

1989-B

COD. N<sup>o</sup>. 082535039

---

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL ION CALCIO EN LA TOLERANCIA  
ALCOHOLICA DE UNA CEPA Saccharomyces cerevisiae

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A

**GRICELDA SAHAGUN CORONA**

GUADALAJARA, JALISCO.

JUNIO 1992



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

Sección .....  
 Expediente .....  
 Número .....

C. GRICELDA SAHAGUN CORONA  
 P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL ION CALCIO EN LA TOLERANCIA ALCOHOLICA DE UNA CEPA DE Saccharomyces cerevisiae " para obtener la Licenciatura en Biología.

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

A T E N T A M E N T E  
 " PIENSA Y TRABAJA "  
 "AÑO DEL BICENTENARIO"  
 Guadalajara, Jal., 09 de Junio de 1992.  
 EL DIRECTOR



M. EN C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS

EL SECRETARIO

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

c.c.p. M. en C. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil. Directora de tesis. pte. -  
 c.c.p. - El expediente del alumno.

JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

Al contestar este oficio citese fecha y número



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

MAYO 6 DE 1992.

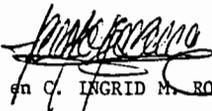
M. en C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS.  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.  
P R E S E N T E.

Por este medio comunico a usted que la Srta. Gricelda Sahagún Corona, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de la tesis titulada: "Estudio de la Influencia del Ion Calcio en la tolerancia Alcohólica de una Cepa 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. en C. INGRID M. RODRIGUEZ BUENFIL

AGRADECIMIENTOS

ESPECIALES

**A DIOS:**

Por ser siempre la guía de mi camino.

**A MIS PADRES:**

Por su amor, paciencia y apoyo constante para la realización de una más de mis metas fijadas en la vida.

**A MIS HERMANOS:**

Alfredo, Jesús, Zoila, Raquel, Alex, Lucía, Teresa, Guadalupe y Martha.

Por su apoyo, ya que cada uno de ellos significaron un estímulo constante para la realización de éste trabajo y seguir adelante, forjando en mí un espíritu de superación personal. Especialmente agradezco a Tere su esfuerzo y ayuda incondicional que siempre me ha dado.

**A TI:**

Por compartir conmigo uno más de mis logros, dandome siempre tu tiempo, apoyo y todo lo mejor de ti.

Con amor y respeto les dedico especialmente estas palabras, por ser las personas que han hecho de mí lo que soy.

Infinitamente.....

**GRACIAS**

**MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO.**

**Al centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C.:**

**Por permitir realizar mi trabajo de tesis profesional brindandome todas las facilidades dentro de sus instalaciones.**

**A mi director de tesis M. en C. Ingrid Mayanin Rodriguez Buenfil:**

**Por sus conocimientos, apoyo constante, paciencia y dedicación que me brindó como guía en la realización de éste trabajo.**

**A todos mis compañeros y amigos que forman, o formaron parte del departamento de Microbiología y Fermentaciones:**

**Por sus consejos y apoyo, así como por su valiosa amistad que todos demostraron hacia mi.**

**A todos mis compañeros y grandes amigos de la onceava generación de biólogos de la generación 85-89 Adolfo Espinoza de los Monteros Cardenas, especialmente a los del grupo "B" de la Facultad de Ciencia Biológicas de la U de G, por sus ánimos de seguir siempre adelante.**

**A todos y cada uno de ellos de manera muy especial especial sinceramente....**

**G R A C I A S**

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL CENTRO  
DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y  
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO (CIATEJ) A.C.

EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y  
FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE  
BIOTECNOLOGIA, CON LA DIRECCION DE LA  
M. EN C. INGRID MAYANIN RODRIGUEZ BUENFIL.

## RESUMEN

Se evaluó la influencia del ion calcio en la tolerancia al etanol de una cepa de Saccharomyces cerevisiae, del Banco de Cepas y Genes de CIATEJ (BCGC-L-024), tomando como base las respuestas de velocidad de crecimiento, viabilidad, velocidad de producción de alcohol y rendimiento así como el porcentaje de inhibición para cada caso, al adicionarsele el 8 % de etanol a los medios, el cual es considerado tóxico para esta cepa.

Se utilizaron dos medios de fermentación, que fueron denominados Medio Base y medio de Mosto Tequilero. Las concentraciones de calcio, se probaron en un rango de 20 a 200 mg/l (.5 a 5 mM), como  $\text{CaCl}_2$ .

El porcentaje de inhibición producido normalmente por el etanol adicionado, así como el porcentaje de inhibición alcanzado para cada una de las respuestas analizadas en cada uno de los medios utilizados, con las concentraciones de calcio, se calcularon tomando como base dos testigos, a los cuales no se les adicionó calcio, a uno de ellos se le adicionó etanol y a el otro no.

Los análisis de varianza pusieron de manifiesto la influencia positiva del calcio en la tolerancia de la cepa al etanol, ya que que causó una disminución en el porcentaje de inhibición provocada normalmente por el etanol en el medio de fermentación. El rango de concentración de calcio que mostró tener la influencia positiva en las respuestas analizadas, fue de 20 a 80 mg/l, sobresaliendo la concentración de 40 mg/l (1mM) ya que esta obtuvo el menor porcentaje de inhibición (comparada con el medio testigo) que incluso fue negativo, indicando un mejoramiento en la fermentación y aumentado así la tolerancia al etanol de la cepa.

Por arriba de estas concentraciones se observó un efecto negativo del calcio, ya que presentaron un alto porcentaje de inhibición en las respuestas analizadas, con respecto al medio testigo.

Se seleccionó la concentración de 40 mg/l de calcio, para realizar una segunda fermentación en Medio Base, probando diferentes concentraciones de azúcar (150 y 200 g/l de glucosa), con un medio testigo para cada caso. En esta fermentación no se adicionó etanol, si no que se dejó producir naturalmente por la levadura; tomando como base las respuestas de velocidad de producción de alcohol, rendimiento y eficiencia.

Los análisis de varianza pusieron de manifiesto que con la concentración de calcio seleccionada y la concentración de 150 g/l de azúcar se alcanzaron los valores más altos en las respuestas analizadas, pero estas fueron más bajas comparadas con los resultados de la fermentación donde se adicionó etanol al medio; indicando que el etanol adicionado durante la fermentación es menos tóxico para la levadura que el producido naturalmente.

## I N D I C E

	pag.
I. INTRODUCCION .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
III. HIPOTESIS .....	25
IV. OBJETIVOS .....	25
V. MATERIALES Y METODOS .....	26
VI. RESULTADOS .....	34
VII. DISCUSION .....	42
VIII. CONCLUSIONES .....	51
IX. FIGURAS .....	52
X. TABLAS .....	87
XI. ANEXO .....	109
XII. BIBLIOGRAFIA .....	110

# I. INTRODUCCION

## I INTRODUCCION

La biotecnología considerada como la aplicación de organismos, sistemas o procesos biotecnológicos para la producción de bienes y servicios, es una área que en los últimos años ha causado un impacto impresionante en los medios científico, tecnológico y social de todo el orbe.

Las perspectivas económicas y el potencial de producción que se puede esperar del desarrollo de las tecnologías biológicas, abre un horizonte nuevo de alternativas para aprovechar cabalmente, algunos de los recursos naturales con que cuenta un país. La aplicación de la biotecnología con propósitos energéticos tiene nuevas y mejores perspectivas dentro de las áreas, tanto alimenticia, farmacéutica, agrícola, minera y de alcohol entre otras.

Los energéticos se han convertido últimamente sin duda en productos de gran interés a nivel mundial; no solo por que representan un gasto importante en cualquier presupuesto nacional, si no porque han establecido una mayor diferencia entre los países que los tienen y los que deben adquirirlos.

Como las reservas mundiales de petróleo son consumidas, nuevas fuentes de energía son encontradas para suplementar nuestras necesidades. La biotecnología ha contribuido en la búsqueda de fuentes alternativas de energía, sobre todo cuando se trata de utilizar fuentes renovables o no renovables cuyo costo es muy alto.

Una posible fuente alternativa 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 producción de etanol es uno de los logros más importantes de la biotecnología actual, y su demanda es superior a las posibilidades de suministro, por lo que resulta, de gran importancia incrementar los niveles de producción a fin de satisfacer dicha demanda.

## **II. ANTECEDENTES**

## II ANTECEDENTES

El alcohol es conocido por el hombre desde hace muchos siglos y tuvo su origen a través de la fermentación natural de los azúcares para la producción de licores y bebidas. No solo es el producto químico, orgánico y sintético más antiguo si no que es también uno de los más importantes para el hombre (Sturion, C., 1988).

El etanol, con los adelantos de la química orgánica, en la segunda mitad del siglo XIX, ha tenido diversas aplicaciones, empleándose específicamente dentro de los campos de la producción de productos químicos, solventes, bebidas alcohólicas y carburantes. También se considera que el etanol es un combustible adecuado para el funcionamiento de vehículos automotores, sustituyendo hasta en un 20% la gasolina. Los usos del alcohol están en relación directa a las condiciones de desarrollo del país consumidor.

La producción de alcohol ha evolucionado en los últimos años y la viabilidad económica está influenciada por diversos factores específicos de cada país. En muchos casos se considera que éstos factores determinantes pueden ser tanto el valor unitario de la materia prima, su disponibilidad actual o futura, los usos a los que estará destinado y sus posibilidades de exportación.

Dentro del total de la producción mundial del etanol reportada para 1990, con aproximadamente 21,443 millones de litros, de los cuales el mayor índice de producción lo obtuvo América Latina con 14,050 millones de litros (Noa, S., 1991; Sturión, C., 1988).

Actualmente la producción de alcohol, no satisface ni el consumo actual ni el prospectivo, por lo que existe un mercado potencial que permitirá asimilar mayores volúmenes de producción (Blanco G. y Herryman M., 1987).

La biotecnología hoy en día específicamente dentro de la industria del alcohol ha desarrollado procesos novedosos y está optimizando los ya existentes en materia de fermentación, haciendo que logren aumentar su productividad, eficiencia y rentabilidad, propiciando así a esta industria una de los mejores opciones de desarrollo, al tiempo que forma parte integral del medio ambiente y de muchas actividades necesarias para la vida del hombre (Concheiro, A., 1985).

## 2.1 ESQUEMA GENERAL DE FABRICACION DE ETANOL

El sistema de fermentación general empleado en las industrias productoras de alcohol, es el sistema clásico "batch" o por lote, el cual se muestra en la figura 1.

El proceso se inicia con un tratamiento preliminar o preparación del mosto, que consiste primeramente en ajustar a la concentración de azúcar deseada la materia prima a utilizar por adición de agua, se regula a una temperatura determinada, y se ajusta al pH requerido por adición de ácidos y se añaden también sustancias nutritivas.

Posteriormente el mosto se mezcla con una levadura iniciadora (aislada de un cultivo puro), en el tanque de fermentación, por lo regular éstos tanques son cubiertos.

Realizada la mezcla con la levadura, la fermentación comienza con desprendimiento de grandes cantidades de  $\text{CO}_2$ , y en un lapso de 50 horas o menos, la fermentación suele estar terminada.

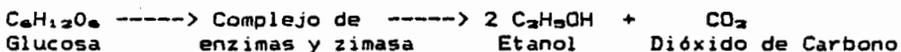
Por último el mosto fermentado se destila para separar el alcohol y otros componentes volátiles (Presscot y Dunn, 1976).

## 2.2 MECANISMO DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

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 catalizador (Pellón, J., 1986).

En la figura 2 se encuentra representado el proceso general de la fermentación alcohólica, donde las levaduras en condiciones anaerobias convierten azúcares a etanol principalmente por la vía metabólica denominada Embden-Meyerhof-Parnás (Lehninger, A.L., 1985).

La reacción neta global de éste proceso, en el cual por cada molécula de glucosa fermentada, se transforma en dos moléculas de etanol y dos de CO<sub>2</sub>, se representa en la siguiente ecuación:



Teóricamente por cada gramo de glucosa se puede obtener 0.51g de alcohol.

El rendimiento que se da en la práctica, comúnmente se encuentra entre el 90 y 95 % del teórico; el otro porcentaje se requiere para el crecimiento celular y formación de subproductos.

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

## 2.3 FACTORES IMPORTANTES EN LA FABRICACION DE ETANOL

### 1. Materias Primas.

El alcohol etílico puede obtenerse de cualquier azúcar fermentescible por acción de las levaduras en condiciones favorables.

Las materias primas de interés para la producción de alcohol se pueden clasificar en tres tipos principales:

- a) Materias primas azucaradas que contienen una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa, como el jugo de caña, las mieles y las melazas.
- b) Materias primas celulósicas, como el bagazo, maderas, residuos agrícolas y residuos de la fabricación de pulpa para papel.
- c) Materias primas feculentas, ricas en almidón que comprende los cereales como el maíz, malta, cebada, avena, centeno, trigo, sorgo y otros, además de la papa y la yuca.

