada tasa de mortalidad.

En ambos casos, producción y adición, sugieren que la permeabilidad de etanol del exterior de las células al interior es muy poco. También la implicación de ambas influencias es importante en los niveles tecnológicos de producción de etanol.

Ellos sostienen que el efecto de inhibición intracelular por etanol ocurre en los puntos máximos de la fermentación y durante los primeros pasos de la misma, mientras que al final de la fermentación este fenómeno es de menor importancia, concluyendo que la concentración intracelular de etanol es muy elevada en lo máximo de la fermentación y la sensibilidad a la concentración extracelular es poca.

Varios grupos han reportado que la acumulación intracelular de etanol ocurre durante la fermentación; y otros reportes sugieren que la concentración intracelular de etanol en las suspensiones fermentadas con células de levadura son menor o igual que la extracelular.

De aquí que D'amore T. et al. (1987) utilizando S. cerevisiae de cervecería mencionan un método que puede evitar los problemas técnicos encontrados en estos estudios, como causa principal para determinar la concentración intracelular de etanol; teniendo como resultado que la concentración intracelular de etanol en suspensiones con células de S. cerevisiae es menor o igual que la extracelular del ambiente, y que no se incrementan los niveles de etanol en su mayor actividad de las fases de fermentación.

Además no hay un efecto en la proporción del crecimiento y fermentación, indicando que al incrementarse la concentración intracelular de etanol no afecta la fermentación.

Señalan también que la acumulación intracelular de etanol ocurre durante las fases tempranas de fermentación (3 h), y después de 12 h de fermentación, tanto la concentración intracelular como la extracelular de etanol son similares.

Así mismo también que la acumulación intracelular de etanol es más evidente al aumentar la presión osmótica, y asociado a esto se observa un incremento con la acumulación intracelular de etanol.

Ellos sugieren que la limitación de nutrientes es el mayor factor responsable de la disminución en el crecimiento y la actividad

fermentativa observada en células de levaduras a una presión osmótica elevada.

Otros factores que afectan la tolerancia al etanol en S. cerevisiae es la temperatura de crecimiento, ya ha sido demostrado por diversos autores que S. cerevisiae tiende a ser muy sensible a los efectos de inhibición de etanol a las elevadas temperaturas de crecimiento (Esener et. al ,1982). Sin embargo estas observaciones fueron esencialmente cualitativas. Además Moulin et al. (1980) citaron los efectos de la inhibición en la fermentación alcohólica causados por el tipo de sustrato y de etanol; concluyendo que la cinética en la fermentación es muy compleja, y que la velocidad de fermentación cambia constantemente con distintos sustratos.

Se han realizado trabajos para evaluar la tolerancia al etanol utilizando varias cepas de levaduras (cervecera, saké, destilería y de panificación). Kalmokoff e Igledeu, (1985), mencionan que utilizando estas cuatro cepas bajo condiciones estandarizadas, determinaron la tolerancia al etanol por varias metodologías: crecimiento celular, viabilidad y habilidad fermentativa.

El método de cuantificación de inhibición en la habilidad fermentativa sugiere que puede ser un índice óptimo de la tolerancia al etanol, ya que dentro de sus características se ha visto que los factores nutricionales no influyen en la fase de crecimiento de los cultivos.

Los resultados obtenidos en cuanto a la habilidad fermentativa

fueron, que al adicionar el etanol a las células con actividad fermentativa, se tuvo un efecto intermedio de inhibición con respecto a la inhibición obtenida en la metodología del crecimiento celular.

En cuanto al crecimiento celular se encontró que el etanol es inhibitorio en cada una de las cepas de levaduras a concentraciones de etanol mucho más bajas que las requeridas para suprimir completamente el crecimiento en cada una de las cepas, los rangos son de 11.8 a 13% v/v.

En cuanto a la viabilidad ellos concluyeron que los factores tales como los antecedentes nutricionales, temperatura y fases de crecimiento de las células, pueden afectar la velocidad y extensión de muerte (viabilidad).

Asimismo se tiene que los valores encontrados en la concentración de etanol como inhibitorio, varían dependiendo de la fase de crecimiento (media exponencial o estacionaria temprana) de cuando es adicionado en un tipo de levadura y, además, varía también entre cada una de ellas.

Teniendo como antecedentes lo anteriormente citado, se evaluó la tolerancia al etanol según la metodología utilizada por Kalmokoff e Igledeu, (1985), en una cepa de levadura de registro del CIATEJ y una obtenida del ingenio "José María Martínez" de Tala, Jal., para así poder determinar los índices en cuanto a tolerancia al etanol, lo cual aunado a los índices ya obtenidos en cuanto al rendimiento de alcohol (Pinal, Zuazo, 1990); permitirá alcanzar

un objetivo y optimizar el proceso de fermentación y por lo tanto obtener mejores rendimientos en la producción de alcohol.

HIPOTESIS

III. HIPOTESIS

De las dos cepas de levaduras evaluadas, una presentará mayor tolerancia al etanol, y se obtendrán datos precisos que definan los rangos de tolerancia al etanol de ambas cepas.

OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

El objetivo de este trabajo, fue evaluar la tolerancia al etanol de Saccharomyces cerevisiae con base a la inhibición en el crecimiento celular, viabilidad y habilidad fermentativa (producción de alcohol) de dos cepas, una de registro obtenida de CIATEJ y la otra utilizada en el ingenio José María Martínez de Tala, Jal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Estandarizar los métodos analíticos.
2. Estandarizar el inóculo.
3. Realizar el crecimiento y fermentación a nivel matraz de las dos cepas probando diferentes concentraciones de etanol en el medio.
4. Evaluar la tolerancia al etanol de las dos cepas de Saccharomyces cerevisiae.

MATERIALES Y METODOS

V. MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMO:

Los microorganismos utilizados fueron los siguientes:

Saccharomyces cerevisiae BCGC L-024, productora de etanol a partir de melaza proporcionada por el Banco de Cepas y Genes del CIATEJ.

Saccharomyces cerevisiae levadura 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, Cámara de Newbawer American Optical, micropipetas Gilson, orbital rotatorio New - Brunswik.

TECNICAS:

I. Técnicas de azul de metileno para conteo directo de células.

Los reactivos utilizados son:

- a) Azul de metileno 10 g/l
- b) Citrato de sodio 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 ul una muestra y con ayuda de Cámara de Newbawer, contar la población total, esta técnica nos permite conocer también 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.

II. Técnica para determinar los azúcares reductores totales por el método de fenol-sulfúrico. (Dubois et al., 1956)

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 1 ml. de fenol al 5 %, en seguida se agregan 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de 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.

III. Técnica para determinación de etanol por el método de dicromato de potasio. (Bohringer y Jakob, 1964).

Los reactivos utilizados son:

- a) Dicromato de potasio K_2CrO_2 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 200 ml. de agua destilada; por último se afora a un litro con agua destilada.

Procedimiento:

A 1 ml. de muestra se le agregan 2 ml. de solución de dicromato y se agita, se deja reposar durante 10 min. y posteriormente se

agregan 5 ml. de agua destilada, para finalmente agitar y leer absorbancia a 585 nm.

IV. 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 hrs.), y obtener las células secas.

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

M E T O D O L O G I A

5.1.- Estandarización de métodos analíticos.

5.1.1.- 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 concentración 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.

5.1.2.- 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, a una concentración de 20 g/l.

El rango de concentración a probar fué de 2 a 20 g/l, para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de etanol presente en una muestra a partir de una absorbancia dada.

5.2.- Estandarización del inóculo.

5.2.1.- 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 al 3.5 %. ajustando el pH a 4.5 .

Se sembraron por estrías varios tubos para cada cepa, a partir de un cultivo de un tubo de conservación de estas cepas crecidas en el mismo medio. Se incubaron a una temperatura de 30 °C por un periodo de 50 hrs, 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 conteo directo al microscopio y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno; ambas en la Cámara de Newbawer.

* %Bx: porcentaje de sólidos totales presentes en una muestra.

5.2.2.- Crecimiento en medio líquido.

Se inocularon matraces de 500 ml, conteniendo 180 ml. de medio de melaza a 21°Bx más nutrientes, 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 estéril a tubos crecidos en el tiempo determinado como óptimo para cada cepa, inoculando matraces diferentes para cada una de ellas. Se incubaron a una temperatura de 30 °C por un período de 12 h a 250 rpm. El crecimiento celular se determinó por peso seco y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno.

5.3.- Crecimiento y fermentación a nivel matraz de las dos cepas probando diferentes concentraciones de etanol en el medio.

5.3.1.- Determinación de la inhibición por etanol en el crecimiento celular y la viabilidad.

El crecimiento a nivel matraz a diferentes concentraciones de etanol se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 180 ml de medio de melaza a 21°Bx (más nutrientes), los que fueron inoculados 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. Los matraces inoculados se incubaron con agitación de 250 rpm a 30°C.

Los experimentos se realizaron por duplicado, probándose cinco

concentraciones de etanol para cada cepa.

El etanol se adicionó al medio en el tiempo seleccionado, logrando tener en cada uno de ellos un volumen total de 5, 7, 9, 11 y 14 % de etanol v/v.

Se sacaron muestras a diferentes tiempos, a las cuales se les determinó el crecimiento celular en base a peso seco, la población celular por contéo directo al microscopio en la Cámara de Newbawer, y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno. Se calculó la velocidad de crecimiento a las diferentes concentraciones de etanol probadas por medio de un análisis de regresión a la parte lineal de cada curva de crecimiento; calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento celular, y de la viabilidad con respecto a un testigo (crecimiento sin adición de etanol).

Se determinó el rango de tolerancia para el crecimiento y la viabilidad de ambas cepas, tomando como base una inhibición máxima del 50 % en el crecimiento y del 20 % en la viabilidad.

5.3.2.- Determinación de la inhibición por etanol en la habilidad fermentativa (producción de etanol).

Primeramente se determinó el tiempo adecuado para la adición de etanol al medio; los tiempos probados para la adición de etanol fueron al tiempo 0, 6 y 12 hrs de fermentación, con un respectivo testigo (sin adición de etanol). Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 180 ml de medio de melaza a 27°Bx (aproximadamente 170 g/l de azúcar

total), los que fueron inoculados con 20 ml de inóculo estandarizado de las cepas.

Posteriormente se incubaron los matraces en forma estática a 35°C. El etanol se adicionó a los tiempos antes mencionados, logrando tener en cada uno de ellos un volumen total de 5% de etanol v/v.

Enseguida se sacaron muestras a diferentes tiempos, a las cuales se les determinó el crecimiento celular en base a peso seco; esto para poder observar las curvas de crecimiento que presentaron cada tiempo probado y compararlas con un testigo (sin adición de etanol).

Una vez seleccionado el tiempo de la adición de etanol se procedió a realizar las fermentaciones, las cuales se hicieron por duplicado, en matraces Erlenmeyer de 500 ml y de manera similar a la ya descrita.

El etanol se adicionó al tiempo seleccionado, probando seis concentraciones de etanol para cada cepa. Estas fueron de un 4, 7, 10, 14, 18 y 21% de etanol v/v.

Se sacaron muestras a diferentes tiempos de fermentación, a las cuales se les determinó producción de alcohol por medio de dicromato de potasio; también se determinó los azúcares reductores totales por medio de fenol-sulfúrico a las muestras de tiempo 0 y 24 h del matraz testigo (sin adición de etanol).

Se determinó la velocidad de producción de alcohol mediante un análisis de regresión a la región lineal de la curva de producción de alcohol.

También se calculó el rendimiento de fermentación en base a la producción de alcohol y al consumo de azúcares, en los matraces sin adición de etanol.

Se definió el rango de tolerancia de alcohol en cuanto a la habilidad fermentativa de ambas cepas, tomando como base una inhibición máxima del 50 %.

5.4.- Evaluación de la tolerancia al etanol de las dos cepas de Saccharomyces cerevisiae.

5.4.1. Análisis estadístico de resultados.

Se realizaron análisis de varianza de dos vías para determinar si existe una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento, porcentaje de viabilidad, habilidad fermentativa y el porcentaje de inhibición de estos tres; debido a diferentes concentraciones de etanol o, a las diferentes cepas, o si existe una interacción entre estas dos variables.

Se determinó la concentración de etanol que causó la máxima inhibición en crecimiento, viabilidad y habilidad fermentativa para cada una de las cepas probadas.

Este análisis de varianza se realizó con un paquete estadístico de computación llamado " STATGRAFICS ".

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

6.1. Estandarización de métodos analíticos.

Las curvas de calibración usadas para la determinación de azúcares reductores totales y alcohol se muestran en las figuras 3 y 4 respectivamente.

La ecuación obtenida para la curva de calibración de azúcares totales es $Y = -1.0999 \text{ E-}02 + 6.86 (X)$ y es aplicable a los rangos de absorbancia de 0.05 a 0.60 que correspondieron a una concentración de 0.01 a 0.09 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99947 para 10 puntos.

Para la determinación de etanol la ecuación encontrada fué $Y = 1.432444 \text{ E-}02 + 5.477333 \text{ E-}02 (X)$ aplicable para los rangos de absorbancia de 0.12 a 0.87 que corresponde a una concentración de 2 a 16 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99959 para 9 puntos.

6.2. Estandarización de inóculo.

6.2.1. Crecimiento en tubos con agar inclinado.

En la figura 5a se observa el crecimiento y el porcentaje de viabilidad para la cepa L-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 115×10^6 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 con una viabilidad de 79% , siendo a las 36 h cuando se alcanzó una buena viabilidad del 98% y una alta población de 145×10^6 cel/ml.

Para la cepa BCGC L-024 se muestra en la figura 6a 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 32 h alcanzando entonces la población máxima con una viabilidad del 90% ; mientras que en la figura 6b se observa un comportamiento similar, su fase logarítmica es corta alcanzando a las 32 h una población máxima de 450×10^6 cel/ml con una viabilidad del 100%.

6.2.2 Crecimiento en medio líquido.

En la figura 7 tenemos el crecimiento en peso seco y el porcentaje de viabilidad para la cepa L-Ingenio, como se aprecia su fase logarítmica empieza aproximadamente a las 4 h con una duración de 6 h alcanzando a las 10 h la población máxima que fué de 13.9 g/l de células con una viabilidad del 100%.

En cuanto a la cepa BCGC L-024 el crecimiento en peso seco y el porcentaje de viabilidad, se muestra en la figura 8 en la que podemos observar una fase logarítmica con duración de 6 h, que empieza a las 4 h y termina a las 10 h con una población de 13.8 g/l de células y una viabilidad del 100%, a partir de la cual comenzó la fase estacionaria.

6.3. Crecimiento y fermentación a nivel matraz de las dos cepas probando diferentes concentraciones de etanol en el medio.

6.3.1. Determinación de la inhibición por etanol en el crecimiento celular y la viabilidad.

En la figura 9 nos muestra el crecimiento celular en base a peso seco para la cepa L-Ingenio a diferentes concentraciones de etanol, el cual se adicionó después de las 5 h de crecimiento.

La disminución en el crecimiento para todas las concentraciones de etanol probadas son similares y varían ligeramente, apreciándose una marcada disminución con respecto al testigo.

La figura 10 ilustra el crecimiento en base a peso seco de la cepa BCGC L-024. En donde se puede observar una mejor apreciación de la disminución del crecimiento entre cada concentración de etanol probada; además se aprecia que a una concentración de etanol del 11 y 14% la disminución es menor en relación a las concentraciones de 5, 7 y 9% .

La tabla 2 nos presenta la velocidad de crecimiento alcanzada para cada cepa a diferentes concentraciones de etanol en el medio, mostrando que la cepa L-Ingenio presenta una velocidad de crecimiento ligeramente mayor que la cepa L-024; además se observa que la cepa L-Ingenio tiene una disminución gradual conforme se aumenta la concentración de etanol, mientras que para la cepa L-024 no se da el mismo caso, ya que presenta una disminución mayor al 7% y 9% de etanol para luego recuperarse al 11 y 14 %.

Por otro lado la tabla 3 muestra el porcentaje de inhibición en la velocidad de crecimiento; para la cepa L-Ingenio el aumento de la inhibición va en relación con la mayor concentración de etanol probada, empezando con un promedio de 47% en la concentración del 5% de etanol hasta un 62% de inhibición en la velocidad de crecimiento para el 14% de etanol; mientras que para la cepa L-024 el efecto de inhibición es mayor a la concentración del 7% y 9% de etanol con un valor promedio de 48%, y siendo el menor

para el 14% de etanol con 32% de inhibición.

La figura 11 muestra el porcentaje de viabilidad para la cepa L-Ingenio, donde se observa la viabilidad alcanzada para cada concentración de etanol probada. Apartir del tiempo que se adicionó el etanol la viabilidad disminuye en todos los casos, y más aún a las mayores concentraciones de etanol probadas. Para el caso del 14% de etanol, aparece con una recuperación después de las 7 h y se hace estable a la 8 y 9 h con una viabilidad del 93%, para luego decaer hasta el tiempo 12 h y disminuir con un 83% de viabilidad. Teniendo que a mayor concentración de etanol en el medio después de 12 h de crecimiento, menor fué la viabilidad en cada una de las concentraciones probadas.

La figura 12 muestra el porcentaje de viabilidad para la cepa L-024, donde se observa que a partir de la adición de etanol la viabilidad disminuye en todos los casos. La mayor viabilidad alcanzada después de 12 h de crecimiento es mejor para las menores concentraciones de etanol probadas; el 5% de etanol probado muestra una viabilidad estable, mientras que el 14% presenta una disminución muy pronunciada al inicio de la adición de etanol para luego recuperarse ligeramente y finalmente decaer a un 85% de viabilidad.

La tabla 4 presenta el porcentaje de viabilidad alcanzado para cada cepa a diferentes concentraciones de etanol, en donde se

observa que ambas cepas tienen valores decrecientes conforme aumenta la concentración de etanol. Los valores promedio de ambas cepas varían ligeramente en cada concentración probada, siendo mayor en cada caso el porcentaje de viabilidad para la cepa L-024 sobre la L-Ingenio.

La figura 13 muestra el porcentaje de inhibición en la viabilidad para la cepa L-Ingenio, mostrando que la inhibición se observó en todos los casos; el porcentaje de inhibición fué en aumento al aumentar la concentración de etanol adicionada. La inhibición más elevada la presentaron el 11 y 14%, con aproximadamente el 17% de inhibición. El 7% presentó una estabilización en su inhibición a partir de las 8 hasta las 12 h. Finalmente la menor inhibición la presentó el 5% con una inhibición final del 3%.

La figura 14 presenta el porcentaje de inhibición en la viabilidad de la cepa L-024, mostrando que al 5% de etanol fué la menor inhibición alcanzada después de 12 h de crecimiento con un 2% ; el 7% presentó una inhibición casi estable después de las 8 h., el 14% presentó una inhibición muy drástica al adicionar el etanol, alcanzando la mayor inhibición del 15% en un tiempo de 7 h.

La tabla 5 muestra el porcentaje de inhibición en la viabilidad de las dos cepas con diferentes concentraciones de etanol en el

medio. Aquí se observa que existe rangos diferentes de inhibición en cada concentración probada para cada cepa y entre ambas, siendo menor la inhibición de la viabilidad en la cepa L-024 con un valor mínimo de 2% y un máximo de 14.5% de inhibición, sobre la cepa L-Ingenio con 3% y 16.5% respectivamente.

6.3.2. Determinación de la inhibición por etanol en la habilidad fermentativa (producción de etanol).

Los resultados obtenidos para la selección del tiempo en la adición del etanol en la cepa L-Ingenio se muestra en la figura 15, donde se observan los tiempos probados y los efectos que ellos tuvieron al adicionar una concentración de etanol conocida. El tiempo de adición correspondiente a las 0 h presenta una curva irregular de crecimiento; el tiempo 12 h presenta una curva más regular, pero un tiempo más corto para observar la inhibición, puesto que inmediatamente después de la adición la curva declina; mientras que por otro lado el tiempo 6 h de fermentación presenta una mejor curva de crecimiento y se aprecia el crecimiento exponencial incluso después de la adición del etanol.

La figura 16 muestra los resultados obtenidos en la producción de etanol en la cepa L-Ingenio con diferentes concentraciones de etanol, habiéndose adicionado a las 6 h de la fermentación.

Primeramente se puede observar que al adicionar el etanol existe una disminución en la fase logarítmica para todos los casos

probados con respecto al testigo. El 4% de etanol probado presenta una disminución casi del 50% de alcohol producido con respecto al testigo; el 7% presenta una disminución muy marcada, siendo el valor máximo de producción de, 10.8 g/l de etanol.

El 10% muestra una producción mayor que el anterior, siendo su más alta producción a tiempo de 8 h con 17 g/l; al 14% de etanol se observa la inhibición total de la producción de etanol al tiempo de 36 h, el 18% nos muestra que a los tiempos 24 y 36 h ya no hay producción; y por último el 21% muestra un comportamiento ascendente de producción, que va del tiempo 8 al 12 h para luego declinar hasta cero al tiempo de 36 h.

Por otro lado la figura 17 nos presenta los resultados obtenidos en la fermentación con la cepa L-024, en donde en casi todas las concentraciones probadas después de añadir el etanol existe un periodo de latencia o disminución en la producción, para luego reiniciar de nueva cuenta su actividad. El 4% de etanol fué el que mayor producción de etanol presentó, con un 31 g/l a un tiempo de 24 h, sin embargo esto representa un 56% de lo que se produjo en el testigo. El 7 y 10% de etanol presentaron una producción similar después de las 20 h, el 14% presentó una recuperación bastante amplia debido a que llega a producir a las 24 h, 26 g/l de etanol, disminuyendo tan solo a 20 g/l al tiempo de 36 h.

Por último, el 18 y 21% de etanol fueron las concentraciones en las que no hubo producción a tiempos de 36 y 24 h

respectivamente.

La tabla 6 muestra la velocidad de producción de alcohol alcanzada para cada cepa a diferentes concentraciones de etanol en el medio, mostrando que la velocidad de producción es menor en la cepa L-Ingenio. Además para esta cepa los valores de la velocidad de producción a las diferentes concentraciones de etanol son muy irregulares, ya que al 7% de etanol disminuye, luego a la siguiente concentración del 10% aumenta, para luego reportar su valor más bajo de 0.24 g de etanol/l x h al 14% de etanol.

Para el caso de la cepa L-024 presenta una disminución de su velocidad de producción también irregular y no decreciente con respecto a la mayor concentración de etanol, la velocidad de producción de alcohol más baja (0.7228 g de etanol/l x h) se alcanzó cuando se añadió al medio una concentración de 21% de etanol.

La tabla 7 presenta el porcentaje de inhibición en la producción de alcohol de ambas cepas a diferentes concentraciones de etanol, en la cual la cepa L-Ingenio muestra su menor inhibición en la concentración del 21%, mientras que su mayor fué al 14%. Para el 7% y 18% de etanol su inhibición se presenta similar.

Por otro lado la cepa L-024 muestra su mayor inhibición al 21% de etanol, y la mínima al 14%.

En la figura 18 se muestra el porcentaje de inhibición en la velocidad de producción de etanol de las dos cepas evaluadas a diferentes concentraciones de etanol. En donde se puede observar a manera general que al incrementar la concentración de etanol, el porcentaje de inhibición es mayor.

Para el caso de la cepa L-Ingenio al adicionar un 4% de etanol se observa que su inhibición es muy pronunciada; el 10% de etanol presenta una recuperación, para luego llegar al 14% con su máxima inhibición del 87%.

La cepa L-024 presenta una inhibición menos marcada que la cepa L-Ingenio, teniendo solo en el caso del 10% de etanol una similitud con la cepa anterior. El único caso en que el valor de inhibición esta por debajo de ella es al 21% de etanol, con un 71% contra el 56% de la cepa L-Ingenio.

Por otra parte, el rendimiento de fermentación (Yp/s) obtenido en las dos cepas sin adicionarles etanol después de 24 h se presentan en la tabla 8, en donde se muestra los promedios de duplicados de cada una de ellas. Para la cepa L-Ingenio la producción promedio de alcohol fué de 51 g/l y los azúcares residuales fueron de 46 g/l, obteniendo un rendimiento de 0.40 ; el caso de la cepa L-024 la producción de alcohol fué de 55 g/l con un contenido de azúcares residuales de 48 g/l, alcanzando un rendimiento de 0.44 .

6.4. Evaluación de la tolerancia al etanol de las dos cepas de Saccharomyces cerevisiae.

6.4.1. Análisis estadístico de resultados.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa en la velocidad de crecimiento se muestra en la tabla 2a, en ella se puede ver que la F calculada es mayor en todos los casos (etanol, cepas y etanol por cepas) que la F de tablas, y por lo tanto se rechazan las tres hipótesis nulas.

Lo anterior indica que existen diferencias significativas en la velocidad de crecimiento debido a las diferentes concentraciones de etanol probadas, a las cepas, y existe una interacción de estas dos variables.

La tabla 3a presenta los resultados encontrados para el porcentaje de inhibición en la velocidad de crecimiento en donde se muestra que la F calculada es mayor en todos los casos que la F de tablas y por lo tanto rechazando las tres hipótesis nulas.

Lo que señala que existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento debido a las concentraciones de etanol y cepas probadas, así como la interacción de ambas. Esto se puede observar en las figuras 19a y 19b donde se grafican los valores promedios del porcentaje de inhibición alcanzado a las diferentes concentraciones de etanol y

para las diferentes cepas probadas respectivamente.

La tabla 4a presenta los resultados obtenidos del análisis, para el porcentaje de viabilidad alcanzado para ambas cepas. En esta tabla se observa que la F calculada solo es mayor en los dos primeros casos (etanol y cepas) que la F de tablas y por lo tanto se rechazan las dos primeras hipótesis nulas y se acepta solo la tercera.

Señalando con lo anterior que existen diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad debido a los niveles de etanol y cepas probadas, pero no existen tales en la interacción de estos dos.

La figura 5a muestra los resultados del análisis para el porcentaje de inhibición en la viabilidad para ambas cepas; observando que la F calculada es mayor en los dos primeros casos y en el último es menor que la F de tablas; lo cual indica que si hay diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad a causa de los niveles de etanol y cepas probadas; pero no existe tal diferencia en la interacción de estos dos parámetros. Las figuras 20a y 20b ilustran esto, ya que se muestra los promedios del porcentaje de inhibición de la viabilidad para las diferentes concentraciones de etanol y las diferentes cepas probadas.

La tabla 6a presenta el resultado obtenido al analizar los resultados de la velocidad de producción de alcohol (habilidad

fermentativa), en donde se aprecia que la F calculada es mayor en todos los casos que la F de tablas, y por lo tanto se rechazan las tres hipótesis nulas.

Lo cual indica que existen diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de etanol y las cepas probadas, así como también la interacción de estos dos niveles para su discrepancia.

La tabla 7a muestra los resultados del análisis estadístico para el porcentaje de inhibición en la velocidad de producción de alcohol, señalando también que la F calculada es mayor para los tres casos que los presentados en la F de tablas y por consiguiente rechazando las tres hipótesis nulas.

Señalando con lo anterior que existe una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de la producción de alcohol en cada concentración de etanol probada y de las cepas utilizadas, así como también diferencias significativas en cuanto a la interacción de estos dos niveles. Esto se observa en las figuras 21a y 21b donde se grafican los valores promedios del porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol, a las diferentes concentraciones de etanol y para las diferentes cepas probadas.

Según los análisis estadísticos se determinó las concentraciones de etanol que causaron máxima inhibición en:

a) Velocidad de crecimiento.- La tabla 3 muestra los valores obtenidos para cada concentración probada en las dos cepas. La

cepa L-Ingenio presenta su máxima inhibición del 62.5 % a la concentración del 14 % de etanol. Mientras que la cepa L-024 su mayor inhibición la presenta al 7 % de etanol con un 48.5 %.

Cabe señalar que las concentraciones 7, 9, 11 y 14 % de etanol en la cepa L-Ingenio son mayores que el reportado como máximo de la cepa L-024.

b) Viabilidad.- La tabla 5 presenta los valores promedio obtenidos en cada concentración probada para cada cepa. En la cepa L-Ingenio su mayor inhibición se observa al 11% y 14% de etanol con un 16 y 16.5% respectivamente. Por lo que corresponde a la cepa L-024 la mayor inhibición la presenta al 14 % de etanol con un 14.5 %.

c) Velocidad de producción de alcohol.- La tabla 7 muestra los valores promedio encontrados para cada concentración de etanol en las dos cepas. La cepa L-Ingenio su mayor inhibición la presenta al 14 % de etanol con un 87 % , seguido del 7% y 18% de etanol con un 79 y 78.5 % respectivamente.

La cepa L-024 su máxima inhibición la presenta al 21 % de etanol con un 71 % y el más contiguo el 10 % de etanol con un 57 %.

DISCUSSION

VII. DISCUSION

7.1. Estandarización de métodos analíticos.

Con los resultados obtenidos en las curvas de calibración de azúcares totales y etanol, en donde los coeficientes de regresión fueron buenos, con valores de 0.99947 y 0.99959 respectivamente; se puede concluir que si hay una correlación entre la concentración y la absorbancia para la determinaciones de azúcares totales y etanol.

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

7.2. Estandarización de inóculo.

Con el objeto 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 para conocer el tiempo en que la célula esta en óptimas condiciones.

7.2.1. Crecimiento en medio sólido.

En las cinéticas de la cepa L-Ingenio inicialmente se observó la estandarización de su crecimiento exponencial a las 24 h, pero con los ensayos posteriores se pudo observar que las 36 h está todavía en su fase logarítmica de crecimiento alcanzando una población de 145×10^6 células/ml. y una viabilidad alta del 98%.

por lo que se eligió el tiempo de 36 h como el más adecuado.