Dentro de las materias primas azucaradas, la fermentación se hace directamente y requieren de poco o ningún tratamiento preliminar, a parte de la dilución con agua, obteniendo así una ventaja sobre las materias primas celulósicas y feculentas, ya que éstas tiene que ser hidrolizadas a azúcar fermentable antes de que actúen sobre ellas las levaduras.

La selección del tipo de materia prima a utilizar, va a depender del bajo precio, de un rendimiento elevado, la facilidad de manipulación, la posibilidad de obtener un suministro continuo durante todo el año, la proximidad del mercado y de su pureza (Presscot y Dunn, 1976; Kirk-Othmer, 1981; Sturion, C., 1988).

Las melazas y el jugo de caña son de las materias primas más comúnmente empleadas para la fermentación a etanol por ser disponibles y económicas (Kar, L. y Viswanathan, L., 1985).

### 2. Concentración óptima de azúcar.

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

Las concentraciones de azúcar más adecuadas para una buena fermentación son del 10 al 18 % (w/v).

El uso de concentraciones demasiado altas, actúan desfavorablemente sobre la levadura ya que el alcohol producido, puede inhibir su acción, de manera que se prolonga el tiempo de fermentación y puede no transformarse parte del azúcar.

En estudios realizados por Jones, R. y Greenfield, P. (1981), con concentraciones arriba del 14 % de azúcar se encontró que la velocidad de fermentación empieza a declinar.

Igualmente en una cepa de levadura panadera (deficiente en respiración) fue reportada que la inhibición de sustrato ocurre en concentraciones arriba del 22 %.

Realmente la concentración de azúcar depende de la cepa utilizada.

Es importante además, que las vinazas no contengan grandes cantidades de azúcar residual, ya que aparte de bajar rendimientos y causar pérdidas económicas, aumenta el contenido de materia orgánica en éstas y por consiguiente la contaminación al ser descargadas al medio ambiente.

Por otro lado utilizar concentraciones demasiado bajas tampoco resulta económico, ya que origina una pérdida de espacio de fermentación y un aumento en los gastos de obtención de la misma cantidad de alcohol en la destilación posterior (Presscot y Dunn, 1976).

### 3. pH Optimo.

El pH óptimo proporciona las condiciones favorables para el crecimiento y desarrollo de la levadura funcionando también como un mecanismo de control sobre el crecimiento bacteriano.

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

Existen neutralizantes que reducen el exceso de acidez o alcalinidad ayudando 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 también 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 (Kirk-Othmer, 1981; Presscot y Dunn, 1976).

Las levaduras pueden crecer a un pH de 3 a 7, con valores óptimos alrededor de un pH de 5 (Pellón, J., 1986).

Específicamente para cepas de S. cerevisiae se ha reportado un pH de 2.4 a 8.6 con un óptimo de crecimiento de 4.5, su pH interno es independiente del externo y va en un rango de 3 a 7 (Rose, A. y Harrison, J., 1980).

#### 4. Temperatura.

La temperatura inicial depende en gran parte de factores análogos a los que controlan el pH.

La mayoría de los microorganismos puede tolerar intervalos de temperatura amplios, existiendo los óptimos tanto para su crecimiento como para la acción enzimática.

Para la levadura *S. cerevisiae* se ha reportado una temperatura óptima para su propagación de 30°C y para su fermentación de 35°C (Presscot y Dunn, 1976).

Estudios realizados por Walsh, R. y Martin, P. (1977) sobre de la influencia de la temperatura en la fisiología de la levadura, encontraron que es claro observar que tanto la temperatura óptima como la máxima tolerante para el crecimiento y fermentación son fuertemente dependientes de la cepa a utilizar.

En cepas mesofílicas de *Saccharomyces* para rendimientos óptimos están en un rango de 28° a 35°C, siendo los 40°C la temperatura máxima. Para levaduras termofílicas la temperatura óptima y máxima para crecimiento son alrededor de los 40° y 50°C respectivamente (Travassos y Cury, 1966; Chye y Meng, 1975).

El empleo de levaduras termofílicas en fermentaciones industriales en las regiones tropicales y subtropicales, mejoraría la producción de alcohol, ya que durante la fermentación, la temperatura aumenta y por arriba de los 40°C el alcohol se evapora ocasionando bajos rendimientos (Kar, R. y Viswanathan, L., 1985).

#### 5. Adición de nutrientes.

Aunque las materias primas empleadas en los procesos de fermentación por lo regular cuentan con suficientes sustancias nutritivas, es indispensable un aporte adicional de nutrientes principalmente para el crecimiento y desarrollo óptimo de la levadura, asegurando el incremento en su biomasa y el aporte energético necesario para el proceso, acelerando y mejorando la producción de alcohol.

Los suplementos más necesarios para la mayoría de las materias primas utilizadas son el Nitrógeno y Fósforo (Kirk-Othmer, 1986).

El nitrógeno es un importante constituyente de cualquier medio de crecimiento, se puede proporcionar en forma de sales de amonio, urea y aminoácidos. También el ión amonio es una de las principales fuentes de nitrógeno, que puede acelerar la velocidad de la glucólisis en levaduras (Saita, M. y Slaughter, J., 1984).

Ruiz, O.C. (1990) determinó la influencia del ión amonio en la velocidad de producción alcohol en mostos tequileros, comprobando que con la adición de nitrógeno (en forma de sulfato de amonio) como única fuente de nutriente en el medio, alcanzó un rendimiento y velocidades de producción mayores a las del medio testigo probado.

El fósforo es esencial para el crecimiento celular; por lo general se adiciona como fosfatos y su concentración controla la síntesis de lípidos y carbohidratos, y mantiene la integridad de la membrana (Jones, R.; Pamment, N. y Geenfield, P., 1981).

La adición de fosfato en el medio de fermentación, también ayuda a incrementar el crecimiento y la velocidad de producción de alcohol. El nivel óptimo de fosfato a adicionarse, requerirá determinarse experimentalmente, según la materia prima a utilizar (Jones, R. y Gadd G., 1990).

La adición de elementos traza como K, Mg, Ca, Zn, Fe, Ni, Mn, Co, y otros, así como las vitaminas, juegan un papel importante dentro los factores de crecimiento y son necesarios en la síntesis de enzimas.

El sodio y el potasio son importantes para los procesos de transporte a través de la membrana celular y también en la síntesis de proteínas (Pellón, J., 1986).

También se ha demostrado que diferentes compuestos mejoran el rendimiento de la fermentación alcohólica, en base a un aumento en la tolerancia al etanol de las levaduras, éstos son: ácidos grasos insaturados, esteroides, proteínas, aminoácidos, vitaminas e iones inorgánicos; algunos medios complejos tales como el jugo de alcachofa de Jerusalem ó suplementos como harina de soya y peptona.

Se ha observado al igual que aditivos como orizenina, albúmina, quitina y micelio de hongo, pueden actuar de manera similar (Nabais, R.; et al., 1988).

## 6. Inhibición del crecimiento bacteriano.

El crecimiento de microorganismos contaminantes debe estar bajo control, de tal forma que no influyan en la productividad y ocasionen pérdidas en la producción (Sturion, C., 1988).

Las medidas aplicables para controlar el desarrollo bacteriano pueden ser: la esterilización, ajuste de pH, adición de antimicrobianos y una alta densidad de inóculo.

El fabricante por lo regular sustituye la esterilización por el empleo de un pH exactamente ajustado y de una gran cantidad de inculante, puesto que resulta costoso e impracticable esterilizar grandes cantidades de mosto (Presscot y Dunn, 1976).

También la adición de antisépticos al medio de cultivo es sencillo y seguro su manejo, ya que la fermentación se desarrolla en un medio completamente estéril, sin que para ello se haya efectuado la esterilización. Solamente se requiere una aclimatación previa de la levadura.

La levadura puede adaptarse (después de varias generaciones) a pequeñas cantidades de ácido sulfúrico, ácido láctico y compuestos de flúor, siendo los principales antisépticos utilizados. Así mismo la levadura adaptada puede entonces propagarse y fermentar sin ninguna interferencia (Palacios H., 1956; Kirk-Othmer, 1981).

#### 7. Elección de un microorganismo apropiado.

Es conocido que hacer una adecuada selección de cepas para llevar a cabo procesos biotecnológicos con una alta eficiencia, es muy importante. Su elección no solo se limita, a que pueda efectuar la reacción deseada, si no el que pueda efectuar el cambio bioquímico necesario en poco tiempo y que produzca un rendimiento máximo posible.

El microorganismo debe mantener también 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 adaptar o mutar cepas específicas con cualidades adecuadas (Kirk-Othmer, 1981).

Son preferibles determinados tipos de levaduras; principalmente aquellos que son capaces de producir y tolerar altas concentraciones de etanol y que poseen características estables y uniformes (Presscot y Dunn, 1976).

Una levadura resistente a concentraciones elevadas de etanol ofrece ventajas desde el punto de vista técnico y biológico, ya que es posible obtener un mosto fermentado con gran riqueza alcohólica, lo que mejora considerablemente la práctica de la instalación tanto de fermentación como de destilación.

A una buena levadura industrial no debe perjudicarla en su actividad fermentativa una concentración de 7 a 8 % (v/v) de alcohol (Palacios, H., 1956).

Los microorganismos más adecuados para la producción de etanol de azúcares son las levaduras del género Saccharomyces y Kluveromyces y las bacterias Zymomonas mobilis.

Las diferentes especies de levaduras, presentan propiedades importantes que las diferencian entre sí, tales son como la tolerancia a etanol, tolerancia a  $CO_2$ , como osmosensibilidad y habilidad para flocular.

En general la cepa de Saccharomyces cerevisiae es más tolerante a condiciones adversas al medio ambiente y por esta razón es generalmente preferida para la producción industrial de etanol (Jones, R.; Pamment, N. y Greenfield, P., 1981).

## 2.4 PROBLEMAS QUE AFECTAN A LA FABRICACION DE ALCOHOL

Actualmente la producción de alcohol en los Ingenios, así como muchas otras industrias productoras de bebidas alcohólicas por fermentación se enfrentan a diferentes problemas que afectan su producción, entre los que se pueden mencionar:

- a) Materia prima de baja calidad.
- b) Formulación inadecuada del medio de crecimiento y fermentación.
- c) Empleo de una cepa microbiana con bajos rendimientos y poca tolerancia al etanol.
- d) Esquema de fermentación inadecuado.
- e) Personal sin entrenamiento técnico y pocos conocimientos básicos del proceso que se maneja.
- f) Destilación tardía y con pérdidas por el uso de sistemas obsoletos.
- g) Almacenamiento inadecuado del producto.

Aunque las condiciones particulares para cada industria pueden ser diferentes, muchos de los problemas que generan pérdidas son comunes y por lo general es la combinación de más de un factor lo que en ocasiones dificulta su solución.

Por otro lado, se ha observado que la mayoría de las industrias productoras de alcohol tienen dificultades para obtener eficiencias de fermentación mayores al 70 %, cuando en la práctica, la eficiencia real puede llegar a ser del 90 %.

Para tener una idea de la magnitud del problema se puede mencionar que en un Ingenio donde produzca 2 millones de litros de alcohol (96°G.L.) al año y que tenga pérdidas de eficiencias de tan solo el 5 % puede estar perdiendo por ese concepto 100 000 litros\* de alcohol (96°G.L.) al año, lo cual representa un valor considerable en pesos (Rodríguez, B.I., 1990).

(\*) Basandose en eficiencias reales del 90 %, 25 días/mes y 10 meses/año de operación.

## 2.5 MICROORGANISMO

Como ya se ha mencionado, el microorganismo es una parte esencial dentro del proceso de fermentación, es por esto que se puede realizar una manipulación genética ó una regulación del metabolismo por la optimización del medio de cultivo, entre otras operaciones para mejorar la cepa y poder obtener el producto deseado (Crueger, W. y Crueger, A., 1984).

Tradicionalmente el etanol ha sido producido por fermentaciones, utilizando diferentes especies de levaduras como Saccharomyces cerevisiae y S. carlsbergensis (variedad uvarum), al igual que Kluyveromyces sp. y Candida utilis, entre otras; a partir de fuentes renovables ricas en azúcares como glucosa y sacarosa (Concheiro, A., 1985).

Las características necesarias que debe presentar el microorganismo a utilizar son:

- a) Altos rendimientos de productos por unidades de sustrato consumidos.
- b) Velocidades altas de fermentación
- c) Tolerancia a una elevada concentración de etanol
- d) Viabilidad a temperaturas elevadas
- e) Estabilidad bajo condiciones de fermentación adecuadas
- f) Tolerancia a pH ácido
- g) Capacidad de producir compuestos organolépticos.