Para la cepa BCGC L-024 las cinéticas obtenidas presentaron en primer instancia (con pocos muestreos) una población máxima de 95 E 06 células/ml y una viabilidad del 90 % a las 32 h, en la cinética con mayores muestreos y menos espaciados, se observó nuevamente que a las 32 h alcanza su máxima población y una viabilidad del 100 %, por lo que se decidió tomar éste como el óptimo.

7.2.2. Crecimiento en medio líquido.

En este nivel de propagación los resultados obtenidos fueron similares, las dos cepas presentaron un tiempo de crecimiento de 10 h.

Para la cepa L-Ingenio se observó que su máxima población la alcanzó a las 10 h y una viabilidad del 100 %.

En cuanto a la cepa BCGC L-024 se observó su fase exponencial de crecimiento como punto máximo a las 10 h y teniendo una viabilidad del 100 %. Dicho lo anterior se concluye que el tiempo antes mencionado en el crecimiento en medio líquido es el tiempo óptimo.

7.3. Crecimiento y fermentación a nivel matraz de las dos cepas probando diferentes concentraciones de etanol en el medio.

7.3.1. Determinación de la inhibición por etanol en el crecimiento celular y la viabilidad.

Según los reportes de Kalmokoff e Igledeu (1985) se seleccionó el tiempo de la adición de etanol al medio, en donde se observara un buen efecto de inhibición. En los trabajos realizados por ellos reportan que las fases de crecimiento media exponencial o estacionaria temprana como los mejores tiempos para la adición de etanol.

En base a esto, se analizó las curvas de crecimiento presentadas por cada una de las cepas y se decidió que después de las 5 h de crecimiento (aproximadamente la fase media exponencial) sería el tiempo de adición.

Primeramente se analizó la velocidad en el crecimiento celular de las dos cepas con diferentes concentraciones de etanol; teniendo que la cepa L-Ingenio (Fig. 9) sus velocidades de crecimiento parecen ser afectadas en similar proporción; mientras que la cepa L-024 (Fig. 10) sus velocidades de crecimiento no presentan el mismo fenómeno; además se observa en la tabla 2 que aunque la velocidad de crecimiento de la cepa L-Ingenio es ligeramente mayor, su disminución es gradual conforme aumenta la concentración de etanol; indicando con lo anterior que existen diferencias significativas en la velocidad de crecimiento en determinadas concentraciones de etanol para cada cepa. Jones

(1989) señala que estudios revelaron que la interacción entre la concentración de etanol y la velocidad de crecimiento es lo que determina en última instancia la expresión de la tolerancia.

Además los resultados presentados en la tabla 2a señalan que la concentración de etanol es la variable que ejerce mayor importancia, debido a que en cada concentración probada tiene diferentes efectos en las cepas utilizadas.

Así mismo la tabla 3 muestra que existen diferencias en la inhibición de las velocidades de crecimiento para las diferentes concentraciones de etanol probadas, siendo en todos los casos el valor promedio de la cepa BCGC L-024 menos inhibitorio que la cepa L-Ingenio; además en la tabla 3a se presenta el análisis de varianza en donde la concentración de etanol es también la variable que ejerce mayor peso sobre las otras dos, indicando con esto que a cada concentración de etanol existen diferencias notorias de inhibición, y en segundo término el nivel "cepas", señala que existe también diferencias de inhibición en cada una de las cepas evaluadas, en la cual en ambos casos la cepa BCGC L-024 es más tolerante que la cepa L-Ingenio.

Dentro de las posibles causas del porqué sucede el fenómeno presentado en la tabla 3, en el que la cepa L-Ingenio tiene una inhibición de crecimiento gradual conforme se aumenta la concentración de etanol, mientras que en la cepa BCGC L-024 su inhibición no se comporta de igual forma, sino que hay una inhibición menor en las últimas dos concentraciones altas de etanol, se puede decir que según el dato reportado por D'amore et

al., (1987) en el que señala que la mayor acumulación intracelular de etanol ocurre durante las fases tempranas de crecimiento o fermentación; y debido a que las concentraciones de etanol fueron adicionadas en las primeras fases del crecimiento (5 h), las concentraciones mayores de 11% y 14% de etanol presentaron un equilibrio osmótico con el exceso de etanol intracelular presente, y no hubo pérdida de su integridad en el transporte de solutos; mientras que para las concentraciones menores si hubo efecto nocivo. Además cabe señalar que para que pueda realizarse este fenómeno debe existir una composición e integridad determinada de la membrana plasmática característica de cada célula en particular, que le permita su estabilidad y mantener la permeabilidad bajo condiciones adversas.

Dentro de las características de las células tolerantes al efecto del etanol se encuentra que éstas tienen una composición específica de ácidos grasos en su membrana; una pared celular 2.4 veces más gruesa que las células normales (Jones, 1989); y ciertas cantidades de varios cationes inorgánicos que desempeñan la protección de fosfolípidos de la membrana celular con carga negativa y de ciertas estructuras de la pared celular (Nabais R.C., et al., 1988).

En lo que respecta al porcentaje de viabilidad para ambas cepas, la cepa L-Ingenio tiene un porcentaje de viabilidad menor que el presentado por la cepa L-024.

Además se tiene que en el porcentaje de inhibición de la viabilidad para ambas cepas existe una diferencia favorable para

la cepa BCGC L-024 sobre la L-Ingenio, ya que en cada concentración de etanol probada hay una mayor inhibición en la cepa L-Ingenio.

En ambos casos de porcentaje de viabilidad y de inhibición en la viabilidad, la concentración de etanol probada para cada cepa mostró ser la variable que ejerce mayor influencia, debido a que en cada concentración ejerce una respuesta diferente.

7.3.2. Determinación de la inhibición por etanol en la habilidad fermentativa (producción de alcohol).

Para seleccionar el tiempo óptimo de la adición de etanol, en el cual se observara un buen efecto de inhibición se probaron tres tiempos diferentes, más su respectivo testigo; los resultados obtenidos se determinaron en base a la velocidad de producción de alcohol mediante un análisis de regresión lineal a la curva de producción de alcohol, y se determinó la inhibición en base al testigo.

El tiempo de adición que presentó una mejor curva de crecimiento (Fig. 15) y un crecimiento exponencial después de la adición de etanol que favorecieron las observaciones inhibitorias por el narcótico fué a las 6 h de fermentación. Este tiempo entra dentro de los rangos utilizados por Kalmokoff e Igledeu (1985) en sus estudios realizados

Realizadas las fermentaciones de ambas cepas se observó que la cepa L-Ingenio mostró una velocidad de producción de alcohol menor a la presentada por la cepa BCGC L-024.

Jones (1989) señala que las células de levaduras no tolerantes muestran una baja en la concentración de etanol al final de la fermentación; además menciona que la habilidad para producir activamente etanol también parece estar relacionado con la habilidad para la replicación activa.

En lo que se refiere al porcentaje de inhibición de la producción de alcohol en ambas cepas, se tiene que todos los rangos probados en la cepa L-Ingenio rebasan el 50 % de inhibición en su actividad, mientras que la cepa BCGC L-024 solo el 10 % y el 21% de etanol adicionado lograron rebasar tal proporción. Habiendo mencionado lo anterior y según el dato de Kalmokoff e Igledeu (1985) en el que señala que cuando se inhibe más del 50 % de la actividad fermentativa se habla de una inhibición completa de su actividad. Se puede definir el rango de tolerancia alcohólica para cada cepa de la siguiente manera:

La cepa BCGC L-024 de un 5 al 14 % para el crecimiento y viabilidad, y de un 4 al 7 % y del 14 al 18 % para la velocidad de producción de alcohol.

La cepa L-Ingenio solo tolera el 5 % para el crecimiento, del 5 al 14 % para la viabilidad y para la habilidad fermentativa no presenta unidades aceptables para su tolerancia.

Por otra parte los resultados obtenidos en el rendimiento de la fermentación (Y_p/s), la cepa BCGC L-024 mostró un mejor rendimiento de 0.44 , mientras que la cepa L-Ingenio tuvo un rendimiento de 0.40 .

7.4. Evaluación de la tolerancia al etanol de las dos cepas de Saccharomyces cerevisiae.

7.4.1. Análisis estadístico de resultados.

Los análisis de varianza realizados pusieron de manifiesto que existe una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento, viabilidad y velocidad de producción de etanol de las cepas, así como en sus porcentajes de inhibición respectivos, debido a las diferentes concentraciones de etanol adicionadas al medio y debido a los dos tipos de cepas utilizadas; e incluso existe una interacción de los niveles de alcohol con las cepas utilizadas para el caso de la velocidad de crecimiento y velocidad de producción de alcohol.

Las hipótesis nulas establecidas fueron rechazadas para todos los casos (a excepción de la interacción de etanol y cepas para la viabilidad) debido a que la relación F calculada fué mayor que la de tablas.

Se puede observar por medio de la desviación estándar el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento para ambas cepas en los niveles de etanol y cepas probadas; para el caso del nivel de etanol, se observa que la máxima inhibición promedio está al 9% de etanol seguido del 7 y 11% de etanol respectivamente; para el nivel "cepas" la inhibición promedio de la cepa BCGC L-024 fué menor (35%) que el presentado por la cepa L-Ingenio (47%), (figs.19a y 19b).

Además se puede establecer los rangos de tolerancia para cada cepa en función de la velocidad de crecimiento, siendo para la cepa BCGC L-024 las concentraciones de etanol del 5 al 14 % teniendo la máxima inhibición (48 %) con un 7 % de etanol en el medio; mientras que para la cepa L-Ingenio su valor más alto de tolerancia es del 5% de etanol, que corresponde a una inhibición de 47 %, seguido de una inhibición gradual conforme se aumenta la concentración de etanol.

En las figuras 20a y 20b se puede observar por medio de la desviación estándar el porcentaje de inhibición de la viabilidad para ambas cepas, en los niveles de etanol y cepas probadas; para el nivel de etanol se determina que la máxima inhibición promedio del 15.5% de etanol se presenta con 14 % de etanol, para el nivel "cepas" la inhibición promedio de la cepa BCGC L-024 alcanza el 8 % mientras que la cepa L-Ingenio su promedio fué de 9.75 %. El rango de tolerancia para cada cepa en función del porcentaje de viabilidad alcanzado es del 5 al 14 %, alcanzándose la máxima inhibición para ambas cepas con 14 % de etanol en el medio.

En las figuras 21a y 21b se observa la desviación estándar del porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de etanol para ambas cepas en los niveles de etanol y cepas probadas, teniendo que el valor promedio máximo de inhibición la presentan al 21 y 18 % de etanol con un 65 y 63 % respectivamente. Para el nivel "cepas" la inhibición promedio de la cepa BCGC L-024 fué

mucho menor con un 42 %, con respecto al 61% de la cepa L-Ingenio.

Además se establecen los rangos de tolerancia para cada cepa en función de la velocidad de producción de etanol, mostrando la cepa BCGC L-024 una mejor tolerancia con un rango del 4 al 7 % de etanol y del 14 al 18 % teniendo la máxima inhibición (71 %) con 21 % de etanol en el medio, mientras que la cepa L-Ingenio ninguna concentración de etanol probada fué aceptable para los rangos reportados por Kalmakoff e Igledeu (1985); ya que presenta inhibiciones mayores del 50 % en todas las concentraciones probadas.

CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

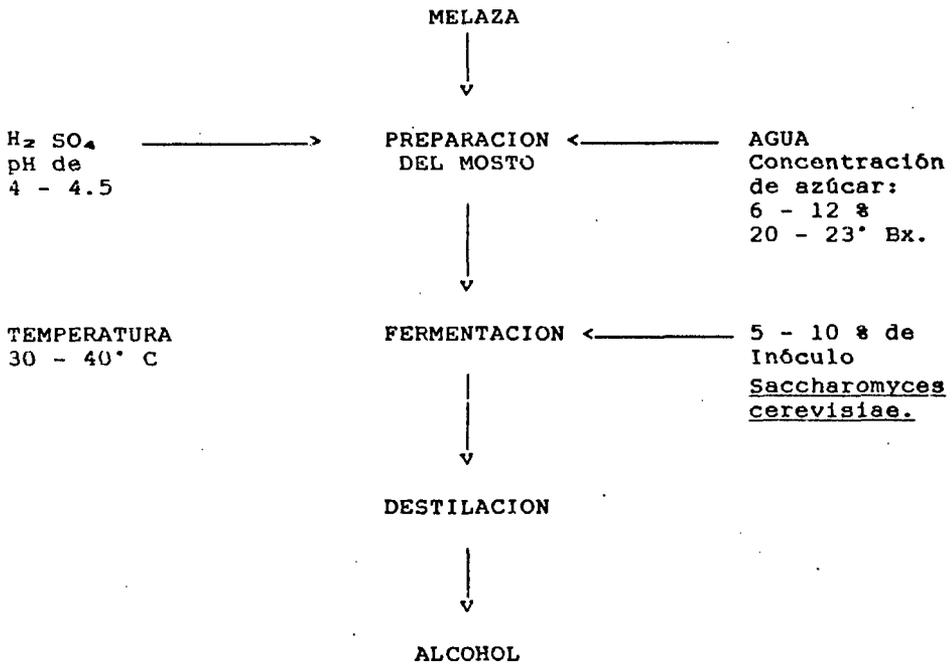
1. El tiempo adecuado de crecimiento para la cepa BCGC-L-024 fue de 32 h y 10 h para medio sólido y líquido respectivamente; para la cepa del Ingenio su tiempo óptimo fue de 36 h y 10 para medio sólido y líquido respectivamente.
2. La cepa BCGC-L-024 mostró tener mayor tolerancia al etanol que la cepa del Ingenio.
3. Los rangos de tolerancia para la cepa BCGC-L-024 van del 5 al 14 % v/v de etanol para el crecimiento y la viabilidad, y para la habilidad fermentativa del 4 al 7 % y del 14 al 18%.
4. El nivel de tolerancia en el crecimiento para la cepa del Ingenio solo la presenta al 5 % v/v de etanol; para el porcentaje de viabilidad el rango es del 5 al 14 % de etanol, y para la habilidad fermentativa no presenta unidades o rangos aceptables para su tolerancia.
5. El factor de mayor influencia en las respuestas del crecimiento y la viabilidad fue la concentración de etanol adicionada al medio, y solo en la habilidad fermentativa la mayor influencia la tuvo las cepas utilizadas.

6. Se estableció la correlación que existe entre la mayor tolerancia al etanol y la mayor productividad, rendimiento y eficiencia de fermentación de la cepa BCGC-L-024 sobre la cepa del Ingenio (Pinal Zuazo, 1990), poniendo de manifiesto que la cepa utilizada por el Ingenio de Tala, jalisco no es la adecuada para la producción de alcohol.