De acuerdo a éstas características, se han realizado diferentes investigaciones con el fin de mejorar el rendimiento de alcohol mediante la selección del microorganismo adecuado.

Una de éstas fue hecha por Mancilha, I.M. et al (1984) al realizar un experimento con 64 cepas de levadura, las cuales se evaluaron por su producción de etanol en la fermentación de un medio que contenía un 10 % del total de azúcar de jugo de sorgo. La producción fue muy variada, desde 0.12 a 5 % (v/v). En general todas las cepas mostraron una buena eficiencia de conversión de azúcar; así los resultados indican que el jugo de sorgo puede ser utilizado para mejorar los rendimientos de alcohol.

Por otra parte Mansur, M. et al, (1986) probaron doce cepas de las especies de Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe y Pichia membranaefaciens, en cuanto a rendimiento, etanol-sustrato, biomasa-sustrato y productividad.

De las doce cepas estudiadas se comprobó mediante el estudio de los rendimientos alcanzados, como por los parámetros cinéticos obtenidos, que la cepa de mejor compartimiento fue Saccharomyces cerevisiae, ya que posee gran influencia en el aprovechamiento del sustrato cuando se opera con parámetros comúnmente utilizados y posibles de lograr en la práctica industrial ( $T=34^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=4.5$ ;  $S_0=130 \text{ g/L}$ ).

También Suresh, S., (1987) hizo un muestreo de siete levaduras de cerveza, identificando dos cepas de Saccharomyces cerevisiae y caracterizándolas como productoras lenta y rápida de etanol. Para ambas cepas se determinaron en el período de crecimiento exponencial los niveles de cuatro enzimas clave: invertasa, piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ADD), los niveles de éstas enzimas variaron durante la fermentación en las dos cepas. La cepa fermentadora rápida tuvo altos niveles de PDC y ADH, y bajos niveles de ADD, comparada con la cepa fermentadora lenta. Concluyendo que las razones por el incremento en las actividades específicas de las cuatro enzimas durante las primeras etapas de fermentación no son bien conocidas y necesitan de mayor estudio.

De igual manera en investigaciones realizadas por Pinal, Z. (1990) donde se compararon tres cepas de Saccharomyces cerevisiae de la colección de CIATEJ (BCGC-L-001, BCGC-L-002, BCGC-L-024) contra la cepa utilizada en el Ingenio de Tala, Jalisco en cuanto a rendimiento, velocidad y eficiencia de fermentación; los resultados mostraron que la cepa del Ingenio tuvo un rendimiento inferior ante cualquiera de las cepas de colección siendo la BCGC-L-024 la que presentó el más alto rendimiento, eficiencia y velocidad de fermentación, primeramente en una fermentación a nivel matraz, después en una fermentación de 15 litros comprobándose la superioridad de la cepa sobre la del Ingenio. Finalmente demostraron que a nivel industrial (94,000 litros) también se aumentó la eficiencia de fermentación de un 68.5 % ( $Y_p/s = 0.35$ ) con la cepa del Ingenio a un 89 % ( $Y_p/s = 0.45$ ) con la cepa BCGC-L-024.

## 2.6 INHIBICION POR ETANOL

Las levaduras son altamente susceptibles a la inhibición por etanol; muchas cepas permanecen viables en la presencia de concentraciones de etanol (3-4 % v/v) que son letales para otros microorganismos, también concentraciones de 1 a 2 % (v/v) son suficientes para retardar el crecimiento microbiano y a concentraciones del 10 % (v/v) de alcohol, la velocidad de crecimiento es casi cero (Thomas, D.S. et al, 1978).

El etanol en contacto con las levaduras en altas concentraciones (20 % v/v), es inhibitorio ocasionando principalmente:

- a) una disminución en el índice de crecimiento celular,
- b) una disminución en los niveles de viabilidad y
- c) una disminución en su habilidad fermentativa.

Es importante observar, que los cambios nutricionales y las condiciones físicas del medio pueden tener una influencia sobre los efectos causados por el etanol en las levaduras.

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 intrínseca de las cepas que se utilizan en la industria (Nabais, R. et al, 1988).

El sustrato también puede tener un papel muy importante en la inhibición por etanol, ya que se ha demostrado que dependiendo del tipo de fuente de carbono, su concentración y la solubilidad al etanol puede variar, presentándose en algunos casos un efecto sinérgico entre el sustrato y el alcohol.

Además Moulin, G. et al (1980) citaron los efectos de la inhibición en la fermentación alcohólica causados por el tipo de sustrato; concluyendo que la cinética de fermentación es muy compleja, y que la velocidad de fermentación cambia constantemente con distintos sustratos.

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

Kalmokoff, M. e Ingledew, W. (1985) en estudios realizados para evaluar la tolerancia al etanol, utilizando varias cepas de levadura (cervecería, saké, destilería y panificación), 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 observado 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 (20 % v/v) 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 levadura 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 11.5 a 13 % (v/v).

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

Así mismo se tiene que los valores encontrados en la concentración de etanol como inhibitorio, varían dependiendo de la fase de crecimiento, de cuando se adiciona en un tipo de levadura y entre cada una de ellas (Jones, R.P. et al, 1981).

En relación a esto se ha estudiado también los efectos de la acumulación intracelular de etanol durante la fermentación en Saccharomyces cerevisiae. En los resultados obtenidos hubo ciertas discrepancias, ya que unos afirman que cuando el etanol se adiciona al medio de cultivo, es menos tóxico para las células que el producido por ellas mismas.

Una de las explicaciones del efecto del etanol, es el aumento de los productos tóxicos, el agotamiento de nutrientes, y la acumulación intracelular del etanol durante la fermentación, teniendo una mayor inhibición en células que fermentan que en células que no fermentan, expuestas a la misma concentración extracelular de etanol adicionado (Nagodawithana, T. y Steinkraus, K., 1977).

Otro trabajo que confirma lo anterior, es propuesto por Novak, M. et al (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 al interior de las células es muy poca. 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, otros reportes sugieren que la concentración intracelular de etanol en las suspensiones fermentadas con células de levadura son menor o igual que la extracelular.

D'amore, T. et al (1988) de igual manera encontraron que la concentración intracelular de etanol en suspensiones con células de Saccharomyces 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 no afecta la fermentación.

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

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

## 2.7 PARAMETROS UTILIZADOS PARA DEFINIR LA TOLERANCIA AL ETANOL

La tolerancia de varias levaduras al etanol depende considerablemente de la cepa elegida, pero la producción de alcohol y el crecimiento celular son generalmente inducidos a parar por completo en grandes cantidades de etanol. Para muchas levaduras, los efectos de la inhibición de etanol son insignificantes a bajas concentraciones (menor de  $20 \text{ g l}^{-1}$ ), pero se incrementan rápidamente en altas concentraciones (Maiorella, B. et al, 1981).

El grado en el cual el etanol afecta la actividad fermentativa ha sido utilizado como índice de tolerancia al etanol.

Varios investigadores han definido la tolerancia como el índice de la actividad fermentativa entre las células con o 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 indicativos para toda una cinética (Kalmokoff, M. e Ingledew, W. 1985).

Dentro de las investigaciones realizadas para evaluar la tolerancia al etanol, se encuentran los trabajos de Nojivo y Duchi (1962) en Stewart, G. y Russell, I. (1985) donde encontraron que la tolerancia de las cepas de levadura caen dentro del rango de 20-30 % (v/v) de etanol.

Sin embargo fue difícil encontrar diferencias en la tolerancia de varias cepas de levadura, 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 éstas mismas al ser utilizadas en destilerías tienen una mayor tolerancia.

Por otro lado Rodríguez, G.D. (1990), evaluó la tolerancia al etanol de dos cepas de Saccharomyces cerevisiae, una de la colección de CIATEJ (BCGC-L-024) y la otra utilizada industrialmente en el Ingenio de Tala, Jalisco, tomando como base las repuestas de velocidad de crecimiento, viabilidad y velocidad de producción de alcohol.

Se adicionó etanol al medio en concentraciones del 5 al 14 % (v/v) para las pruebas de velocidad de crecimiento y viabilidad y del 4 al 21 % (v/v) para la producción de alcohol.

El efecto de inhibición se estableció comparandose contra un testigo al que no se le adicionó etanol.

La cepa BCGC-L-124 demostró tener mayor tolerancia que la cepa del Ingenio, teniendo un rango de tolerancia del 5 al 14 % para crecimiento y viabilidad; y del 14 al 21 % para la fermentación.

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

En otros trabajos, Jiménez, J. y Benitez, T. (1987) estudiaron la adaptación de las membranas de levadura al etanol; ellos encontraron que cierta levadura con una gran tolerancia al etanol (cepa de vino) después de crecerla en presencia de etanol se 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, fue 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 de 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 más sensitivas que las de la cepa de vino, lo cual indica que la capacidad de adaptación de las membranas celulares dependen de cada cepa. También otro de los factores que afectan la tolerancia al etanol en cepas de Saccharomyces cerevisiae es la temperatura. Esener, A. et al (1982) demostraron que ésta cepa tiende a ser muy sensible a los efectos de inhibición del etanol. Sin embargo éstas observaciones fueron esencialmente cualitativas.

## 2.8 BASES FISIOLÓGICAS DE LA TOLERANCIA AL ETANOL

En investigaciones realizadas sobre las bases fisiológicas de la tolerancia al etanol, se observó que existen dos áreas de la fisiología celular que parecen estar influenciadas por las altas concentraciones de etanol.

1. 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  $\text{CO}_2$ .

Dentro de algunos trabajos basados sobre el estudio de las enzimas glucolíticas encontramos a Nagodawithana, T. et al (1977) quienes reportaron que el etanol tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la hexoquinasa y consecuentemente sobre la función de la glucólisis.

Un estudio más extensivo ha sido reportado por Miller, et al (1982) en Stewart, G. y Russell, I. (1985), en donde las enzimas fructosa-1-6-difosfatoaldosa, gliceraldehído-p-deshidrogenasa y la piruvato-descarboxilasa fueron las más sensibles a la presencia del etanol; mientras que la triosa-fosfato-isomerasa y la etanol deshidrogenasa fueron menos sensibles.

En controversia con éstos resultados, Laure, F. et al (1984) estudiaron la relación entre la inhibición de la fermentación alcohólica y las actividades de dos enzimas claves, como la hexoquinasa (HK) y alcohol deshidrogenasa (ADH), en extractos de células libres de Saccharomyces cerevisiae; donde las levaduras fueron crecidas en un medio nutritivo completo con diferentes concentraciones de sacarosa, suplementado o no con etanol, y ac. grasos (éstas condiciones se encontraron en mosto de uva); dando por resultado que el decrecimiento de S. cerevisiae no es debido a una inhibición de las actividades de las enzimas claves, ya que permanecieron activas después de la fermentación.

Otra investigación realizada por Pascual, C. et al (1988) en relación a los efectos del etanol sobre el transporte de glucosa y enzimas glucolíticas claves, también fueron hechas con extractos de células libres de S. cerevisiae probando diferentes concentraciones de etanol y en un medio conteniendo glucosa.

Sus resultados fueron, que el etanol en concentraciones de 2M no causa ningún cambio en la velocidad de conducción de glucosa y tampoco un cambio sustancial en las actividades de las enzimas glucolíticas claves, mientras que la velocidad de fermentación se redujo a un 50 %.

En concentraciones de 3M y 4M, el etanol causó un decrecimiento considerable en las actividades de la hexoquinasa y la piruvatoquinasa. La enzima fosfofructoquinasa permaneció sin cambio en altas concentraciones de etanol.

Podemos concluir que los efectos del etanol, sobre las actividades de las enzimas claves de la glucólisis, dependen en gran parte de las concentraciones probadas de etanol, del medio de cultivo y en general de las condiciones de fermentación utilizadas.

También el etanol como producto final de la glucólisis en Saccharomyces cerevisiae es conocido que inhibe la fermentación y causa otros efectos desfavorables en células de levadura, como una disminución de las velocidades de crecimiento y viabilidad. La explicación de los efectos adversos se ha centrado en la interacción del etanol con los lípidos de la membrana plasmática.

Rose, A. y Beavan, M. (1982) reportaron que la composición de lípidos de la membrana plasmática influye en la viabilidad de células de Saccharomyces cerevisiae suspendidas en un medio con etanol.

Sin embargo el mecanismo molecular de la inhibición del etanol en la fermentación no es clara y también poco se ha reportado sobre su acción en las enzimas de la glucólisis (Pascual, C. et al, 1988).

Además cabe señalar que para un crecimiento y fermentación óptimas, las levaduras requieren de varios cationes inorgánicos que pueden actuar en la actividad enzimática participando en las reacciones catalíticas, como activadores o estabilizadores (Nabais, R. et al, 1988).

2. La segunda área en la interacción del etanol corresponde al grado y la manera en la cual 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, S. y Russell, I., 1985).

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

Por ejemplo, muchos investigadores afirman que la membrana y pared celular juegan un papel importante en la tolerancia al etanol por las levaduras, ya que éste, interfiere con la organización de la membrana, aumentando la permeabilidad a iones, metabolitos y aminoácidos inhibiendo el transporte de nutrientes. Así mismo, se ha observado un influjo de protones a través de la membrana celular de las levaduras en presencia de concentraciones significativas de etanol (Nabais, R. et al, 1988).

La membrana plasmática es el primer organelo sensitivo al hacer contacto con el etanol cuando las células son suspendidas en soluciones de etanol; puesto que el etanol es un compuesto anfipático, la composición de lípidos de la membrana plasmática puede tener un efecto importante sobre la tolerancia al etanol (Thomas, D. et al, 1978).

Como parte de un estudio, de la relación entre la composición de lípidos y la función de la membrana plasmática de una cepa de Saccharomyces cerevisiae; Rose, A. y Harrison, J. (1980) reportó que en las células de levadura, en las cuales la membrana plasmática fue 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 ác. linoléico fue inhibitorio en menor extensión que cuando los cultivos fueron suplementados con residuos de ác. oléico.

También Thomas, D. et al (1978) realizó un experimento con resultados parecidos, el probó poblaciones de células suspendidas anaeróbicamente en una suspensión amortiguadora con etanol (pH 4.5) donde las células permanecieron viables en grandes cantidades cuando sus membranas plasmáticas fueron enriquecidas con residuos linoléicos y no con residuos oléicos.

Durante el crecimiento en etanol, las cepas de Saccharomyces sintetizan lípidos, que al ser enriquecidos con residuos de ácidos grasos (C16:1) pueden compensar la disminución de residuos palmíticos.

La suplementación con ácidos grasos insaturados favorecen la tolerancia al etanol disminuyendo la pérdida de la membrana; teniendo por conclusión que la membrana celular es el principal factor para la inhibición del alcohol e implica que los residuos de ácidos grasos de la membrana sean importantes en la determinación de la resistencia al etanol (Jimenez, T. y Benitez, T., 1987).

En las cinéticas, la completa inhibición por el etanol en el crecimiento y fermentación depende de la contribución de un número de mecanismos inhibitorios fundamentales; como la interferencia del etanol en los procesos de la membrana plasmática, donde también se incluyen los procesos de transporte y el aumento exponencial del influjo de protones. Se ha encontrado que éstos sitios son los más importantes en la inhibición del etanol.

El etanol inducido se incrementa en la velocidad de influjo de protones bajando el gradiente de protones transmembrana, resultando posiblemente en un desacoplamiento electrogénico en el proceso de transporte y subsecuentemente en la inhibición del crecimiento (Leao, C. y van Uden, N., 1984).

Un trabajo al respecto, es de Kilian, S. et al (1989), donde incubó una suspensión de células de Saccharomyces cerevisiae y Kluyveromyces marxianus en presencia de diferentes concentraciones de etanol (entre 0 y 9 % v/v). Los valores del pH final estable alcanzados en esta suspensión, aumentaron con el incremento de la concentración de etanol indicando que el etanol aumenta la difusión pasiva de protones dentro de las células.

El etanol estimula la pérdida de aminoácidos y compuestos como nucleótidos, bases libres y nucleosidos (estos compuestos son absorbidos por UV a 260 nm), que son liberados por la permeabilización de la membrana durante la fermentación. Al término de ésta, la salida de material no es absorbida por las células y puede persistir en el producto final (se ha reportado que afecta la calidad de la cerveza y el vino).

La inducción del etanol en la salida de iones puede interferir con la acumulación de nutrientes, porque su transporte activo dentro de las células está acoplado al influjo de iones y basado sobre el gradiente transmembrana. Además la proporción y la naturaleza del material escapado varía de acuerdo también con la temperatura.

Salgueiro, S. et al (1988), reportaron que en efecto, existe una pérdida de material intracelular, encontrando una íntima relación entre las concentraciones de etanol y la cantidad de material perdido. Ellos proponen el análisis de la pérdida de compuestos inducida por el etanol, como un método para evaluar la tolerancia al etanol en levaduras.

## 2.9 INFLUENCIA DEL ION CALCIO

Las levaduras requieren de un cierto número de iones inorgánicos en concentraciones micro y milimolar para un crecimiento óptimo y un alto rendimiento en la fermentación.

Las concentraciones apropiadas de éstos elementos permiten acelerar el crecimiento y alcanzar un incremento en la biomasa, acelerando la producción de etanol.

Un desequilibrio en la nutrición iónica, se refleja en alteraciones complejas principalmente en la vía metabólica y en las características de crecimiento (morfología y tolerancia al medio).

Las deficiencias iónicas ocurren en algunas fuentes naturales de carbohidratos que son usados en la fermentación alcohólica. Por otra parte las altas concentraciones de sustrato afectan negativamente el crecimiento y la producción de etanol (Jones, R. y Greenfield, P., 1984; Nabais, R. et al 1988).

Además 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 y también pueden desempeñar un papel importante en la protección de los fosfolípidos y de las fosfomananas de la pared celular.

Uno de éstos cationes es el calcio, que ha demostrado tener un efecto benéfico en la fermentación alcohólica.

Entre los papeles más importantes del ion calcio en las levaduras, es su acción en el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana bajo condiciones adversas, por la protección de la membrana estructural de fosfolípidos y regulando las interacciones lípido-proteína.

Ha sido reportado que el etanol induce una pérdida de material celular en Saccharomyces cerevisiae, esto puede ser la base de la toxicidad del etanol. También la tolerancia al etanol de las levaduras puede estar relacionada, con la resistencia de la membrana plasmática para perder material celular, inducida por el etanol.

La asociación del calcio con las superficies de las levaduras ha sido utilizada para proteger la membrana de la acción de los antibióticos y el butanol; como lo demostraron Lewis et al (1967) Lee et al (1968) en Nabais, R. et al (1988).

Sugiriendo también que la presencia de calcio previene la pérdida de material celular en células de Saccharomyces carlsbergensis, suspendidas en soluciones de glucosa, conteniendo butanol y otros agentes despolarizantes de la membrana que incrementaban la pérdida celular.

El ion calcio puede incrementar la estabilidad de la membrana plasmática ya sea, por la reducción del influjo pasivo de protones inducido por el etanol o estabilizando la actividad de la ATPasa, que es inhibida también por el etanol.

Rosa, M.F. y Sá-Correia, I. (1992), estudiaron la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática, comparándola en diferentes cepas tolerantes al etanol (Kluyveromyces marxianus y Saccharomyces cerevisiae), crecidas en concentraciones altas de etanol. Dependiendo de la concentración, el etanol activó o inhibió esta enzima de la membrana; la actividad de la ATPasa fue aproximadamente de 20 nmol Pi min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> en células de ambas cepas de crecimiento, con la máxima concentración de etanol que toleró el crecimiento (en un rango de 5-7 % v/v para K.marxianus y 8-10% v/v para S.cerevisiae). Estableciendo una correlación entre la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática en células crecidas con etanol y su tolerancia usada como un criterio para los efectos del inhibitorios sobre el crecimiento.

Nabais, R. et al (1988) mencionan que la adición de calcio (como CaCl<sub>2</sub>), al medio de fermentación, indujo una alta producción de alcohol en cepas de Kluyveromices marxianus y Saccaromyces bayanus, disminuyendo la mortalidad inducida por el etanol e incrementando la tasa de específica de crecimiento.

En concentraciones letales de etanol, (0 al 16 %) la tasa de mortalidad fue: mínima para las células crecidas e incubadas en un medio con etanol y óptimas concentraciones de calcio (0.75 a 2.0 nM); máxima para las células crecidas e incubadas en un medio con etanol y sin adición de calcio y una media para las células crecidas en un medio sin etanol e incubadas en un medio suplementado con calcio.

El resultado positivo del calcio como suplemento en la fermentación alcohólica (0.75 mM) se explica por el incremento a la tolerancia al etanol. El efecto del calcio está íntimamente asociado con el efecto protector en el crecimiento, fermentación y viabilidad.

Algunas investigaciones enfatizan la importancia de la estabilidad de la membrana, en relación a una alta tolerancia.

La capacidad de organismos termófilos a controlar las propiedades físicas de la membrana citoplasmática, por el cambio de su composición de lípidos, son responsables en los cambios de temperatura.

Los iones especialmente cationes divalentes juegan un papel importante en la termoestabilidad. Se propuso que el calcio, acumulado dentro de la célula por transporte activo, es requerido para la termoestabilidad de proteínas celulares.

Mosley, G. et al (1976) sugiere que los cationes divalentes incrementan la estabilidad de la membrana por la formación de puentes de calcio entre los grupos aniónicos de los fosfolípidos de la membrana.

La presencia de calcio en concentraciones óptimas (2.5 a 10 mM) incrementó la termoestabilidad de Bacillus stearothermophilus estimulando el crecimiento a temperaturas más elevadas que las óptimas (70°C), pero no tuvo efecto en el crecimiento a temperaturas normales (40-70°C).

La protección se debe aparentemente al incremento de la estabilidad de la membrana; como lo demostró la adición de una suspensión celular en una solución amortiguadora a 60°C en la que se encontró que se evitó la pérdida de compuestos citoplasmáticos.

El etanol y las altas temperaturas interfieren con la organización de la membrana, aumentando la fluidez y la permeabilidad a los iones y metabolitos pequeños, e inhibiendo el transporte de nutrientes. Por lo tanto es posible que el incremento de la termoestabilidad por la presencia de cantidades óptimas de calcio puedan explicar, el aumento a la tolerancia al etanol por levaduras (Jurado, A. et al 1987; Mosley, G.A., 1976).

En otros trabajos realizados por Aranha, S.C. et al (1986) sobre la modulación del calcio en el crecimiento de Streptococcus mutans; donde el estado de producción del crecimiento fue doblado por la adición de 0.63  $\mu\text{M}$  de calcio. Subsecuentemente se incrementaron las concentraciones de calcio a 1.3  $\mu\text{M}$  y 2.5  $\mu\text{M}$  disminuyendo el crecimiento por abajo de los niveles donde no se adicionó calcio, sugiriendo que el calcio tiene una dosis dependiente, sobre los efectos inhibitorios y estimulatorios sobre este microorganismo. El calcio puede no ser esencial para el crecimiento vegetativo de muchos organismos procarióticos. Solamente pocas especies han demostrado un requerimiento de calcio.

En relación a los antecedentes mencionados, se evaluó la influencia del ion calcio en base a la tolerancia alcohólica de una cepa de Saccharomyces cerevisiae; dentro de los parámetros de velocidad de crecimiento, viabilidad y habilidad fermentativa.

**III. HIPOTESIS**

**IV. OBJETIVOS**

### III HIPOTESIS

El ion calcio aumentará la tolerancia al etanol de una cepa de Saccharomyces cerevisiae en función de una disminución en el porcentaje de inhibición provocado normalmente por el etanol en los parámetros de velocidad de crecimiento, viabilidad y habilidad fermentativa.

### IV OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la influencia del ion calcio (adicionado como  $\text{CaCl}_2$ ) en la tolerancia al etanol de una cepa de Saccharomyces cerevisiae probando diferentes concentraciones de éste en los medios de crecimiento y fermentación.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Estandarizar las técnicas analíticas.
- 2.- Estandarizar el inóculo.
- 3.- Realizar fermentaciones a nivel matraz probando diferentes concentraciones de calcio.
- 4.- Realizar un análisis estadístico y seleccionar la concentración de calcio con la que se alcanzó la menor inhibición.
- 5.- Realizar fermentaciones con elevadas concentraciones de azúcar a la concentración de calcio seleccionada.

**V. MATERIALES**

**Y**

**METODOS**

## V MATERIALES Y METODOS

### MICROORGANISMO.

El microorganismo utilizado fue Saccharomyces cerevisiae BCGC-L-024 productora de etanol, proporcionada por el Banco de Cepas y Genes del CIATEJ.