FIGURAS

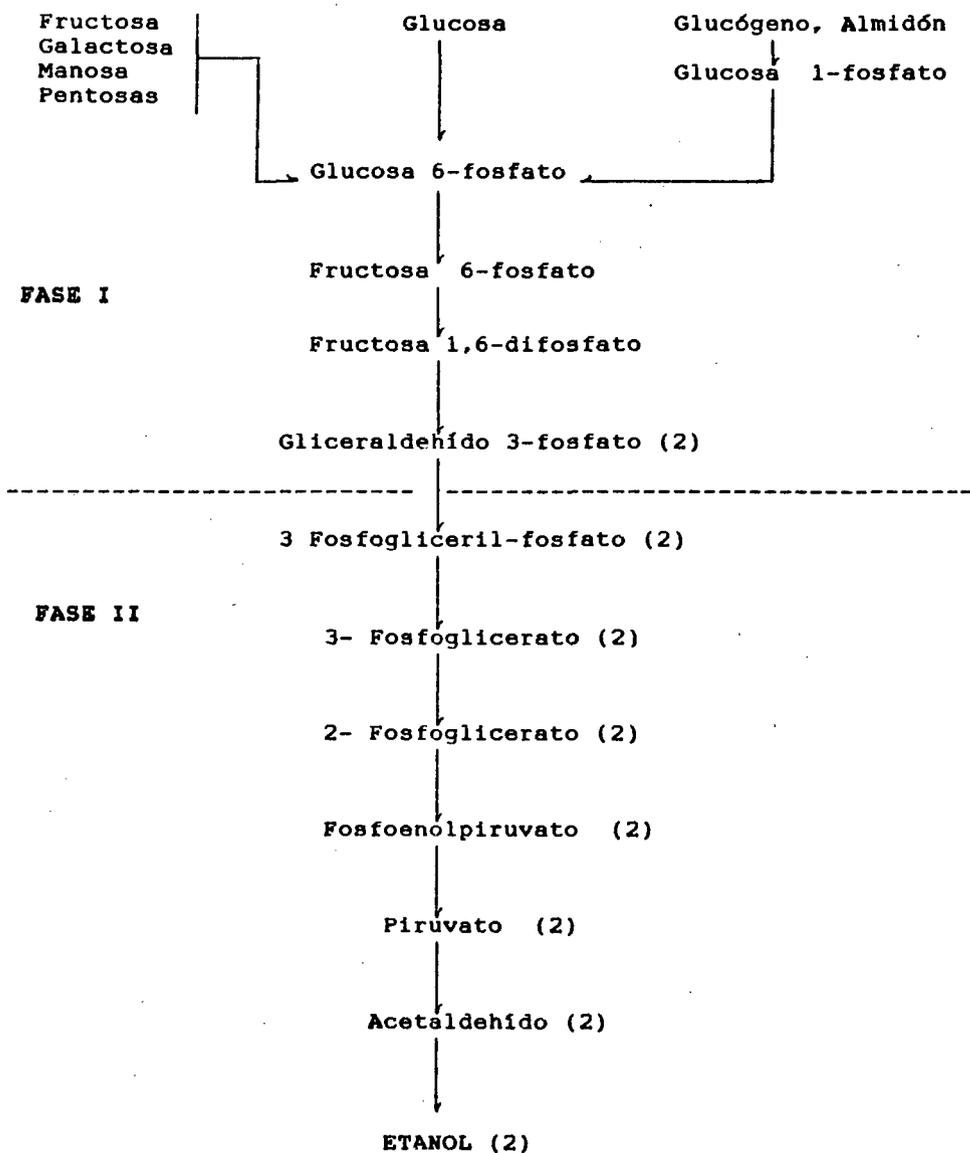
F I G U R A 1.

ESQUEMA GENERAL DE LA FABRICACION DE ALCOHOL



*Bx.: Porcentaje de sólidos totales presentes en una muestra.

FIGURA 2.



(Lehninger, 1985)

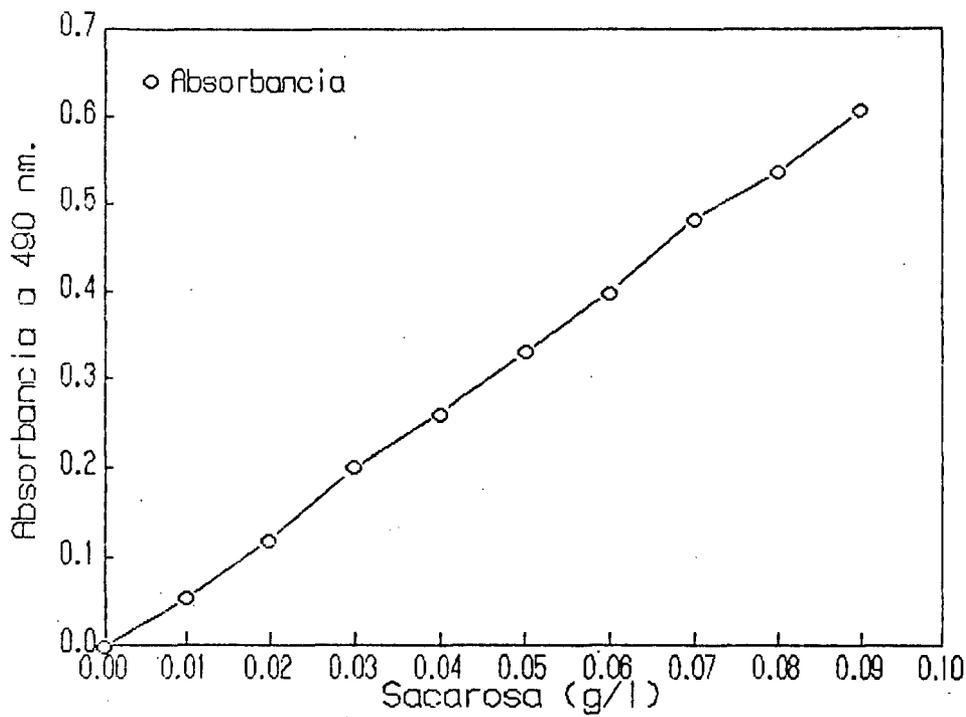


Fig. 3. Curva de calibración para determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico.

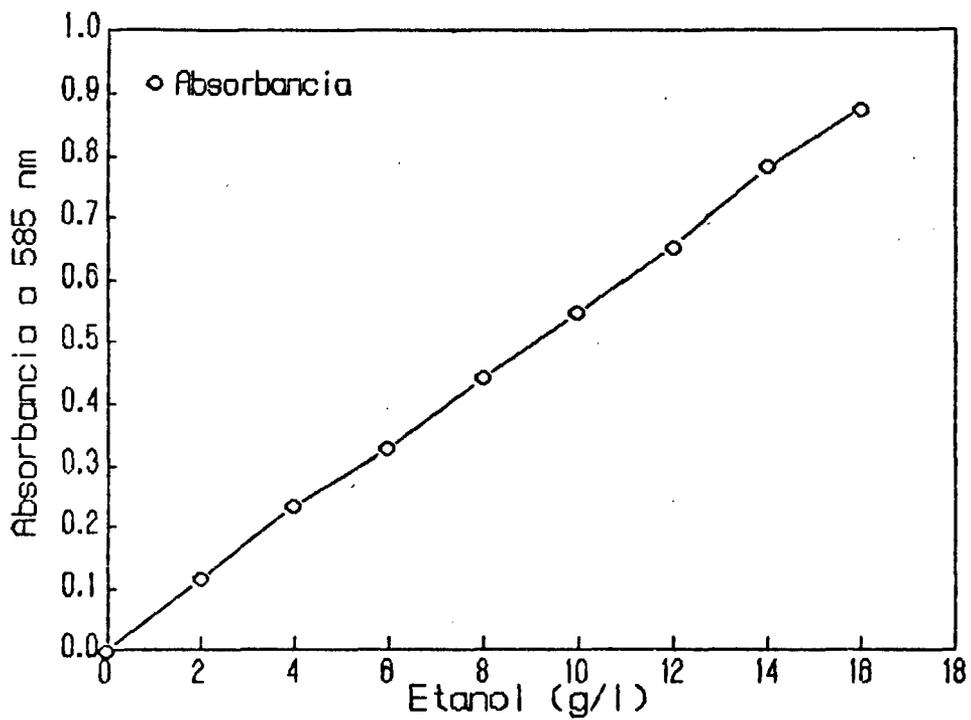


Fig. 4. Curva de calibración para la determinación de etanol por medio de la técnica de dicromato de potasio.

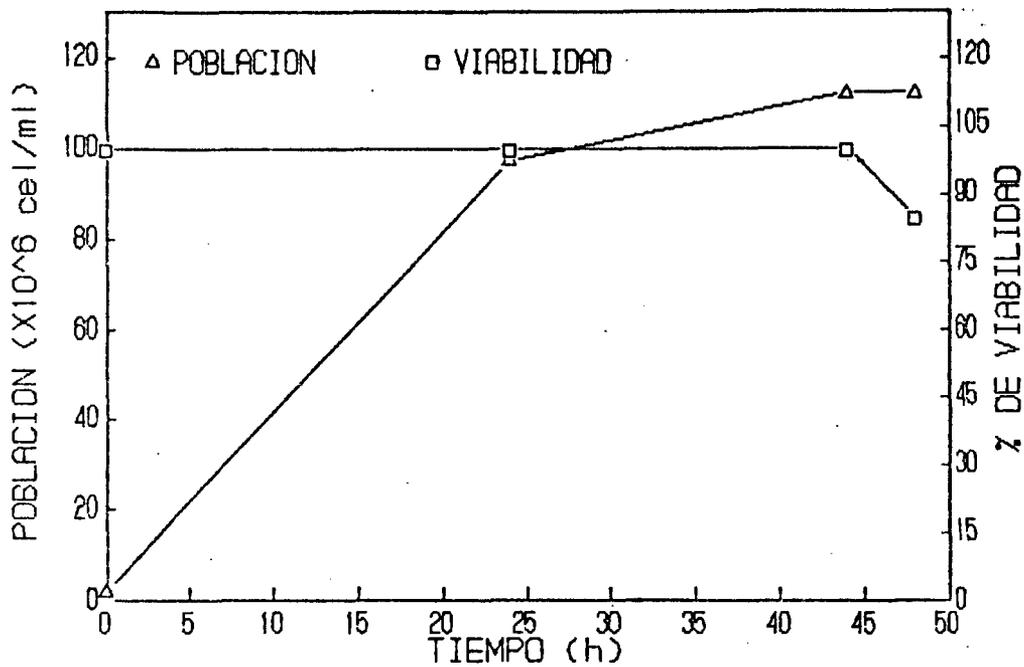


Fig. 5a. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa L-Ingenio, durante 50 horas en medio sólido.

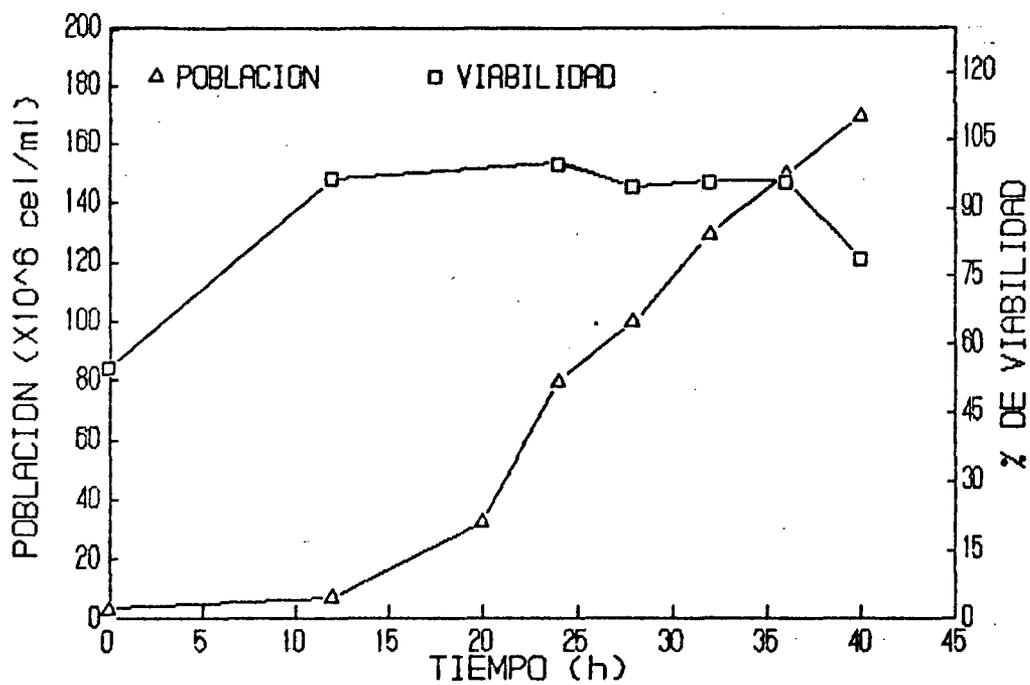


Fig. 5b. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad para la cepa L-Ingenio, durante 40 horas en medio sólido.

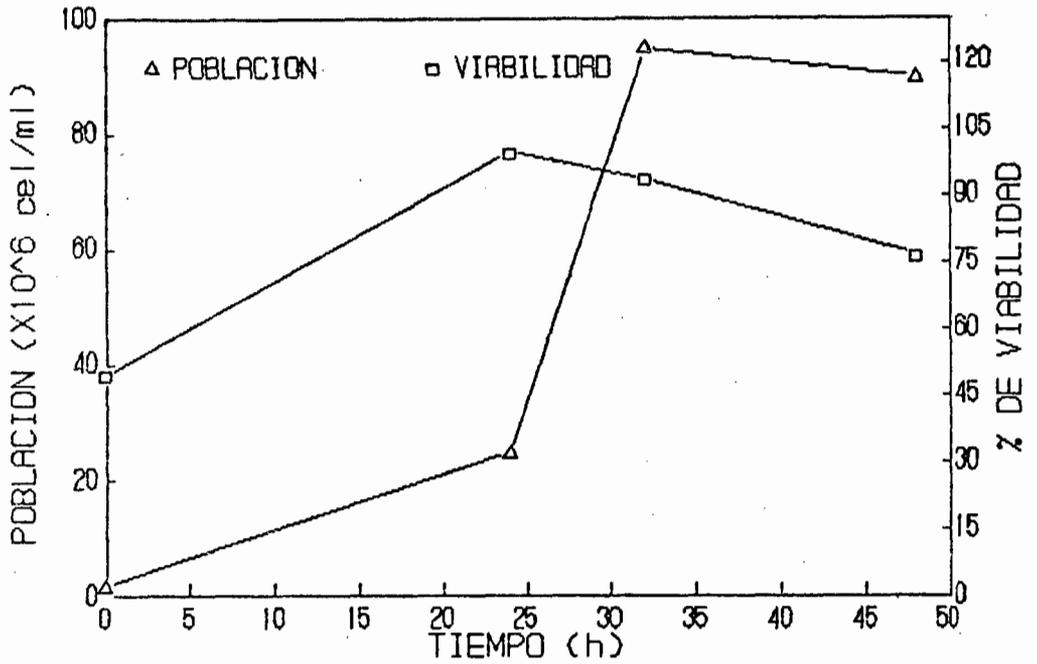


Fig. 6a. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-024, durante 48 horas en medio sólido.