### MEDIOS.

#### MEDIO BASE

Extracto de levadura	(5 g/l)
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	(1 g/l)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(5 g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(5 g/l)
Glucosa	(150 g/l)
Agar bacteriológico	(3.5 %)
pH	4.5

#### MEDIO DE MOSTO TEQUILERO

Mosto Tequilero a 12° Bx y pH de 4.5	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(0.4 g/l)
Urea	(0.6 g/l)

### REACTIVOS.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

### EQUIPO.

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer 2380, Espectrofotómetro Spectronic 20D Milton Roy, Co., Balanza analítica Ohaus Ga 200, Balanza granataria Mettler PE 1600, Potenciómetro Beckman 50 pH Meter, Estufa de alta temperatura Felisa, Estufa de incubación Felisa, Estufa incubadora Presición, Parrilla eléctrica con agitador magnético Corning S tirrер/Hotplate, Autoclave Infra, Microscópio Compuesto One Ten American Optical, Cámara de Newbawer American Optical, Centrifuga Solvat, Campana de flujo laminar VECO, Orbital rotatorio New-Bruswik, Micropipetas Gilson, Microdestilador de vidrio, Agitador magnético Felisa.

## TECNICAS ANALITICAS

I. Técnica para determinación de etanol por el método de dicromato de potasio (Bohringer y Jakob, 1954).

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 de potasio 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.

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

Los reactivos utilizados son:

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

Procedimiento:

A 1 ml de solución problema se le adiciona 1 ml de fenol al 5 %, después se agregan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de la hidrólisis. Se deja enfriar durante 5 min a temperatura ambiente, se agita y posteriormente se pone a baño de agua fría durante 10 min. Finalmente se lee absorbancia a 490 nm.

III. Técnica para determinar azúcares reductores directos por el método de DNS (Miller, 1959).

Los reactivos utilizados son:

NaOH	10 g/l
3-5 Dinitrosalicílico	10 g/l
Tartrato de Na y K	200 g/l
Fenol	2 g/l
Metabisulfito de Na	0.5 g/l
Agua destilada	1000 ml

Procedimiento:

A 0.5 ml de muestra se adiciona 1.5 de solución DNS, se agitan los tubos de ensaye y se colocan en baño de agua a punto de ebullición durante 15 min; se dejan enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se agregan 8 ml de agua destilada y se agitan. Se lee absorbancia a 550 nm.

IV. Técnica de azul de metileno para conteo directo de células y para la determinación del porcentaje de viabilidad de levaduras.

Los reactivos utilizados son:

a) Azul de metileno	1 g/l
b) Citrato de sodio	50 g/l

Procedimiento:

En un matraz aforado de 50 ml poner 5 ml de muestra, 2.5 ml de azul de metileno y aforar con agua destilada. Tomar con una micropipeta de 20  $\mu$ l una muestra y con ayuda de la Cámara de Newbawer, contar la población total. Esta técnica nos permite conocer también la viabilidad ya que la pared celular de las levaduras muertas absorve el colorante y de esta forma es fácil identificar las células muertas de las vivas.

## M E T O D O L O G I A

### 5.1. Estandarización de técnicas analíticas.

#### 5.1.1. 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 fue 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.

#### 5.1.2. 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 fue 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.

#### 5.1.3. Curva de calibración para determinación de azúcares reductores directos.

Se realizó una curva de calibración para determinar azúcares reductores directos por el método del DNS, usando una solución patrón de glucosa a una concentración de 1.0 g/l.

El rango de concentración a probar fue de 0.1 a 1.0 g/l de glucosa para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de azúcares reductores directos presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

## 5.2. Estandarización del inóculo.

### 5.2.1 Crecimiento en tubos con agar inclinado.

Los medios de cultivo empleados para el mantenimiento y propagación de la cepa, fueron: Medio Base rico en nutrientes y medio de Mosto Tequilero enriquecido con sales; en ambos se ajustó el pH a 4.5 adicionándose también 3.5 % de agar bacteriológico.

A partir de un cultivo puro de la cepa Saccharomyces cerevisiae crecida en un tubo de conservación con cada uno de los medios, se sembraron por estría varios tubos con su duplicado y se incubaron a 30°C por un período de 48 horas de crecimiento.

Posteriormente se tomó muestra a diferentes tiempos para determinar población total y porcentaje de viabilidad, para lo cual se realizó una suspensión celular adicionando 5 ml de solución fisiológica estéril a cada tubo crecido.

La población celular se obtuvo por conteo directo al microscopio y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno; ambas con la ayuda de la cámara de Newbaver.

### 5.2.2 Crecimiento en medio líquido.

Para cada uno de los medios empleados se inoculó un matraz de 500 ml conteniendo 180 ml con 20 ml de la suspensión celular de la cepa utilizada, la cual se preparó añadiendo 5 ml de solución salina estéril a tubos crecidos en medio sólido al tiempo determinado como óptimo para la cepa.

Los matraces se incubaron a 30° C por un período de 12 hrs. con una agitación de 250 rpm. Se determinó población celular por conteo directo al microscopio en la cámara de Newbaver y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno.

### 5.3 FERMENTACIONES A NIVEL MATRAZ PROBANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO.

#### 5.3.1 Velocidad de crecimiento y porcentaje de viabilidad.

Los medios utilizados para el crecimiento celular fueron el Medio Base y el medio de Mosto Tequilero, los cuales se muestran en la tabla (2); con las diferentes concentraciones de calcio probadas que fueron de 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 200 mg/l que corresponden a .5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 5.0 mM respectivamente. Los medios 9 y 10 están compuestos por el medio de mosto tequilero y los restantes por el medio base.

A los medios del 2 al 8 y 10, se les adicionó el 8% de etanol después de cinco hrs. de crecimiento.

Los matraces se inocularon con 20 ml de inóculo estandarizado por propagaciones consecutivas a partir de una resuspensión celular en la forma anteriormente descrita. Se incubaron a 30° C, con agitación a 250 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos por un período de 12 horas a las cuales se les determinó población por conteo directo al microscopio en la cámara de Newbaver, y porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno.

Se calculó la velocidad de crecimiento a las diferentes concentraciones de calcio probadas por medio de un análisis de regresión a la parte lineal de cada curva de crecimiento, por medio de un programa de computación llamado "Numérico". Se calculó el porcentaje de viabilidad para cada medio probado.

Calculándose también el porcentaje de inhibición producido normalmente por el etanol adicionado; así como el porcentaje de inhibición alcanzado en cada uno de los medios con las distintas concentraciones de calcio. Para el medio base se hizo en relación a un matraz testigo al cual no se le adicionó calcio ni etanol, contra uno donde solo se adicionó etanol y no calcio.

En el medio de mosto tequilero fue en relación a un matraz testigo con la concentración de calcio presente en el medio sin la adición de etanol contra otro matraz al que se le adicionó etanol.

### 5.3.2 Habilidad fermentativa.

La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 180 ml de Medio Base con 150 g/l de glucosa y con diferentes concentraciones de calcio, las cuales fueron de 20 a 80 mg/l correspondiendo a un rango de .5 a 2.0 mM., respectivamente. Además de la adición del 8 % (v/v) de etanol, después de cinco horas de crecimiento (ver tabla 8).

Los experimentos se realizaron por duplicado utilizando dos medios testigo, uno al que no se le adicionó calcio ni etanol y otro al que no se le adicionó calcio pero sí etanol.

Los matraces fueron inoculados con 20 ml de inóculo estandarizado de la cepa, se incubaron a una temperatura de 35°C sin agitación.

Posteriormente se tomaron muestras a diferentes tiempos de fermentación por un período de 48 horas, a las cuales se les determinó producción de alcohol por la técnica de dicromato de potasio, y consumo de azúcares reductores directos por la técnica del DNS.

A los resultados obtenidos se les determinó la velocidad de producción de alcohol mediante un análisis de regresión a la región lineal de la curva de producción de alcohol, utilizando el programa de computación denominado "Numérico".

Así mismo se calculó el rendimiento de la fermentación en base a la producción de alcohol y al consumo de azúcares (Yp/s) para las diferentes concentraciones probadas.

El porcentaje de inhibición debida a las diferentes concentraciones de calcio adicionadas se calculó con respecto a un testigo al cual no se le adicionó calcio pero sí etanol.

## 5.4 ANALISIS ESTADISTICO

Se realizaron análisis de varianza de una sola vía utilizando el paquete estadístico de computadora "STATGRAFICS" para determinar si existía una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento, porcentaje de viabilidad, velocidad de producción de alcohol y rendimiento (Yp/s), así como el porcentaje de inhibición de éstas respuestas debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

En base a los resultados obtenidos de éstos análisis estadísticos se determinó la concentración de calcio óptima, con la cual se logró una disminución en el porcentaje de inhibición en base al crecimiento, viabilidad, habilidad fermentativa y rendimiento (Yp/s).

### 5.5 FERMENTACIONES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZUCAR A LA CONCENTRACION DE CALCIO SELECCIONADA

Para realizar la fermentación se prepararon por duplicado, matraces de 500 ml conteniendo 180 ml de medio base, a los cuales se les adicionó la concentración de calcio seleccionada probando diferentes concentraciones de azúcar: 150 y 200 g/l utilizando glucosa como fuente de carbono; teniendo un matraz como testigo para cada una de las concentraciones probadas, al que no se le adicionó calcio (ver tabla 14). A estos medios no se les adicionó etanol.

Los matraces se inocularon con 20 ml de inóculo estandarizado y se incubaron a 35° C sin agitación. Posteriormente se tomaron muestras a diferentes tiempos por un período de 48 horas a las cuales se les determinó producción de alcohol por la técnica de dicromato de potasio y consumo de azúcares reductores directos por la técnica del DNS.

En base a los resultados obtenidos se calculó la velocidad de producción de alcohol mediante una un análisis de regresión a la región lineal de la curva de producción de alcohol. Se calculó también el rendimiento de fermentación en base a la producción de alcohol y al consumo de azúcares (Yp/s), y la eficiencia de fermentación en base al rendimiento obtenido, comparado con el rendimiento teórico.

Se realizó un análisis de varianza de dos vías para determinar si existía una diferencia significativa en las repuestas de velocidad de producción de alcohol y rendimiento, debida a la concentración de calcio adicionada al medio, y/o a la concentración de glucosa así como una posible interacción de éstas.

## **VI. RESULTADOS**

## VI RESULTADOS

### 6.1 Estandarización de Técnicas Analíticas.

Las curvas de calibración utilizadas para la determinación de etanol, azúcares totales y azúcares reductores directos se muestran en las figuras 3, 4 y 5 respectivamente.

La ecuación obtenida para la curva de calibración de etanol es:  
 $Y = -4.500002 \text{ E-03} + 6.898215 \text{ E-02} (X)$  siendo aplicable a los rangos de absorbancia de 0 a 0.957 y que corresponden a una concentración de etanol de 2 a 14 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99992 para 8 puntos.

La ecuación obtenida para la curva de calibración de azúcares totales es:  $Y = -3.79545 \text{ E-03} + 7.147727 (X)$  siendo aplicable a los rangos de absorbancia de 0 a 0.713 y que corresponden a una concentración de 0.01 a 0.1 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99981 para 11 puntos.

La ecuación obtenida para la curva de calibración de azúcares reductores directos es:  $Y = -5.750001 \text{ E-02} + 1 (X)$  siendo aplicable a los rangos de absorbancia de 0.044 a 0.945 y que corresponden a una concentración de 0.1 a 1.0 g/l respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99993 para 10 puntos.

## 6.2 ESTANDARIZACION DEL INOCULO

### 6.2.1 Crecimiento en tubos con agar inclinado.

El crecimiento para el Medio Base se muestra en la figura 6, donde se puede apreciar la población y el porcentaje de viabilidad de la cepa utilizada (BCGC-L-024) durante un período de 48 horas. En ella se observa que no presenta una fase de adaptación, empezando su fase logarítmica en las primeras horas de crecimiento, finalizando a las 24 h con una población máxima de  $307.5 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad de 100 %. A partir de ésta hora la población comienza a disminuir.

Para el medio de Mosto Tequilero su crecimiento se muestra en la figura 7, donde tampoco se observa una fase de adaptación, alcanzando el final de su fase exponencial a las 24 horas, con una población máxima de  $395 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad del 100% disminuyendo el crecimiento posteriormente.

### 6.2.2 Crecimiento en medio líquido.

En la figura 8 se muestra la cinética de crecimiento para el Medio Base, observándose una fase de adaptación las primeras 2 horas de crecimiento, presentando una fase logarítmica con duración de 6 horas empezando a partir de las 2 y terminando a las 8 h, alcanzando una población máxima de  $107.5 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad de 94 %; a partir de la cual, la población comienza a disminuir presentándose una fase estacionaria de las 12 a las 24 h.

La cinética de crecimiento para el medio de Mosto Tequilero se observa en la figura 9, la cual no presenta una fase de adaptación, iniciando su crecimiento en las primeras horas y llegando al final de la fase exponencial a las 8 h, con una población máxima de  $220 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad de 97 %; posteriormente la población comienza a estabilizarse a partir de las 12 a las 24 h de su crecimiento.

## 6.3 FERMENTACIONES A NIVEL MATRAZ PROBADNO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO

### 6.3.1 Velocidad de crecimiento y porcentaje de viabilidad.

La relación de medios utilizados para el crecimiento y porcentaje de viabilidad de la cepa utilizada, se muestra en la tabla 2 con las diferentes concentraciones de calcio probadas, para cada uno de los medios.

La cinética de crecimiento para el medio 1 se muestra en la figura 10, en la cual se puede observar que presenta una fase de adaptación de las 0 a las 2 horas de crecimiento, alcanzando el final de su fase exponencial a las 8 h con una población máxima de  $120 \times 10^6$  cel/ml; subsecuentemente disminuye gradualmente el crecimiento.

Para el medio 2, el cual se muestra en la figura 11 presenta también una fase de adaptación de las 0 a las 2 h, donde además se observa claramente una inhibición marcada después de las 5 h, momento en que le fué adicionado etanol al 8 %; alcanza a llegar a las 8 h de crecimiento con una población máxima de  $81.25 \times 10^6$  cel/ml, teniendo una fase estacionaria de las 8 a las 10 h, disminuyendo rápidamente después la población.

En las figuras de la 12 a la 17 que corresponden a los medios del 3 al 8 respectivamente, contienen Medio Base además de una concentración diferente de calcio y el 8 % de etanol para cada uno. En ellas se puede apreciar que todas presentan una fase de adaptación de las 0 a las 2 horas de crecimiento, y se observa en las gráficas una disminución en la población después de las 5 h con la adición de etanol.

En todas las cinéticas se alcanzó el final de su fase logarítmica a las 8 h de crecimiento, cada una con diferente población.

Para el medio 3 que corresponde a la figura 12 se obtuvo una población máxima de  $85 \times 10^6$  cel/ml presentando una fase estacionaria de las 9 a las 11 h de crecimiento, decayendo finalmente la población.

En la figura 13 se muestra el medio 4, en el cual su fase exponencial comienza a partir de las 2 h, presentando posteriormente una fase estacionaria de las 5 a las 8 h con una población máxima de  $86.25 \times 10^6$  cel/ml, la cual desciende consecutivamente hasta las 12 h de crecimiento.

La población máxima alcanzada para el medio 5 (figura 14) fue de  $85 \times 10^6$  cel/ml a las 8 h de crecimiento, subsecuentemente a partir de ésta hora se puede apreciar una disminución progresiva de la población hasta las 12 h.

Para el medio 6 que se muestra en la figura 15 su población máxima alcanzada a las 8 h de crecimiento fue de  $92.5 \times 10^6$  cel/ml presentando después un rápido decrecimiento a partir de ésta hora hasta las 12 h.

En el medio 7 (figura 16) el crecimiento fue más lento, aunque alcanza a llegar a las 8 h con una población máxima de  $90 \times 10^6$  cel/ml; presentando una fase estacionaria de las 9 a las 11 h y posteriormente comienza a disminuir la población.

En la figura 17 se muestra el crecimiento para el medio 8, obteniendo una población máxima de  $93 \times 10^6$  cel/ml igualmente a las 8 h, subsecuentemente éste medio presenta una fase de muerte más acelerada.

Los medios 9 y 10 que corresponden a los medios de Mosto Tequilero, se muestran en las figuras 18 y 19 respectivamente.

El medio 9, como se observa no presenta una fase de adaptación, la población máxima alcanzada la obtiene al final de su fase exponencial a las 8 horas de crecimiento con  $175 \times 10^6$  cel/ml; mostrándose posteriormente una fase estacionaria a partir de ésta hora hasta las 12 h.

En el medio 10 no presenta tampoco una fase de adaptación, en la población después de 5 horas de crecimiento se observa una inhibición drástica por la adición de etanol, aunque alcanza a llegar al máximo de población a las 8 horas con  $135 \times 10^6$  cel/ml; presentando una fase estacionaria de las 9 a las 10 h, bajando rápidamente después el crecimiento.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la velocidad de crecimiento (expresada  $\times 10^6$  cel/ml.h), viabilidad y porcentaje de inhibición para cada caso, de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

Dentro de los medios constituidos por Medio Base, podemos observar que el medio 4 (40 mg/l de Ca) presenta una mayor velocidad de crecimiento con  $17.09 \times 10^6$  cel/ml.h; seguido del medio 3 con 15.79 y el medio 1 con 15.15, además del medio 5 con 14.22.

La menor velocidad de crecimiento alcanzada la obtuvieron los medios 2 (sin Ca + etanol), 6, 7 y 8 con 10.17, 10.53, 9.88 y 10.11 ( $\times 10^6$  cel/ml.h) respectivamente.

En los medios que corresponden al medio de Mosto Tequilero, el medio 9 (sin etanol) alcanzó una velocidad de crecimiento de 25.44, mientras que en el medio 10 (con etanol) se obtuvo  $15.61 \times 10^6$  cel/ml.

En el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento se observa que el medio 2 (testigo) muestra una mayor inhibición, siendo de 32.87 % comparada con los medios: 3 con -4.22 %, 4 con -12.88, además de los medios 5 con 6.13 % y 6 con 30.49 %. Los medios 7, 8 y 10 con 34.78 %, 33.26 % y 38.66 respectivamente, obtuvieron todavía una inhibición más alta que en el medio 2. En comparación con éstos porcentajes, el medio 4 (con 40 mg/l) es el que mostró una inhibición más baja, que incluso fue negativa.

Los porcentajes de viabilidad obtenidos en los medios, constituidos por Medio Base, además de una determinada concentración de calcio, fueron mayores que el obtenido en el medio 2 (sin calcio + etanol); por lo tanto los porcentajes de inhibición para éstos medios son más bajos, incluyendo el del medio 10 (Mosto Tequilero).

### 6.3.2 Habilidad fermentativa.

La relación de medios utilizados en la fermentación para la habilidad fermentativa de la cepa utilizada se muestra en la tabla 8.

La cinética de fermentación para el medio 1 se muestra en la figura 22, donde se observa una producción lineal de alcohol por un periodo de 24 h conforme disminuyen los azúcares. A partir de ésta hora la fermentación comienza a estabilizarse, obteniendo un máximo de 52.86 g/l de alcohol con 3.9 g/l de glucosa residual a las 30 horas.

En las figuras 23, 24, 25, 26 y 27, se ilustran las cinéticas de fermentación para los medios 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente.

En todos los medios la producción de alcohol va en aumento conforme son consumidos los azúcares dentro de un período de 12 horas; estabilizándose posteriormente en todos los casos hasta las 48 h de fermentación, que fue el tiempo final del muestreo.

La máxima producción de alcohol alcanzada para éstos mismos medios (2,3,4,5,6) fue de 21.64, 22.70, 20.29, 19.84 y 21.22 g/l de etanol respectivamente.

En la tabla 9 se resumen los resultados obtenidos de la fermentación, en relación a la velocidad de producción de alcohol (expresada en g/l.h), rendimiento (Y p/s) y el porcentaje de inhibición para cada medio; de acuerdo a las concentraciones de calcio probadas.

Como se puede apreciar la velocidad de producción de alcohol es similar en todos los medios alcanzando la más alta el medio 4 (con 40 mg/l de calcio) con 2.9764 y la más baja el medio 2 (sin calcio + etanol) con 1.4928. Por lo tanto con respecto al porcentaje de inhibición, el medio 4 obtuvo el más bajo.

En relación a los rendimientos obtenidos en base a la cantidad de producto formado por sustrato consumido, podemos observar que los medios 1 y 2 (testigos) son los que presentan menor rendimiento, con 0.3442 y 0.3009 respectivamente; subsiguendo el medio 6 con 0.4028.

Los medios 3, 4 y 5 tienen valores similares con 0.4617, 0.4865 y 0.4629 para cada medio; obteniendo el mayor rendimiento con el medio 4.

De acuerdo al porcentaje de inhibición de éste, podemos señalar que es menor, incluso negativo para cualquier concentración de calcio probada en comparación con el medio 2, el cual alcanzó un 12.57 % de inhibición en el rendimiento (Yp/s).

#### 6.4 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en los análisis de varianza, para determinar si existe diferencia significativa tanto para la velocidad de crecimiento, como para su porcentaje de inhibición, se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente; donde se puede apreciar en ambos casos que la F calculada es mayor que la F de tablas.

En la figura 20 se encuentran graficados los valores promedios del porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de calcio; en la cual se observa que el menor alcanzado fue para el medio 4. Posteriormente se muestra que el aumento de la inhibición va en relación con la mayor concentración de calcio probada.

En las tablas 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos de los análisis de varianza para la viabilidad alcanzada con la cepa BCGC-L-024, así como el porcentaje de inhibición; observandose que la F calculada es mayor que la F de tablas para ambos casos.

En la figura 21 se grafican los resultados de los valores promedios de el porcentaje de inhibición de viabilidad, con respecto a las concentraciones de calcio probadas, donde se muestra que la menor inhibición fue para el medio con 40 mg/l de calcio (medio 4), observandose que apartir de ésta concentración la inhibición aumenta manteniendose muy similar posteriormente. También se encontró que sin adición de calcio (medio 2) la inhibición es mucho más alta, que en cualquiera de los medios que contienen calcio.

En las tablas 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos de los análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas, tanto en la velocidad de producción de alcohol, como en el porcentaje de inhibición de acuerdo a las concentraciones de calcio probadas en los medios de fermentación, donde se puede apreciar en ambas tablas que la F calculada es mayor que la F de tablas.

En la figura 28 se ilustran los valores promedios del porcentaje de inhibición de las velocidades de producción de alcohol, en relación a las concentraciones de calcio, donde el menor porcentaje se presentó en el medio 4 (con 40 mg/l de calcio).

Por otro lado los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento ( $Y_p/s$ ) y porcentaje de inhibición, se muestran en las tablas 12 y 13 respectivamente. En ellas se observa que la F calculada es mayor que la F de tablas.

Así mismo, en la figura 29 se grafican los valores promedios del porcentaje de inhibición del rendimiento en cuanto a las concentraciones de calcio en los medios, observándose al igual que en las gráficas anteriores que el medio 4 presenta el menor porcentaje de inhibición. Posteriormente aumenta en las concentraciones de 60 mg/l (medio 5) y 80 mg/l (medio 6); aunque éstos son menores en relación al medio sin adición de calcio (medio 2).

#### 6.5 FERMENTACIONES A NIVEL MATRAZ PROBANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZUCAR A LA CONCENTRACION DE CALCIO SELECCIONADA.

La relación de medios utilizados para la fermentación se muestra en la tabla 14. La cinética de fermentación para el medio 11 y 12 se muestra en las figuras 30 y 31 respectivamente, donde se observa que el alcohol aumenta conforme se consumen los azúcares por un período de 30 horas, con una producción de alcohol de 57.75 g/l para el medio 11 y 57.90 g/l para el medio 12. A partir de ésta hora la fermentación comienza a estabilizarse hasta las 48 h con un consumo total de azúcares, en los dos medios.

En las figuras 32 y 33 se presentan las cinéticas de fermentación para los medios 13 y 14 respectivamente, en las cuales se observa una producción continua de alcohol conforme son consumidos los azúcares en un tiempo de 48 horas de fermentación; obteniendo 75.41 g/l de etanol para el medio 13 y 72.04 g/l para el medio 14, con un consumo total de azúcares en ambos medios.

En la tabla 15 se resumen los resultados obtenidos en la fermentación en relación a la producción de alcohol, rendimiento (Yp/s) y eficiencia de acuerdo a las diferentes concentraciones de azúcar probadas con la concentración de calcio seleccionada.

La velocidad de producción de alcohol fue muy similar en todos los medios, aunque el medio 12 alcanzó la más alta con 2.4950 (g/l.h), a una concentración de 150 g/l de glucosa, así mismo éste medio también obtuvo por lo tanto un alto rendimiento que fue de 0.3745 y un 81 % de eficiencia, comparado con los demás valores que fueron muy parecidos entre sí.

El porcentaje de eficiencia que presentan los medios 12 y 14 es mayor en ambos casos con respecto a su medio testigo, obteniendo un 81 y 68 % respectivamente.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para saber si existe o no diferencia significativa en la velocidad de producción de alcohol, en cuanto a la concentración de calcio utilizada se muestra en la tabla 16, en la cual observamos que la F calculada es menor que la F de tablas.

En relación a la concentración de glucosa probada (tabla 17) la F calculada es levemente mayor que la F de tablas. Sin embargo en el análisis de varianza de la interacción de los factores utilizando tanto la concentración de calcio como la de glucosa, se observa que la F calculada es mayor que la F de tablas (tabla 18).