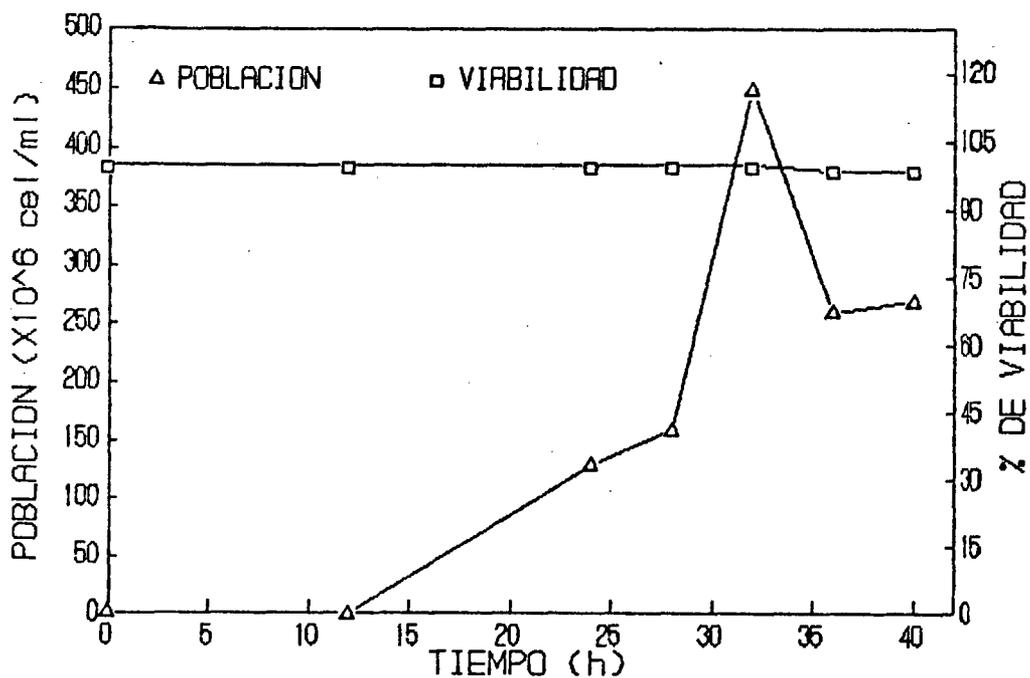


Fig. 6b. Crecimiento celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-024, durante 40 horas en medio sólido.

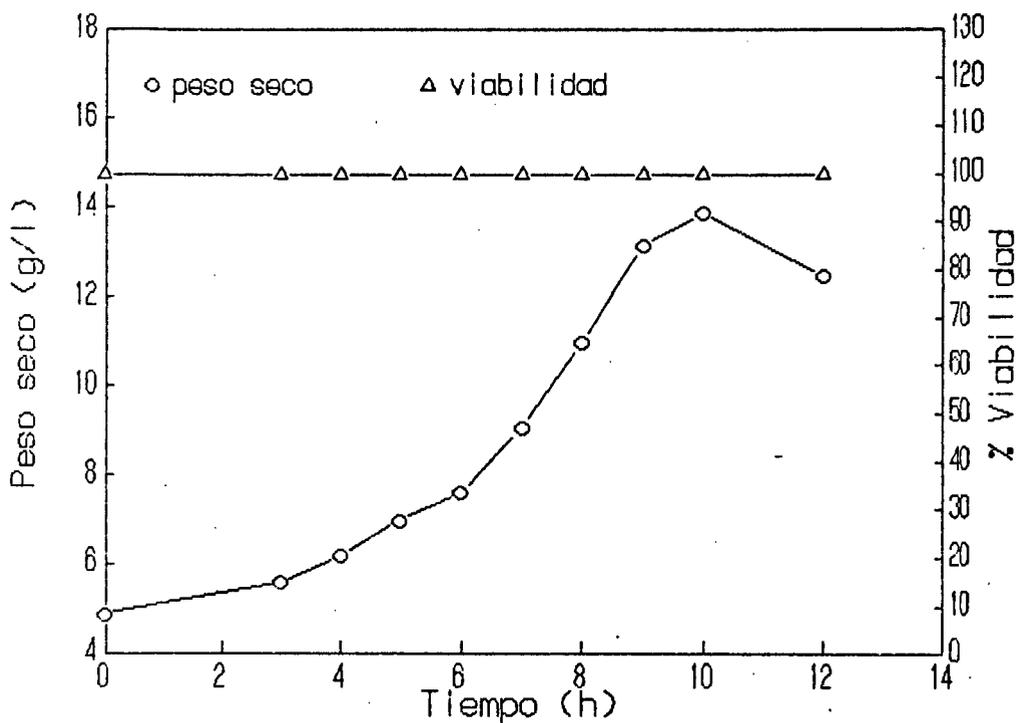


Fig. 7. Población celular y porcentaje de viabilidad de la cepa L-Ingenio, en medio líquido durante 12 horas.

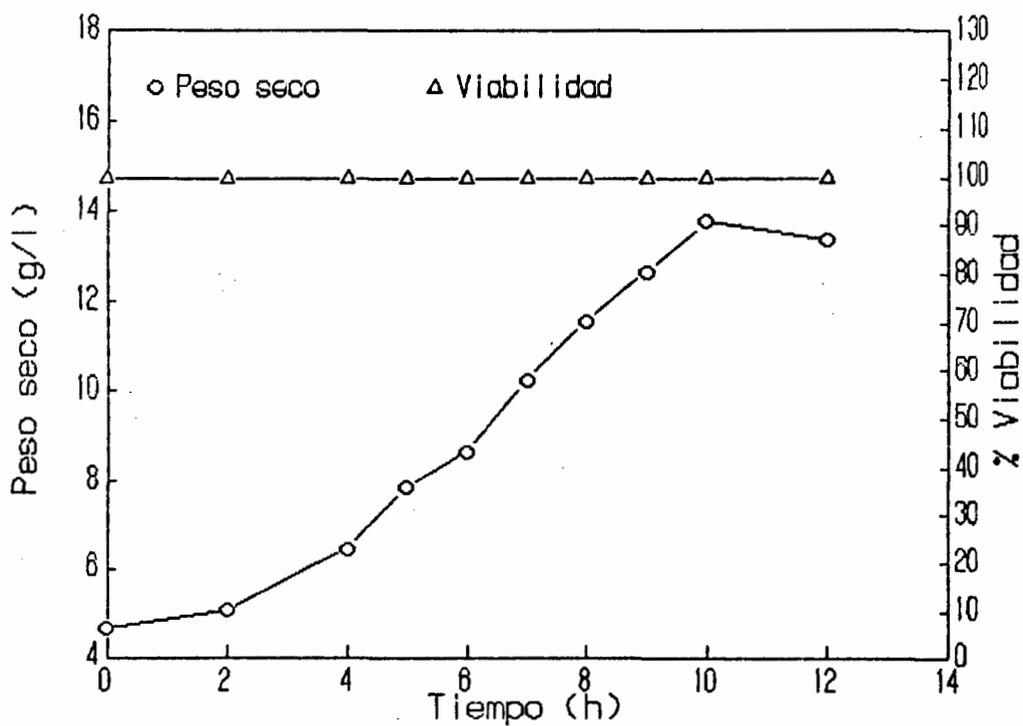


Fig. 8. Población celular y porcentaje de viabilidad de la cepa BCGC L-024, en medio líquido durante 12 horas.

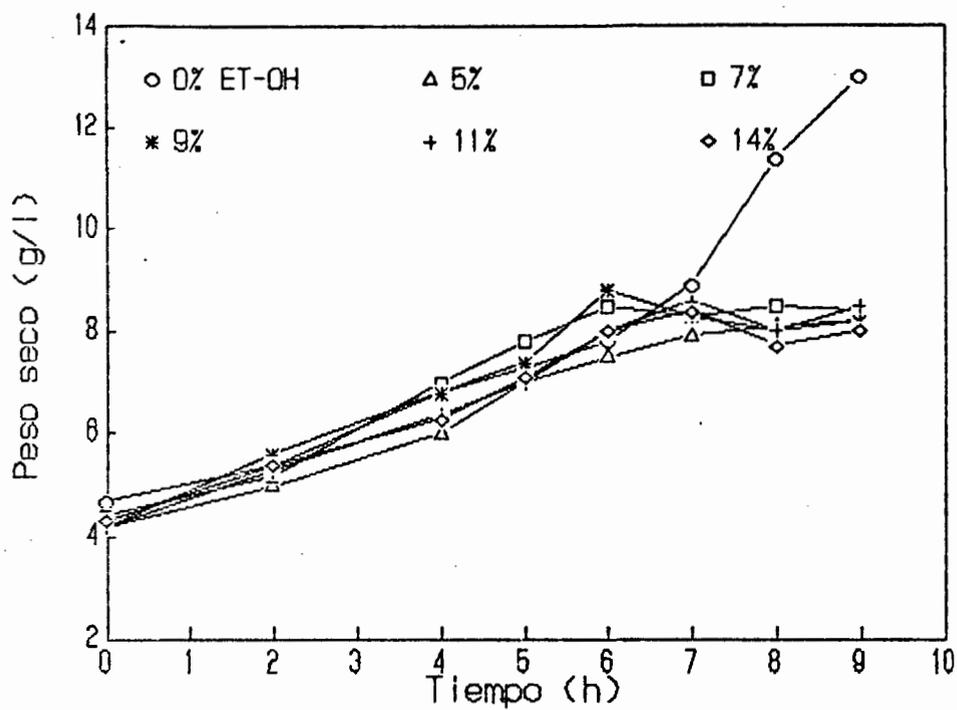


Fig. 9. Crecimiento celular de la cepa L-Ingenuo a diferentes concentraciones de etanol en el medio, durante 9 horas a nivel matraz.

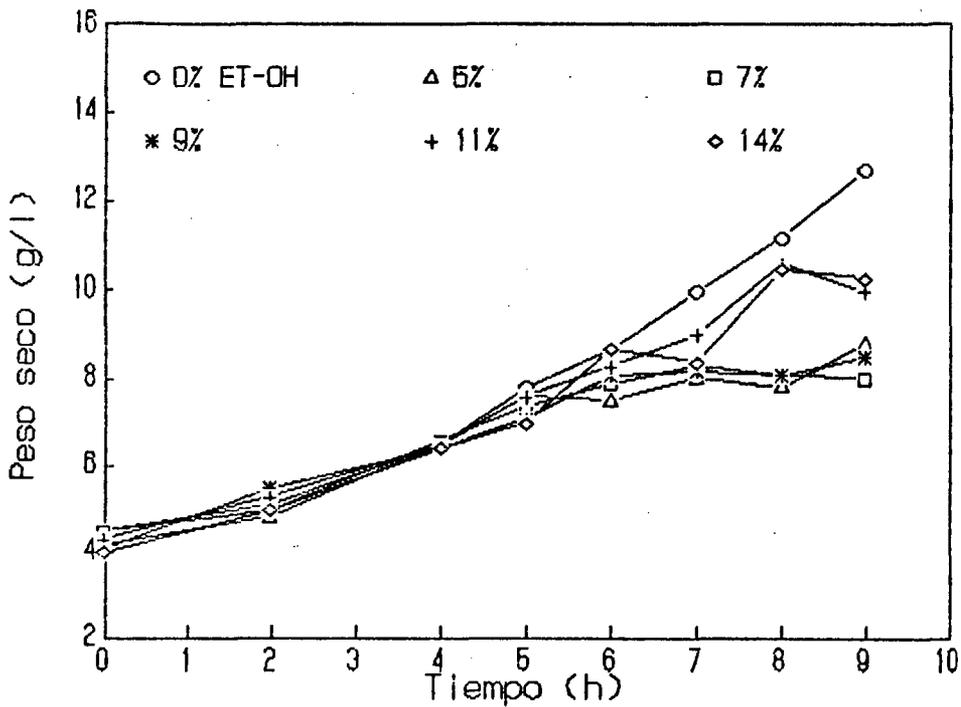


Fig. 10. Crecimiento celular de la cepa BCGC L-024 a diferentes concentraciones de etanol en el medio, durante 9 horas a nivel matraz.

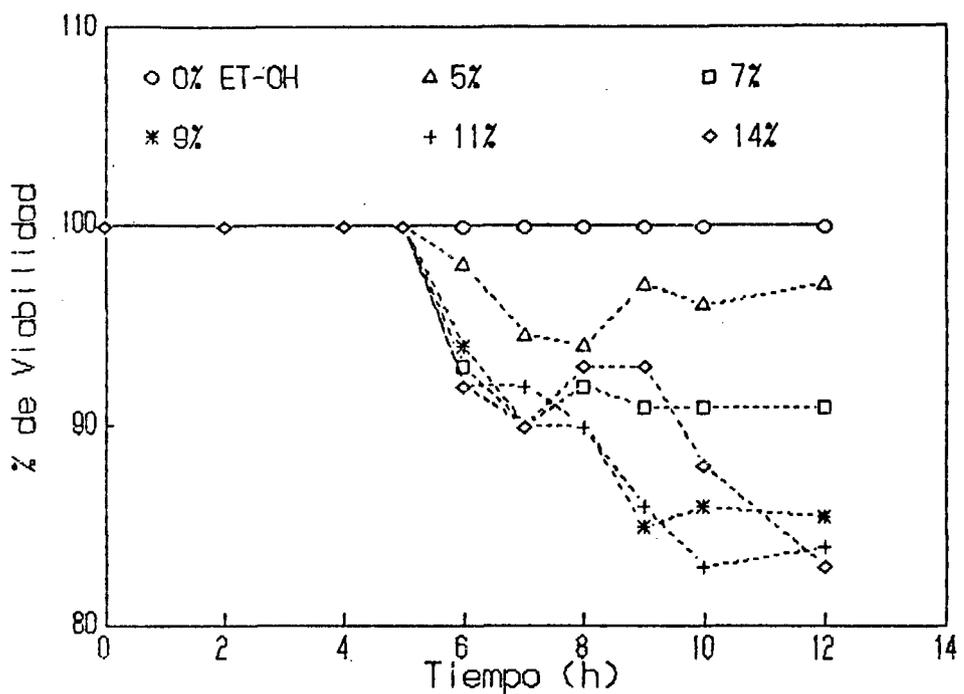


Fig. 11. Porcentajes de viabilidad para la cepa L-Ingenio a diferentes concentraciones de etanol, durante 12 horas de crecimiento a nivel matraz.