En la figura 34 se ilustra las velocidades de producción de alcohol en los medios utilizados, de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio y glucosa probadas, donde se puede señalar que el medio 12 fue el que presentó la más alta producción de alcohol.

Los resultados de los análisis de varianza obtenidos en el rendimiento, en base a éstas mismas concentraciones, se muestra en las tablas 19 y 20 respectivamente; donde se observa que la F calculada es menor que la F de tablas, en ambos casos. Así mismo en la tabla 21 se presentan los resultados del análisis de varianza para el rendimiento, utilizando las concentraciones tanto de calcio como de glucosa, para determinar si existen diferencias significativas o alguna interacción entre ellas; observándose igualmente que la F calculada es mucho menor que la F de tablas.

Los rendimientos obtenidos en los medios donde se probaron las concentraciones de calcio y las de glucosa se grafican en la figura 35; en la cual podemos observar que el medio 12 también alcanzó el más alto rendimiento.

## VII. DISCUSSION

## VII DISCUSION

### 7.1 ESTANDARIZACION DE TECNICAS ANALITICAS

Con los resultados obtenidos en cada una de las curvas de calibración para la determinación de azúcares reductores libres, azúcares totales y etanol, en donde los coeficientes de regresión fueron buenos presentando valores de 0.99993, 0.99981 y 0.99992 respectivamente; podemos concluir que sí existe una correlación entre la concentración y la absorbancia para tales determinaciones.

En la tabla 22 se muestran los coeficientes de regresión mínimos aceptables de acuerdo al número de puntos probados para poder considerar un buen ajuste del modelo lineal con un 95 y un 99 % de confianza. Por lo tanto la ecuación encontrada para cada uno de los casos es confiable para determinar la concentración a partir de una absorbancia dada, con un 99 % de confianza.

### 7.2 ESTANDARIZACION DE INOCULO

Se realizó éste objetivo con el propósito de conocer la cinética de crecimiento y el porcentaje de viabilidad para la cepa utilizada de Saccharomyces cerevisiae (BCGC-L-024), lo cual se refleja en el estado fisiológico del la levadura y a la vez determina el tiempo en que la célula se encuentra en condiciones adecuadas para ser inoculada.

#### 7.2.1 Crecimiento en medio sólido.

En la cinética de crecimiento del la cepa en Medio Base, se obtuvo el final de la fase logarítmica a las 24 h de crecimiento, con una población máxima de  $307.5 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad del 100%.

Para el medio de Mosto Tequilero, el máximo crecimiento se obtuvo también a las 24 h, con una población de  $395 \times 10^6$  cel/ml y un 100 % de viabilidad. A partir de esta hora la población comienza a disminuir; por lo que se decidió tomar las 24 h como un óptimo de crecimiento en los dos medios utilizados, ya que además de tener la máxima población a este tiempo, ésta se encuentra con un 100 % de viabilidad y fisiológicamente en óptimas condiciones.

### 7.2.2 Crecimiento en medio líquido.

En éste nivel de propagación los resultados obtenidos fueron muy similares en los dos medios, presentando un tiempo de crecimiento máximo a las 8 h.

Para el Medio Base su máxima población fué de  $107.5 \times 10^8$  cel/ml, con una viabilidad del 94 %. En cuanto al medio de Mosto Tequilero tuvo un población máxima de  $220 \times 10^8$  con 97 % de viabilidad. A partir de las 8 h de crecimiento la población comienza a disminuir estabilizandose de las 12 a las 24 h, para ambos medios. Por ésta razón se concluye que el tiempo más adecuado para el crecimiento de la levadura en medio líquido es de 8 h.

Los resultados obtenidos en el medio de Mosto Tequilero, tanto para crecimiento en medio sólido como en medio líquido, concuerdan con los obtenidos por Ruíz, O.C. en 1991, donde la máxima población se alcanzó a las mismas horas que se determinaron como adecuadas en este trabajo.

## 7.3 FERMENTACIONES A NIVEL MATRAZ PROBANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO

### 7.3.1 Velocidad de crecimiento y porcentaje de viabilidad.

De acuerdo a la tabla 2 donde se presenta la relación de medios utilizados en la fermentación para el crecimiento y porcentaje de viabilidad, se muestra que para los medios conteniendo Medio Base (del medio 1 al 8), se prepararon dos medios testigo, uno al que no se le adicionó calcio ni etanol como medio 1 y otro sólo con la adición de alcohol como medio 2; éste último se realizó con el fin de conocer que tanto por ciento se inhibe el crecimiento de la levadura con ese porcentaje de etanol adicionado, en relación con el medio 1.

Así mismo en los demás medios probados (del 3 al 8), aparte de el aditamento de calcio (como  $\text{CaCl}_2$ ) en diferentes concentraciones, también se les agregó el mismo porcentaje de etanol; incluyendo uno de los medios conteniendo Mosto Tequilero (medio 10), el cual se comparó con un medio testigo de mosto (medio 9) al que no se le añadió etanol.

Las concentraciones de 20 a 120 mg/l de calcio, probadas en Medio Base se utilizaron de acuerdo a la bibliografía consultada (Nabais y col., 1988; Jones, R.P. y Gadd, G.M., 1990); las cuales se añadieron al medio al inicio de la cinética de fermentación. Para el caso del Mosto Tequilero la concentración de calcio utilizada es propia del medio.

Según trabajos realizados por Kalmokof e Ingledew (1985), se seleccionó el tiempo de la adición de etanol al medio, en donde se observara un efecto de inhibición.

Ellos reportan que las fases de crecimiento media exponencial o estacionaria temprana, son los mejores tiempos para la adición de etanol.

En base a esto se analizó la curva de crecimiento para la cepa utilizada BCGC-L-024 y se decidió que después de las 5 h de crecimiento, que es aproximadamente la fase media exponencial, sería el tiempo de adición del porcentaje de etanol, seleccionando a la vez el 8% que es considerado tóxico para la levadura de acuerdo a los resultados de Rodríguez, G. D. (1990).

En la tabla 3 donde se presentan los resultados obtenidos de la fermentación, de acuerdo al crecimiento, viabilidad y el porcentaje de inhibición para cada caso, se puede observar que los medios que contienen las concentraciones de calcio en un rango de 20 a 80 mg/l, en relación a la velocidad de crecimiento presentaron valores mayores que los obtenidos en el medio 2 al cual no se le adicionó calcio pero sí etanol; sobresaliendo el medio 4 con 40 mg/l de calcio. Lo cual indica que tales concentraciones mejoran la velocidad de crecimiento, mostrando un efecto benéfico del ion calcio.

En cuanto a las velocidades de crecimiento alcanzadas en los medios de Mosto Tequilero cabe hacer notar que éstas son más altas que las obtenidas en los Medios Base, debido probablemente a la presencia de algún nutriente en éste que no se le adicionó al Medio Base.

Por arriba de éstas concentraciones (100 y 120 mg/l de calcio probadas en Medio Base), la velocidad de crecimiento es menor que en el medio 2; mostrando un efecto negativo.

Así mismo en el porcentaje de inhibición de ésta velocidad con las concentraciones de 20 a 80 mg/l de calcio se obtuvo por lo tanto la menor inhibición, siendo la más baja de todas la concentración de 40 mg/l; logrando un mejoramiento, reflejado por un aumento en la tolerancia al etanol.

En relación a la viabilidad obtenida en los medios que contenían Medio Base y una determinada concentración de calcio, presentaron mayor porcentaje comparados con el medio testigo 2; a la vez en el porcentaje de inhibición de la viabilidad, en éstos medios incluyendo el medio 10 (Mosto Tequilero más etanol) fué menor que en el el medio 2; presentado el medio 4 la mínima inhibición.

En vista de éstos resultados se puede concluir que, el ion calcio tiene una influencia positiva para la tolerancia alcohólica con respecto al crecimiento y viabilidad de la cepa BCGC-L-024, en un rango de 20 a 80 mg/l y la concentración de 40 mg/l de calcio (1.0 mM) es la más adecuada para mejorar tanto la velocidad de crecimiento, como la viabilidad de la cepa utilizada, logrando aumentar la tolerancia al etanol, ya que a ésta concentración se obtuvo el menor porcentaje de inhibición en ambos casos, el cual incluso fue negativo en la velocidad de crecimiento, significando que en realidad no hay inhibición, sino por el contrario ayuda a mejorarla.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Nabais y col. (1988), quienes definen un rango de 0.75 mM a 2.0mM (30 a 80mg/l) utilizando un medio sintético.

Ellos demostraron el efecto positivo del calcio (como  $\text{CaCl}_2$ ) en el medio de fermentación, en las cepas de Saccharomyces bayanus y Kluyveromyces marxianus, disminuyendo la mortalidad inducida por el etanol e incrementando la tasa específica de crecimiento, aumentando así la tolerancia al etanol.

De acuerdo con Jones R.P. y Greenfield P.F. (1984), los efectos positivos de éste ion se han localizado en la membrana plasmática manteniendo la permeabilidad de la barrera de la membrana bajo condiciones adversas, por la protección de la membrana estructural de los fosfolípidos y regulando las interacciones lípido-proteína.

Además se ha reportado que la presencia de calcio previene la pérdida de material celular, la cual es inducida por la inserción de el etanol en el interior hidrofóbico de la membrana plasmática, incrementando a la vez la polaridad de éstas regiones, lo que debilita tanto la barrera como las interacciones hidrofóbicas en el intercambio libre de moléculas polares y afectando la posición de las proteínas dentro de la membrana plasmática; la pérdida de la integridad de la membrana afecta por lo tanto, la habilidad de la célula para mantener un gradiente de concentración a través de la membrana y varios sistemas de transporte de solutos también se ven afectados (Nabais y col., 1988).

Las concentraciones óptimas de calcio en los medios de fermentación para el crecimiento de las levaduras en general, oscilan en un rango de 0.5 a 5 mM (20 a 200 mg/l); las cuales son reportadas por Jones, R. P. y Gadd, G. M. (1990).

Estas concentraciones concuerdan con los rangos probados en éste trabajo; tanto para el Medio Base, que fue de 20 a 120 mg/l de calcio adicionado, como para el medio de Mosto Tequilero con 200 mg/l de calcio, siendo propia del medio.

Específicamente para el crecimiento de la cepa de S. cerevisiae, el efecto benéfico del calcio de observó en la concentración de 40 mg/l (1mM); por arriba de 80 mg/l (2.0mM) se va inhibiendo el crecimiento conforme se aumenta la concentración de calcio.

De acuerdo a éstos mismos investigadores, las concentraciones de calcio excesivas, además de otros iones que dependen de cada especie utilizada, pueden ser tóxicos e inducir el escape de material que se absorben a la luz de UV (aminoácidos) y ocasionar rupturas de sitios específicos en la membrana plasmática; disminuyendo la tasa de crecimiento, y es probablemente por ésta razón por la que a concentraciones de calcio mayores de 80 mg/l (2.0 mM) la inhibición de la velocidad de crecimiento es incluso mayor que la que causa por sí solo el etanol adicionado al medio.

En las fermentaciones industriales, algunos de los sustratos utilizados como fuente de carbono por ejemplo las melazas de caña de azúcar, están gobernadas tanto por las limitaciones de iones metálicos, así como un exceso de especies iónicas particulares. Por lo tanto las altas concentraciones de sales de los sustratos afectan negativamente el crecimiento y la producción de alcohol.

En otros estudios realizados por Nabais y col. (1988), donde utilizaron 3 tipos de melazas de caña como sustrato, las cuales se diluyeron entre 21 y 22 °Bx y se suplementaron con calcio (0.75, 1.5, y 3mM como  $\text{CaCl}_2$ ) para la fermentación de S. bayanus y S. cerevisiae, bajo condiciones industriales.

No se observó ningún mejoramiento en la fermentación, si no por el contrario tuvo efectos negativos. Estos resultados no fueron sorprendentes, porque las melazas aportan una alta concentración de calcio por naturaleza.

En el caso del Mosto Tequilero, éste sustrato también presenta una alta concentración de calcio, la cual no es óptima para el crecimiento de la levadura utilizada; y por éste motivo que éste medio no se probó con adición de un rango de concentraciones diferentes de calcio, ya que para lograr esto hubiera sido necesario aplicar algún tratamiento para eliminar el exceso del calcio.

Se ha encontrado que la adición de EDTA, durante el crecimiento en medios de melazas, aumenta la producción de alcohol en la fermentación, debido probablemente a una quelación del exceso del calcio, el cual ocasiona en gran parte la disminución del Yp/s en las melazas; otro tipo de tratamientos es el ajuste del pH con ácido sulfúrico, calentamiento y centrifugación de las melazas.

Este tipo de tratamientos a nivel industrial no serían muy convenientes, ya que son costosos y complicados; además primeramente se tendría que evaluar si el aumento en el rendimiento (Yp/s) justifica su aplicación.