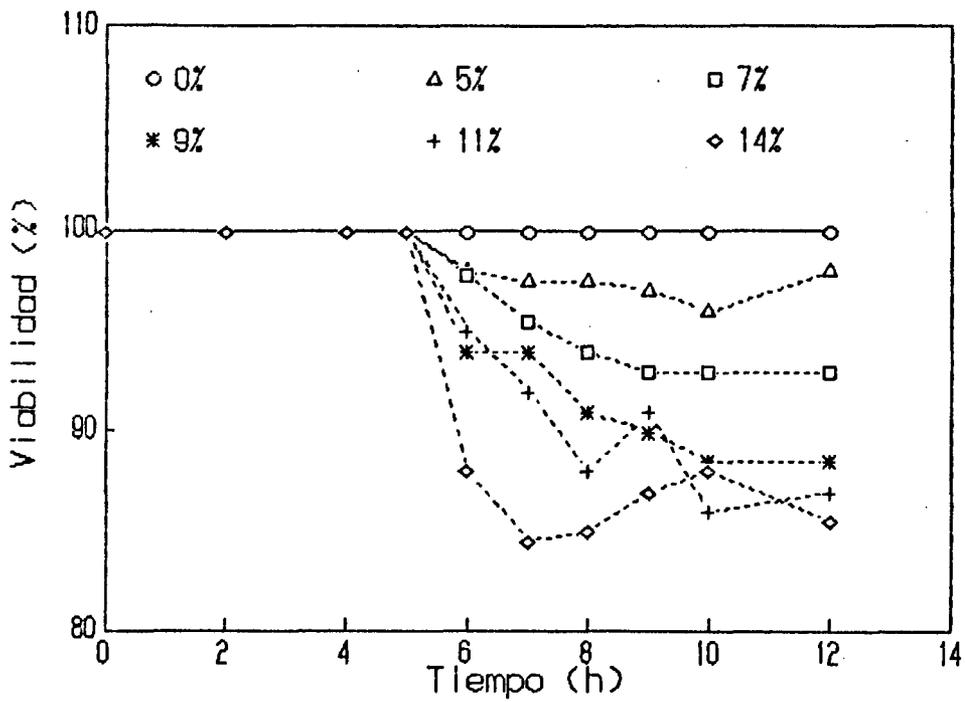


Fig. 12. Porcentaje de viabilidad para la cepa BCGC L-024 a diferentes concentraciones de etanol, durante 12 horas de crecimiento a nivel matraz.

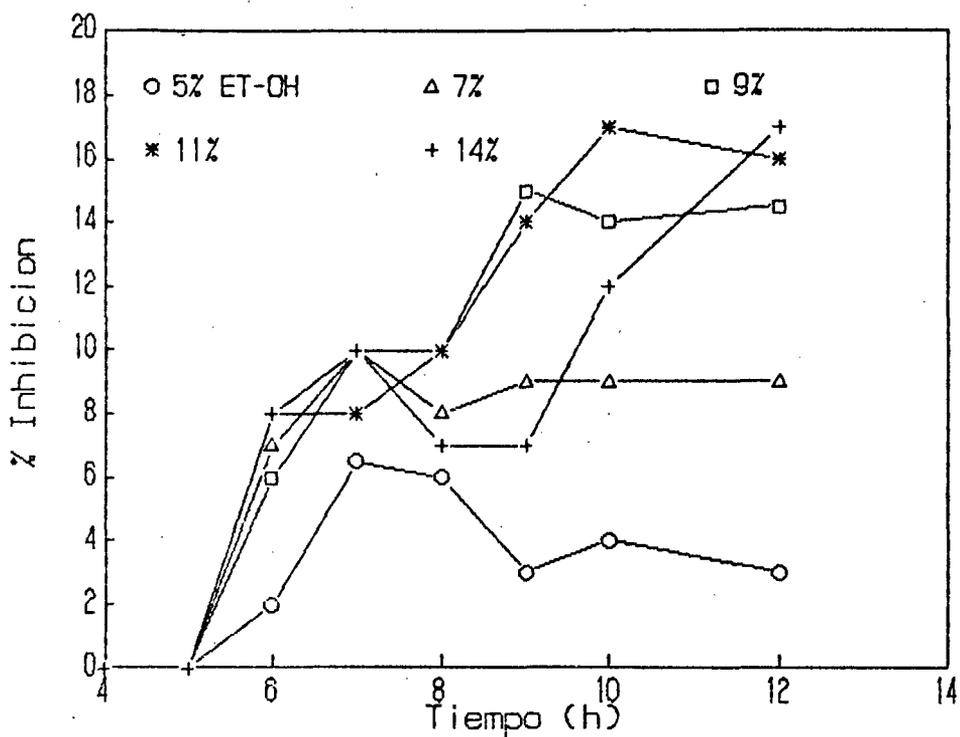


Fig. 13. Porcentaje de inhibición en la viabilidad para la cepa L-Ingenio a diferentes concentraciones de etanol, durante 12 h de crecimiento a nivel matraz.

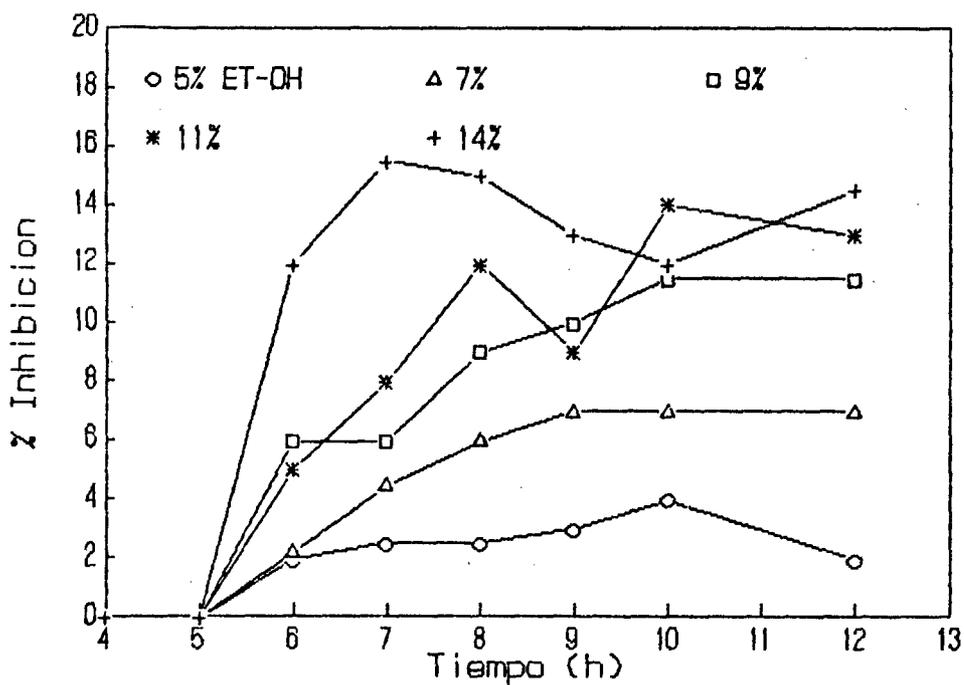


Fig. 14. Porcentaje de inhibición en la viabilidad para la cepa BCGC L-024 a diferentes concentraciones de etanol, durante 12 h de crecimiento a nivel matraz.

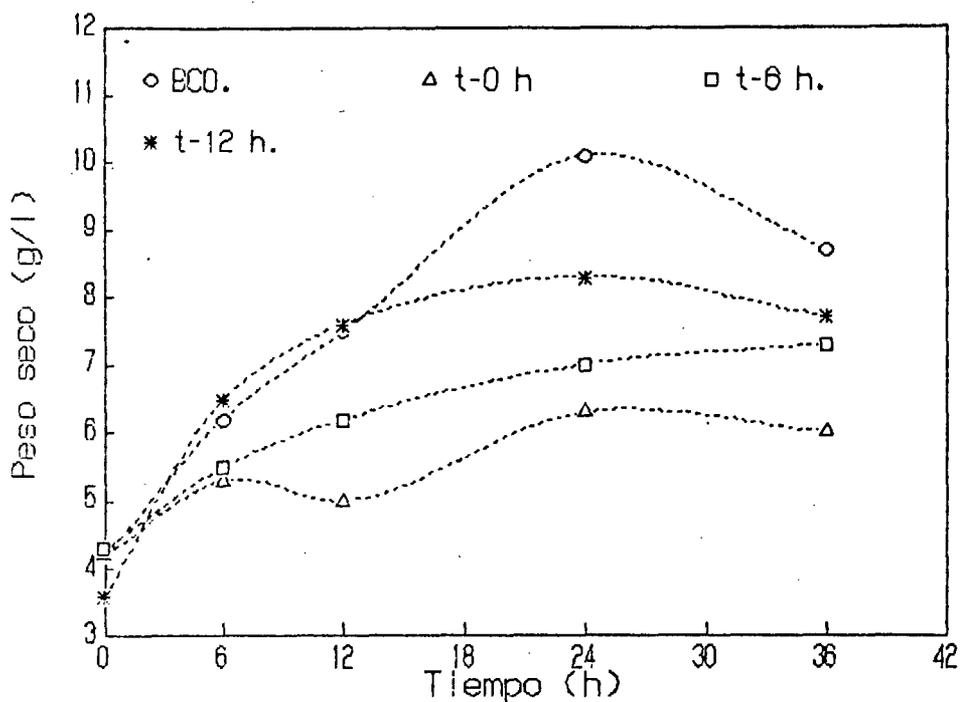


Fig. 15. Estandarización de tiempos para la selección del más óptimo en la adición de etanol al medio durante las fermentaciones a nivel matraz.

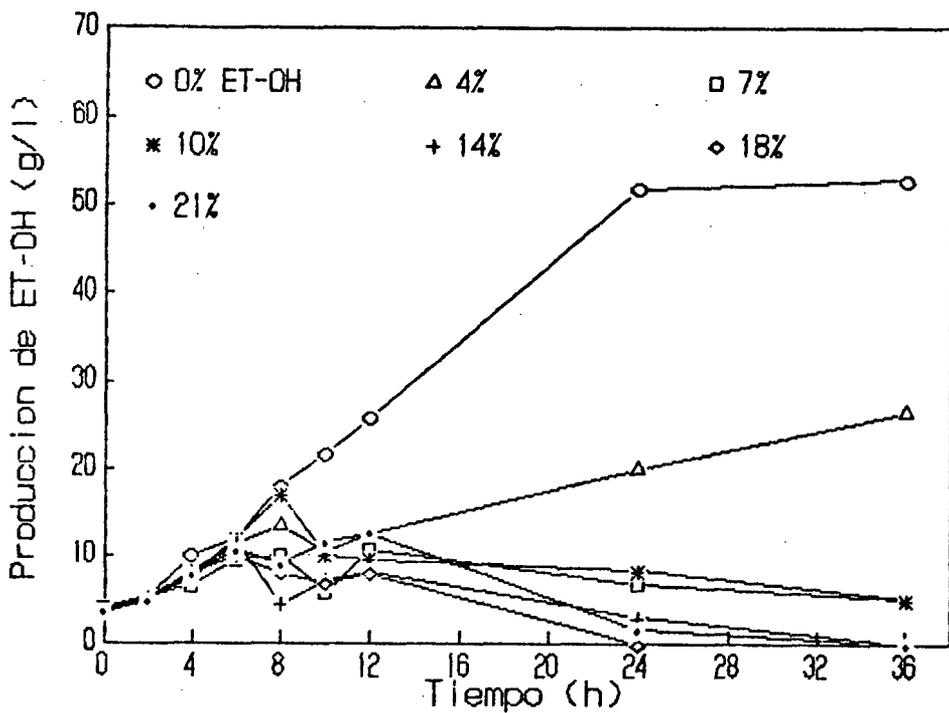


Fig. 16. Producción de alcohol por la cepa L-Ingenio a diferentes concentraciones de etanol en el medio, durante 36 h de fermentación a nivel matraz.

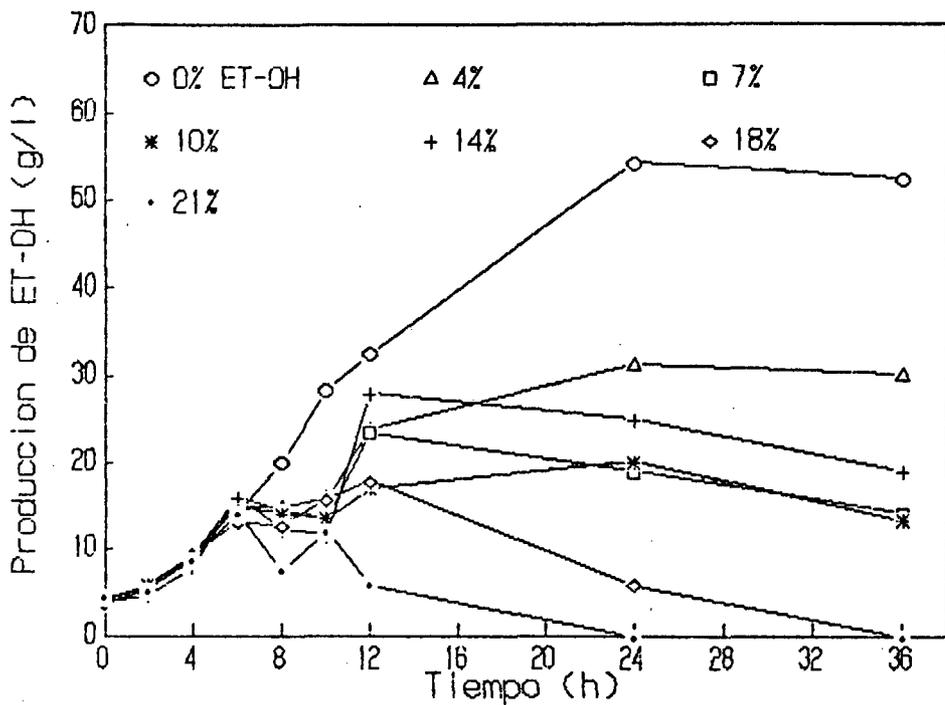


Fig. 17. Producción de alcohol por la cepa BCGC L-024 a diferentes concentraciones de etanol en el medio, durante 36 h de fermentación a nivel matraz.

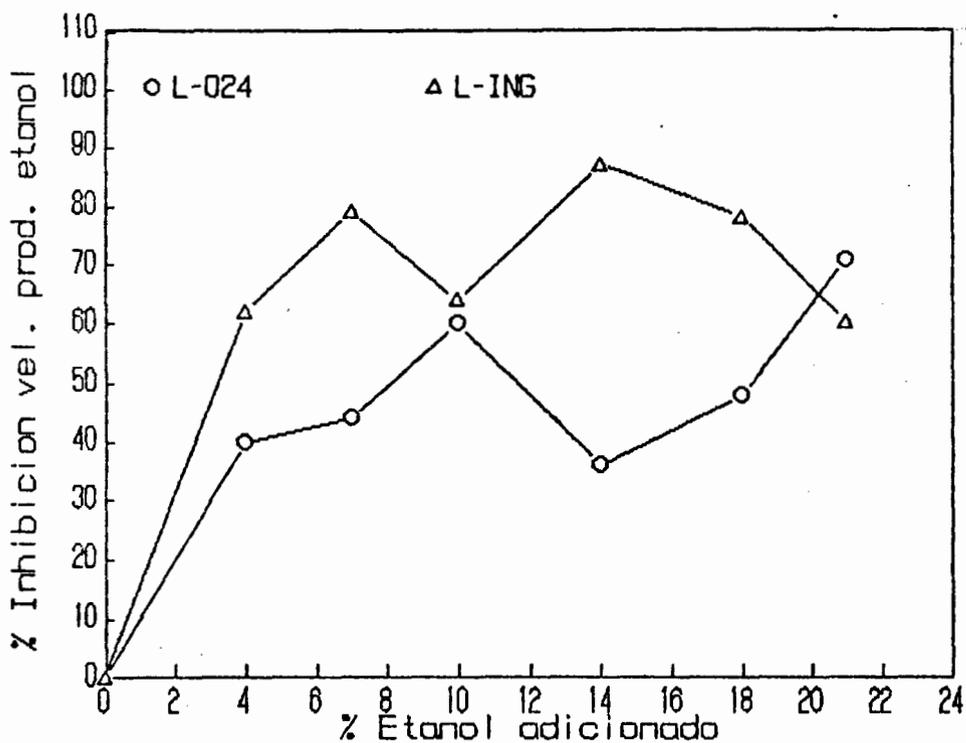
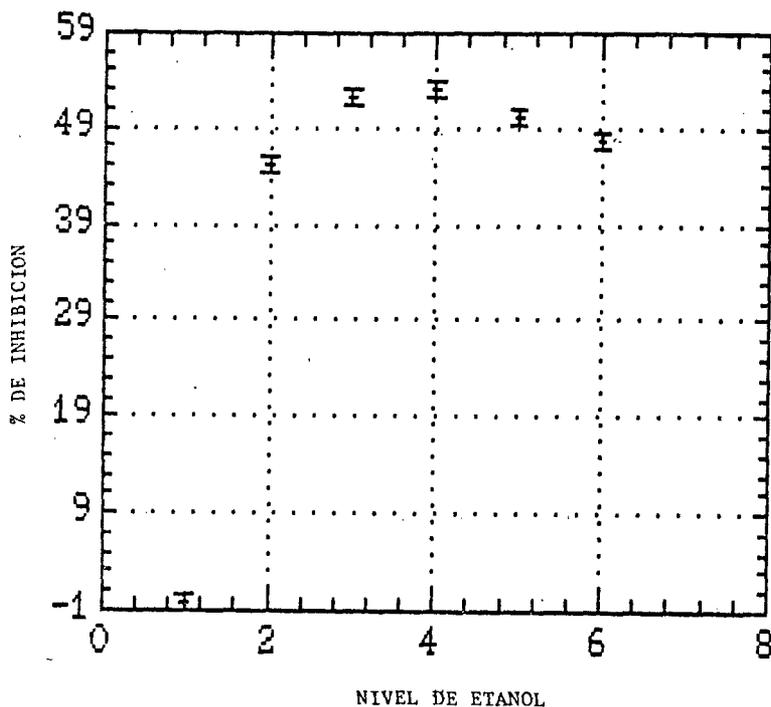
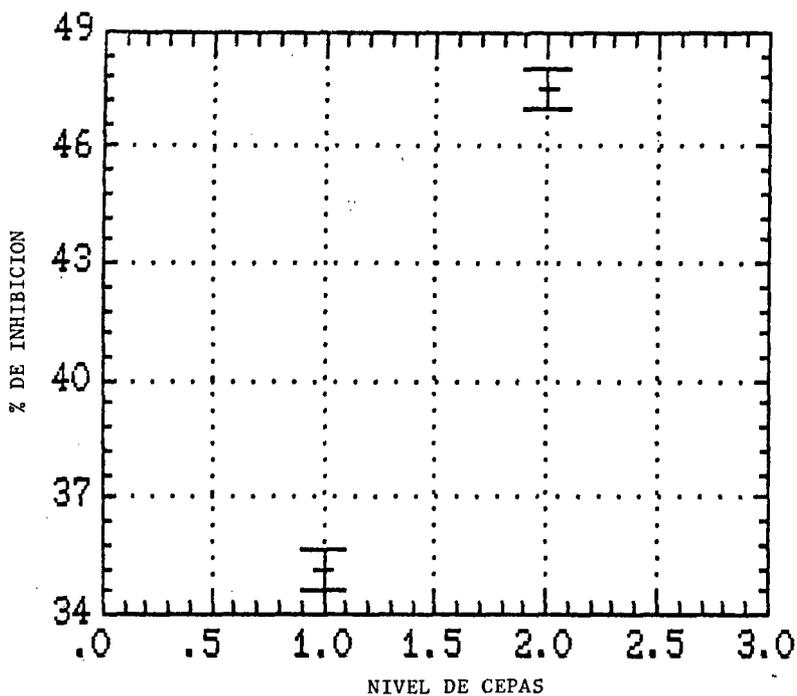


Fig. 18. Porcentaje de inhibición en la velocidad de producción de alcohol por las dos cepas evaluadas, a diferentes concentraciones de etanol en el medio.



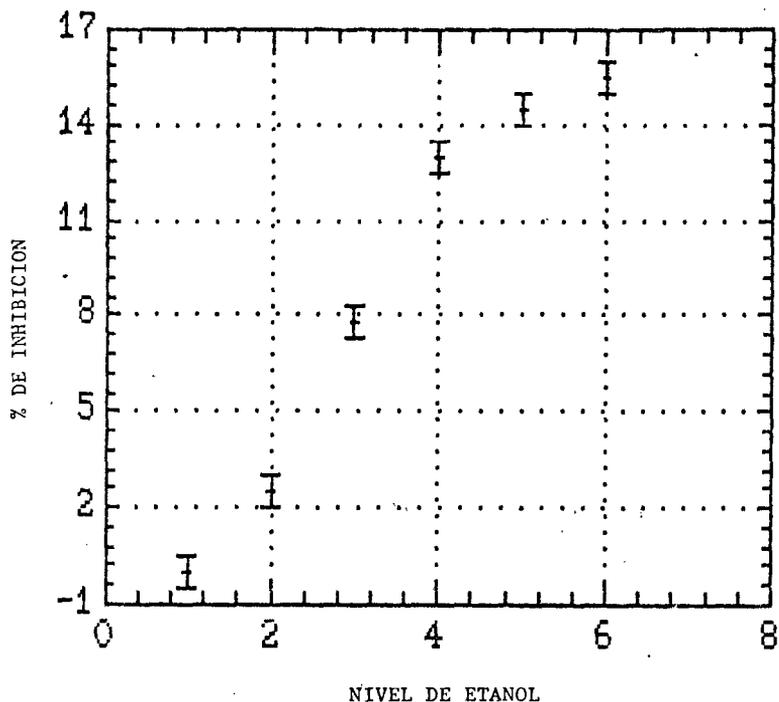
NIVEL DE ETANOL	MEDIDA PROBADA	EFEECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1. 0 %	4	-41.333333	.00000	.853913
2. 5 %	4	3.666667	45.00000	.853913
3. 7 %	4	10.91667	52.25000	.853913
4. 9 %	4	11.66667	53.00000	.853913
5. 11 %	4	8.91667	50.25000	.853913
6. 14 %	4	6.16667	47.50000	.853913

Fig. 19a. Intervalos de error estandar por factores de promedio de las dos cepas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento, en nivel de etanol.



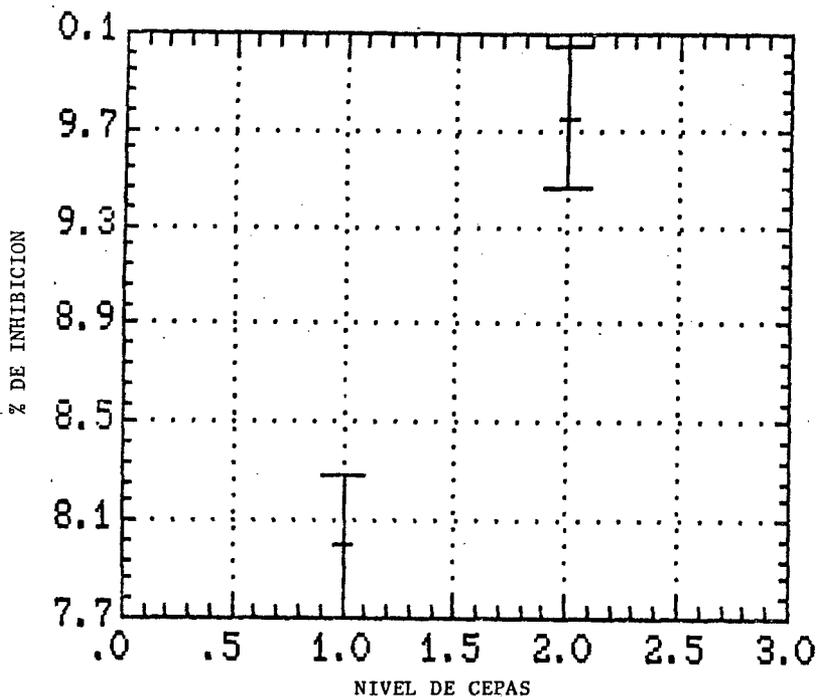
NIVEL DE CEPAS	MEDIDA PROBADA	EFEECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1. BCGC L-024	12	-6.166667	35.16667	.493007
2. L-INGENIO	12	6.166667	47.50000	.493007

Fig. 19b. Intervalos de error estandar por factores de promedio de las dos cepas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento, en nivel de cepas.



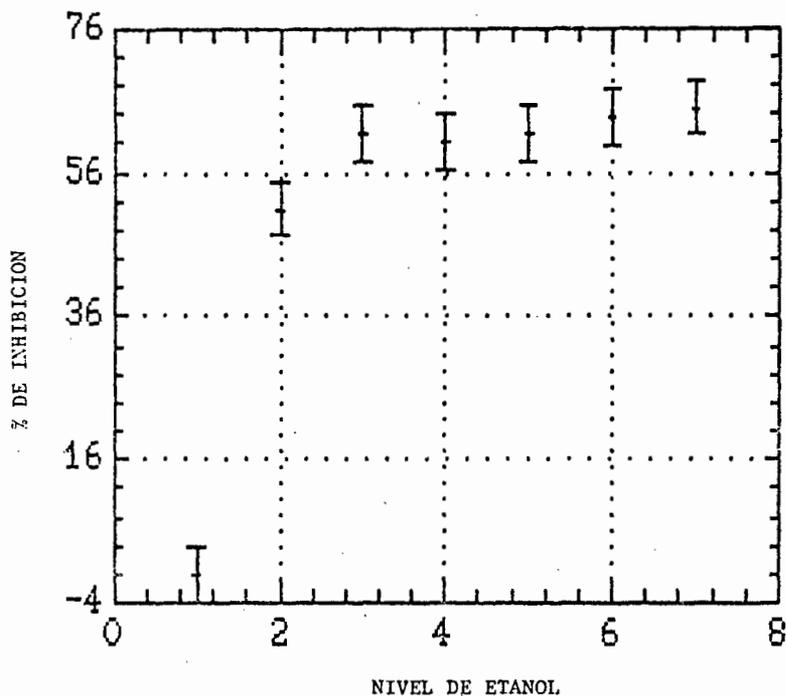
NIVEL DE ETANOL	MEDIDA PROBADA	EFEECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1. 0%	4	-8.875000	.00000	.510310
2. 5%	4	-6.375000	2.50000	.510310
3. 7%	4	-1.125000	7.75000	.510310
4. 9%	4	4.125000	13.00000	.510310
5. 11%	4	5.625000	14.50000	.510310
6. 14%	4	6.625000	15.50000	.510310

Fig. 20a. Intervalos de error estandar por factores de promedio de las dos cepas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad en nivel de etanol.



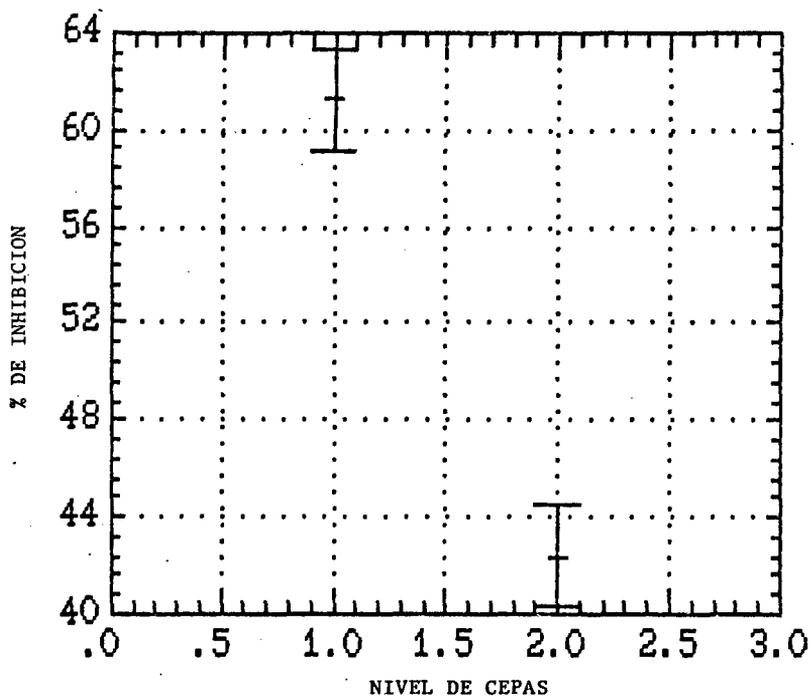
NIVEL DE CEPAS	MEDIDA PROBADA	EFFECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1. BCGC L-024	12	-.875000	8.000000	.294628
2. L- INGENIO	12	.875000	9.750000	.294628

Fig. 20b. Intervalos de error estandar por factores de promedio de las dos cepas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad en el nivel de cepas.



NIVEL DE ETANOL	MEDIDA PROBADA	EFECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1. 0%	4	-51.82143	.00000	3.846380
2. 4%	4	-.82143	51.00000	3.846380
3. 7%	4	9.67857	61.50000	3.846380
4. 10%	4	8.42857	60.25000	3.846380
5. 14%	4	9.67857	61.50000	3.846380
6. 18%	4	11.67857	63.50000	3.846380
7. 21%	4	13.17857	65.00000	3.846380

Fig. 21a. Intervalos de error estándar por factores de promedio de las dos cepas en el porcentaje de inhibición en la habilidad fermentativa en nivel de etanol.



NIVEL DE CEPAS	MEDIDA PROBADA	EFEECTO ESTIMADO	PROMEDIO DE NIVEL	ERROR ESTANDAR
1. L- INGENIO	14	9.392857	61.21429	2.055977
2. BCGC- L-024	14	-9.392857	42.42857	2.055977

Fig. 21b. Intervalos de error estandar por factores de promedio de las dos cepas en el porcentaje de inhibición en la habilidad fermentativa en nivel de cepas.

TABLAS

T A B L A 1.

REACCIONES ENZIMATICAS INVOLUCRADAS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA

No. de Reacción	Reacción catalizada	Enzima involucrada	Cofactores
1	Glucosa + ATP --> glucosa 6-fosfato + ADP	Hexoquinasa	Mg ²⁺
2	Glucosa 6-fosfato <=> fructosa 6-fosfato	Glucosafosfatoisomerasa	
3	Fructosa 6-fosfato + ATP --> fructosa 1,6-difosfato + ADP	Fosfofructoquinasa	Mg ²⁺
4	Fructosa 1,6-difosfato <=> gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxicetona fosfato	Aldolasa	Zn ²⁺
5	Dihidroxicetona fosfato <=> gliceraldehído 3-fosfato	Triosafosfatoisomerasa	
6	Gliceraldehído 3-fosfato + NAD ⁺ + Pi <=> 1,3-difosfoglicerato + NADH	Gliceraldehído 3-fosfsto	
7	1,3-Difosfoglicerato + DAP <=> 3-fosfoglicerato + ATP	Fosfogliceratoquinasa	Mg ²⁺
8	3-fosfoglicerato <=> 2-fosfoglicerato	Fosfoglicerato-mutasa.	2,3-difosfo glicerato
9	2-Fosfoglicerato <=> fosfoenolpiruvato + H ₂ O	Enolasa	Mg ²⁺
10	Fosfoenolpiruvato + ADP --> piruvato + ATP	Piruvatoquinasa	
11	Piruvato --> acetaldehído + CO ₂	Piruvato descarboxilasa	Pirofosfato de tiamina; Mg ²⁺
12	Acetaldehído + NADH <=> etanol + NAD ⁺	Alcoholdehidrogenasa	Zn ²⁺

T A B L A 2.

C E P A	% DE ETANOL					
	0	5	7	9	11	14
BCGC L-024	1.18	0.67	0.60	0.65	0.71	0.81
	1.21	0.66	0.62	0.63	0.73	0.81
	1.24	0.65	0.65	0.61	0.75	0.81
L-INGENIO	1.58	0.84	0.72	0.65	0.63	0.59
	1.62	0.85	0.71	0.66	0.62	0.60
	1.67	0.86	0.70	0.68	0.62	0.61

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ALCANZADA PARA CADA CEPA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL EN EL MEDIO, EN UN TIEMPO DE 12 h A NIVEL MATRAZ.

TABLA 2a

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: Vel. de crecimiento.

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-CALCULADA	F ₀ .establas
TOTAL	2.071333	23			
ETANOL	1.7894333	5	.3578867	429.464	3.11
CEPAS	.0280167	1	.0280167	33.620	4.75
ETANOLxCEPAS	.2438833	5	.0487767	58.532	3.11
ERROR	.0100000	12	.0008333		

HIPOTESIS NULAS

- HO₁. No existe diferencias significativas en la velocidad de crecimiento debido a diferentes concentraciones de etanol.
- HO₂. No existe diferencias significativas en la velocidad de crecimiento debido a las dos cepas probadas.
- HO₃. No existe diferencias significativas en la velocidad de crecimiento debido a la interacción de las concentraciones de etanol y de las cepas probadas.

T A B L A 3.

C E P A	% DE ETANOL					
	0	5	7	9	11	14
BCGC L-024	0	43	50	45	39	31
	0	43	48	47	39	32
	0	43	47	50	40	34
L-INCENIO	0	46	54	58	60	62
	0	47	56	58	61	62
	0	48	58	62	62	63

PORCENTAJE DE INHIBICION EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO PARA CADA CEPA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL EN EL MEDIO, EN UN TIEMPO DE 12 h A NIVEL MATRAZ.

TABLA 3a

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: % inhibición vel. de crecimiento

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-calculada	F _{0.05} tablas
TOTAL	9969.3333	23			
ETANOL	8378.8333	5	1675.7667	574.549	3.11
CEPAS	912.6667	1	912.6667	312.914	4.75
ETANOLxCEPAS	642.8333	5	128.5667	44.080	3.11
ERROR	35.0000	12	2.9167		

HIPOTESIS NULAS

- HO₁. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento debido a diferentes concentraciones de etanol.
- HO₂. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento debido a las dos cepas utilizadas.
- HO₃. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento debido a la interacción de las concentraciones de etanol y de las cepas probadas.

T A B L A 4.

C E P A	% DE ETANOL					
	0	5	7	9	11	14
BCCG L-024	100 100 100	98 98 98	93 93 93	88 88 89	88 87 86	86 85 85
L-INGENIO	100 100 100	96 97 98	90 91 93	86 85 85	83 84 85	83 83 84

PORCENTAJE DE VIABILIDAD ALCANZADO POR CADA CEPA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL EN EL MEDIO, EN UN TIEMPO DE 12 h DE CRECIMIENTO A NIVEL MATRAZ.

TABLA 4a.

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: % de viabilidad

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-calculada	F _o .establas
TOTAL	890.62500	23			
ETANOL	852.87500	5	170.5750	163.752	3.11
CEPAS	18.37500	1	18.3750	17.640	4.75
ETANOLxCEPAS	6.87500	5	1.3750	1.320	3.11
ERROR	12.50000	12	1.0416		

HIPOTESIS NULAS

- Ho₁. No existe diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad debido a diferentes concentraciones de etanol.
- Ho₂. No existe diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad debido a las dos cepas probadas.
- Ho₃. No existe diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad debido a la interacción de las concentraciones de etanol y las cepas probadas.

T A B L A 5.

C E P A	% DE ETANOL					
	0	5	7	9	11	14
BCGC L-024	0	2	7	12	12	14
	0 0	2 2	7 7	12 12	12 12	14 14
L-INGENIO	0	4	10	14	17	17
	0 0	2 3	7 7	14 14	15 16	16 16

PORCENTAJE DE INHIBICION EN LA VIABILIDAD EN CADA CEPA CON -
 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL EN EL MEDIO, EN UN TIEM
 PO DE CRECIMIENTO DE 12 h A NIVEL MATRAZ.

TABLA 5a

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: % inhibición de la viabilidad

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-calculada	F ₀ .establas
TOTAL	890.62500	23			
ETANOL	852.87500	5	170.57500	163.752	3.11
CEPAS	18.37500	1	18.37500	17.640	4.75
ETANOLxCEPAS	6.87500	5	1.37500	1.320	3.11
ERROR	12.50000	12	1.04167		

HIPOTESIS NULAS

- Ho₁. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad debido a diferentes concentraciones de etanol.
- Ho₂. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad debido a las dos cepas probadas.
- Ho₃. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad debido a la interacción de las concentraciones de etanol y las cepas probadas.

T A B L A 6.

C E P A	% DE ETANOL						
	0	4	7	10	14	18	21
L-ING	1.8803	0.5303	0.4535	0.7125	0.2428	0.4607	0.875
	1.891	0.7134	0.3821	0.6866	0.2419	0.4008	0.7679
	1.9017	0.8964	0.3107	0.6607	0.2410	0.3410	0.6607
L-024	2.619	1.6928	1.2625	0.9028	1.5142	1.1714	0.59
	2.5303	1.5062	1.3919	1.0877	1.6062	1.2937	0.7228
	2.441	1.3196	1.5214	1.2728	1.6982	1.4160	0.8557

PRODUCCION DE ALCOHOL ALCANZADA PARA CADA CEP A A DIFERENTES CONCEN
TRACIONES DE ETANOL EN EL MEDIO, EN UN TIEMPO DE 36 h A NIVEL MA--
TRAZ.

TABLA 6a

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: Producción de alcohol

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-CALCULADA	F _{0.05} tablas
TOTAL	11.389225	27			
ETANOL	6.1691519	6	1.0281920	38.592	2.85
CEPAS	3.6266403	1	3.6266403	136.120	4.6
ETANOLxCEPAS	1.220431	6	.2034053	7.635	2.85

HIPOTESIS NULAS

- HO₁. No existe diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol debido a diferentes concentraciones de etanol.
- HO₂. No existe diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol debido a las dos cepas probadas.
- HO₃. No existe diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol debido a la interacción de las concentraciones de etanol y de las dos cepas probadas.

T A B L A 7.

C E P A	% DE ETANOL						
	0	4	7	10	14	18	21
L-ING	0 0	71 61 52	75 79 83	62 63.5 65	87 87 87	75 78.5 82	53 59 65
L-024	0 0	35 40.5 46	51 44 37	65 57 49	42 36 30	55 48.5 42	77 71 65

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ALCOHOL
 ALCANZADO PARA CADA CEPA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL -
 EN EL MEDIO, EN UN TIEMPO DE 36 h A NIVEL MATRAZ.

TABLA 7a

ANALISIS DE VARIANZA

VARIABLE RESPONSABLE: % inhibición de la vel. de producción de alcohol

FUENTE VARIACION	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA CUADRADOS	F-CALCULADA	F _{0.05} tablas
TOTAL	19200.107	27			
ETANOL	13018.357	6	2169.7262	36.664	2.85
CEPAS	2470.321	1	2470.3214	41.744	4.6
ETANOLxCEPAS	2882.929	6	480.4881	8.119	2.85
ERROR	828.500	14	59.1786		

HIPOTESIS NULAS

- H₀₁. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol debido a diferentes concentraciones de etanol.
- H₀₂. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol debido a las dos cepas probadas.
- H₀₃. No existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol debido a la interacción de las concentraciones de etanol y de las cepas probadas.

T A B L A 8

C E P A	Yp/s
L-Ingenio	$\frac{51}{164} - \frac{3.7}{46} = 0.40$
BCGC L-024	$\frac{55}{163} - \frac{3.9}{48} = 0.44$

* Y/ps: Rendimiento del producto en base al sustrato.

Rendimiento de la fermentación (Yp/s) de las dos cepas sin adicionarles etanol después de 24 horas de fermentación.

ANEXOS

ANEXO 1.

1.- El rendimiento (Y_p/s): son los gramos producidos del metabolito en cuestión entre los gramos de sustrato consumidos.

$$Y_p/s = \frac{g \text{ ET-OH (final)} - g \text{ ET-OH (inicial)}}{g \text{ ART (inicial)} - g \text{ ART (final)}}$$

2.- 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 corresponderá a la velocidad máxima de producción de alcohol. Se calcula con la ayuda de un programa de computadora (NUMERICO).

3.- La productividad se calcula dividiendo la concentración máxima de alcohol entre el tiempo de fermentación requerido para alcanzarla.

$$p = \frac{g \text{ de ET-OH}}{\text{tiempo (h)}}$$

BIBLIOGRAFIA

XII. BIBLIOGRAFIA

Bohringer P. y Jakob L., 1964. The determination of Alcohol using chromic acid. Zeitschr. Flussiges Abst. , 31, 223.

Concheiro A, A., 1985. Biotecnología y Energía. Perspectivas de la biotecnología en México. Ramirez Q. R. (editor). CONACyT, 445-461.

Correa L., 1978. Estudio de la acción de las enzimas sobre la fermentación. Tesis profesional, Ingeniero Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas, U. de G.

Crueger W. y Crueger A., 1984. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Brock T. D. (editor) 1er. Edition, Sanaver Associates Inc. 121-126.

D'amore T., Panchal C. J. y Stewart G.G., 1988. Intracellular Ethanol Accumulation in Saccharomyces cerevisiae during Fermentation. Applied and Environmental Microbiology 54 (1): 110-114.

Dubois M., Gilles K. A. et al., 1956. Colorimetric Method for Determination of sugar and Related Substances. Analytical Chemistry. 28 (3): 350-356.

Esener A. A., Roels J. A. y Rose N.W., 1982. Effects of Ethanol on maximum Temperature for Growth of Saccharomyces cerevisiae: A model. Biotechnology and Bioengineering. 24 1881-1884.

Jimenez J. y Benitez T., 1987. Adaptation of Yeast Cell Membranes to Ethanol. Applied and Environmental Microbiology. 53 (5): 1196-1198.

Jones R. P., 1989. Biological principles for the effects of ethanol. Enzyme and Microbial Technology. 11 (3): 129-153.

Kalmokoff M. L. y Iglew W. M., 1985. Evaluation of Ethanol Tolerance in Selected Saccharomyces strains. ASBC journal. 43 (4): 189-196.

Kirk - Othmer, 1981. Alcohol Industrial. Producción de alcohol. Enciclopedia de la tecnología química. UTEHA. 1 : 745-781.

Leao, C., y N van Uden. 1984. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 774: 43-48.

Lehninger A. L., 1985. Bioquímica . Ed. Omega S. A. Barcelona , España. pp. 427-449.

Moulin G., Boze H. y Galzy P., 1980. Inhibition of Alcoholic Fermentation by Substrate and Ethanol. Biotec. and Bioengineering.

22 : 2375-2381.

Moreira J. R. y Goldemberg J., 1981. El programa del alcohol en Brasil. Investigación y Ciencia. 61: 96-104.

Nobais R. C. y Sá-Correira I., 1988. Influence of ion calcium in tolerance to ethanol of Saccharomyces bayanus in alcoholic fermentation by yeast. Applied and Environmental Microbiology. 54 (10): 2439-2446.

Nagodawithana T. W. y Steinkraus K. H., 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in "rapid fermentation". Appl. Environ. Microbiol. 31: 158-162.

Novak M., Strchaliano P., Moreira M. y Goma G., 1981. Alcoholic fermentation: On the Inhibitory Effect of Ethanol. Biotechnology and Bioengineering. 23 : 201-211.

Pellón J. R., 1986. La ingeniería Genética y sus Aplicaciones. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 175-180.

Pinal Z., 1990. Comparación de la producción de alcohol de cuatro cepas de Saccharomyces cerevisiae. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias, U. de G.

Presscot y Dunn., 1976. Producción industrial de alcohol por fermentación. Microbiología Industrial. pp. 110-133.

Rose A. y Harrison J.S., 1980. The Yeast, Fisiology and Biochemistry of Yeast. London and New York. 2: 122-124.

Stewart G. G. y Russell I., 1985. The Biology of Saccharomyces. In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain A. L. y Solomon N. A. (comp.) Biotechnology series. pp. 511-536.

Sturion C. A., 1988. Tecnología de la producción de alcohol por fermentación. GEPLACEA. pp. 25-38.