### 7.3.2 Habilidad fermentativa.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el crecimiento de la cepa utilizada, las concentraciones de 20 a 80 mg/l de calcio (0.50 a 2.0mM) fueron las más adecuadas, ya que se observó el efecto benéfico del ion; por lo que se determinó que para la habilidad fermentativa, en cuanto a la producción de alcohol y rendimiento solo se probaran estas concentraciones.

A los medios probados en esta etapa también se les adicionó el 8% de etanol, (el cual es considerado tóxico para la cepa BCGC-L-024 según los resultados de Rodríguez, G.D., 1990), al mismo tiempo de adición (5 h), utilizando además los 2 medios testigo.

Los resultados obtenidos en la fermentación en base a la producción de alcohol, rendimiento y porcentaje de inhibición para cada caso, se muestran en la tabla 9; donde se puede observar que la velocidad de producción de alcohol es similar en todos los casos, excepto para el medio testigo 2 (sin calcio + etanol), sobresaliendo el medio 4 con 40 mg/l de calcio (1mM) y obteniendo por lo tanto el menor porcentaje de inhibición, que incluso fue negativo; lo que quiere decir que no hay inhibición, si no un aumento en la velocidad de producción de alcohol.

En base al rendimiento los resultados fueron parecidos, ya que en todos los casos se observó un alto rendimiento, con la misma excepción para el medio 2, sobresaliendo igualmente el medio 4. El porcentaje de inhibición del rendimiento en todos los medios fue negativo; indicando que estas concentraciones probadas ayudan a mejorar la fermentación aumentando su tolerancia al etanol de la cepa BCGC-L-024.

Con estos resultados podemos corroborar el efecto positivo del ion calcio en esta etapa de fermentación tanto en la velocidad de producción de alcohol, así como en el rendimiento alcanzado.

#### 7.4 ANALISIS ESTADISTICO

Los análisis de varianza realizados pusieron de manifiesto, que realmente existe un diferencia significativa en las fermentaciones tanto para la velocidad de crecimiento y viabilidad, así como para la velocidad de producción de alcohol y rendimiento, además de los porcentajes de inhibición respectivos para cada análisis, debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

Las hipótesis nulas establecidas, fueron rechazadas en todos los casos, puesto que la F calculada resultó ser mayor que la F de tablas, lo que significa que sí existe una diferencia significativa.

En el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas, los cuales se muestran en la figura 20, podemos observar que la mínima inhibición se presentó a la concentración de 40 mg/l de calcio (1mM), aumentando con las concentraciones de 20, 60 y 80 mg/l de calcio respectivamente; las cuales fueron menores con respecto al medio testigo 2.

Las concentraciones 20 a 80 mg/l se seleccionaron como las más adecuadas para la fermentación, en relación a la habilidad fermentativa, ya que son las que obtuvieron el menor porcentaje de inhibición, indicando que ayudan a incrementar la tolerancia al etanol de la levadura utilizada.

En cuanto al porcentaje de inhibición de la viabilidad, todas las concentraciones utilizadas mostraron tener influencia en el mejoramiento en relación al medio testigo 2, al cual no se le adicionó calcio, solo etanol; aunque la concentración de 40 mg/l de calcio presentó el menor porcentaje de inhibición de viabilidad (figura 21).

En la figura 28 se observan los porcentajes de inhibición de la velocidad de producción de alcohol en las concentraciones de calcio seleccionadas para esta etapa de fermentación; presentando el valor mínimo de inhibición a la concentración de 40 mg/l de calcio. Los valores de las concentraciones de 20, 60 y 80 mg/l presentaron valores muy similares entre sí.

En cuanto al rendimiento el porcentaje de inhibición fue menor en todas las concentraciones probadas con respecto al medio 2 (testigo), sobresaliendo igualmente la concentración de 40 mg/l de calcio.

### 7.5 FERMENTACIONES A NIVEL MATRAZ PROBANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZUCAR A LA CONCENTRACION DE CALCIO SELECCIONADA.

Se decidió realizar estas fermentaciones ya que de acuerdo a la bibliografía consultada, ha existido una controversia en base al efecto que el etanol ocasiona en las células de levaduras, de si es más tóxico o no el adicionarlo al medio, que dejar producir naturalmente por la levadura.

Desafortunadamente, no se ha reconocido un método para medir la tolerancia al etanol para las cepas de levadura, y es por eso que existe una polémica en esta área de la investigación (Rose, 1982; Stewart y Russell, 1985).

El método clásico según Kalmokof e Ingledeu (1985), utilizado para evaluar los efectos del etanol, es de incorporarlo al medio en una fermentación controlada ó por lote, tanto para el crecimiento, como para su actividad fermentativa. Los primeros datos sobre la tolerancia al etanol, de S. cerevisiae fueron obtenidos de esta manera.

Por ejemplo Nagodawithana y Steinkraus (1976), afirman que cuando el etanol es adicionado a cultivos de S. cerevisiae, le es menos tóxico para las células que el producirlo por ellas mismas. De igual manera Novak y col., (1981), demostraron que el etanol producido durante la fermentación, es más inhibitorio que el adicionado al medio.

Una de las razones propuestas por éstos investigadores es el agotamiento de nutrientes, el aumento de productos tóxicos y la acumulación intracelular del etanol durante la fermentación.

En base a éstos datos, se realizaron los experimentos de la fermentación para la cepa BCGC-L-024, en cuanto a la habilidad fermentativa, con los parámetros de velocidad de producción de alcohol, rendimiento y eficiencia (ver tabla 14).

Además de la concentración de calcio adicionada, la cual se seleccionó de acuerdo a los resultados obtenidos en el crecimiento y en la fermentación que fue de 40 mg/l (1mM), se probaron también diferentes concentraciones de azúcar (150 y 200 g/l de glucosa).

A éstos medios no se les adicionó etanol, si no que se dejó producirlo naturalmente por la levadura, con el fin de obtener nuestros propios resultados, en cuanto a la controversia existente del efecto tóxico del etanol, y al mismo tiempo determinar si el efecto benéfico del calcio que se observó en los experimentos anteriores (cuando se adicionó etanol al medio), se da de igual manera al dejarlo producir naturalmente.

En la tabla 15 se resumen los resultados obtenidos en base a éstos experimentos, donde efectivamente comprobamos que la adición de etanol al medio de fermentación, es menos tóxico para la célula; esto se puede confirmar al comparar los resultados obtenidos en la habilidad fermentativa realizada anteriormente (tabla 9), en base a la velocidad de producción de alcohol y rendimiento ya que en el medio 4, (150 g/l de glucosa y 40 mg/l de calcio) se presentaron valores más altos que en el medio 12 que contenía las mismas concentraciones de calcio y glucosa.

El medio 12 en relación con su medio testigo (medio 11) obtuvo mayor velocidad de producción de alcohol, rendimiento y porcentaje de eficiencia. Por otra parte el medio 14 (200 g/l de glucosa y 40 mg/l de calcio) obtuvo mayor velocidad de producción de alcohol, rendimiento y % de eficiencia en relación a su medio testigo (medio 13), lo que significa nuevamente un efecto benéfico del calcio.

Si comparamos los dos medios donde se obtuvieron los valores mayores en ésta etapa de la fermentación, podemos darnos cuenta que el medio 12 presenta la más alta velocidad de producción, rendimiento y eficiencia.

De acuerdo a los análisis de varianza de dos vías realizados, para ver si existía alguna diferencia significativa en cuanto a la velocidad de producción de alcohol, rendimiento, debida a la concentración de calcio adicionada y/o a la concentración de glucosa, así como una posible interacción de éstas; obtuvimos que para la producción de alcohol utilizando solo la concentración de calcio (tabla 16), no existe diferencia significativa aceptando la hipótesis nula, ya que la F calculada fue menor que la F de tablas, y utilizando solo la concentración de glucosa, sí existe diferencia pero no significativa, porque la F calculada resultó ser levemente mayor que la F de tablas, rechazando por lo tanto la hipótesis nula.

En cambio cuando se analizó la interacción del las dos variables (calcio y glucosa) la F calculada fue mayor que la F de tablas, indicando que sí existe una diferencia significativa, en las respuestas debida a la interacción, rechazando por lo tanto la hipótesis nula (tabla 18); lo que significa que existe una influencia de la concentración de 40 mg/l (1mM) de calcio y la concentración de 150 g/l de glucosa en la velocidad de producción de alcohol.

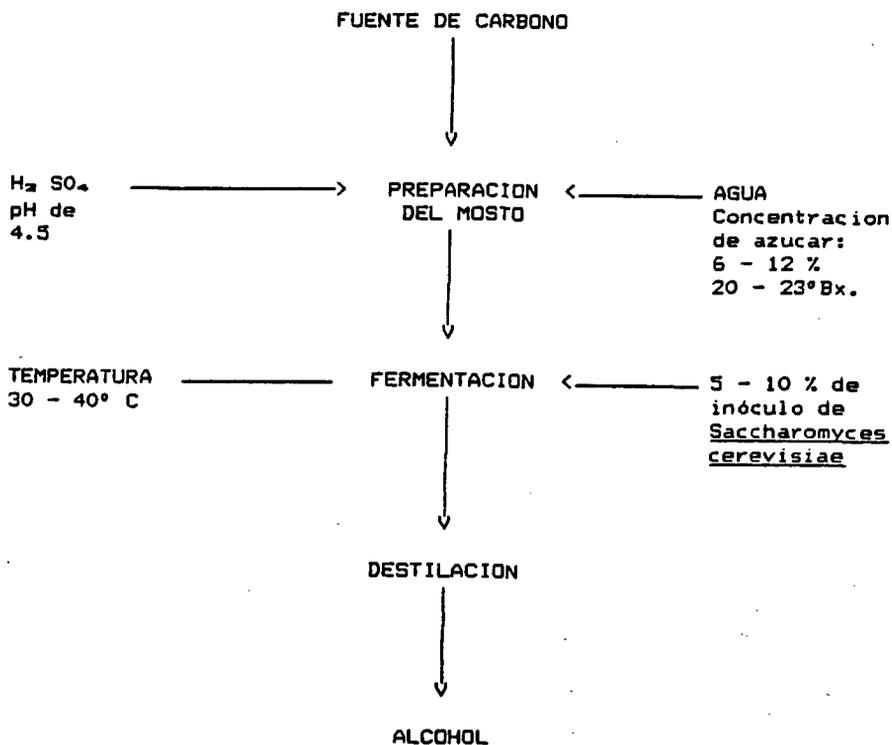
En los análisis de varianza para el rendimiento, al utilizar tanto las concentraciones de calcio y glucosa por separado (tablas 19 y 20 respectivamente), así como las dos respuestas juntas (tabla 21); observamos que en los tres tablas, la F calculada es menor que la F de tablas, no existiendo diferencia significativa, por lo que se aceptan las hipótesis nulas.

## VIII. CONCLUSIONES

## VIII CONCLUSIONES

1. Las ecuaciones utilizadas para determinar la concentración de Etanol, Azúcares Reductores Totales y Azúcares Reductores Directos a partir de una absorbancia dada fueron confiables con un 99 %.
2. El tiempo adecuado de crecimiento para la cepa Saccharomyces cerevisiae BCGC-L-024 fue de 24 horas para medio sólido y de 8 horas para medio líquido, tanto para el medio de Mosto Tequilero como para el Medio Base.
3. El calcio mostró tener una influencia positiva, tanto para el crecimiento como para la habilidad fermentativa de la cepa utilizada, en un rango de 20 a 80 mg/l (.5 a 2.0 mM).
4. La más alta velocidad de crecimiento, velocidad de producción de alcohol y rendimiento, se obtuvieron a una concentración de 40 mg/l (1mM), a la cual no se observó una inhibición en estas respuestas debido a la concentración de etanol adicionada, sino por el contrario ayudó a mejorar la fermentación aumentando así la tolerancia a éste de la cepa.
5. Los análisis de varianza pusieron de manifiesto que si existen diferencias significativas en las respuestas analizadas, debido a las concentraciones de calcio probadas.
6. En las fermentaciones donde se dejó producir naturalmente el etanol, la más alta velocidad de producción de alcohol, y el más alto rendimiento se obtuvo a una concentración de 150 g/l de glucosa con una concentración de 40 mg/l de calcio (medio 12); sin embargo estas fueron más bajas que los valores obtenidos en el medio 4 cuando se adicionó el etanol. Por esto se puede concluir que el etanol adicionado durante la fermentación es menos tóxico para las células de levadura, que el producido naturalmente.

## **IX. FIGURAS**



° Bx. Porcentaje de sólidos totales en un muestra.

FIGURA 1. Esquema General de la Fabricación de Alcohol.

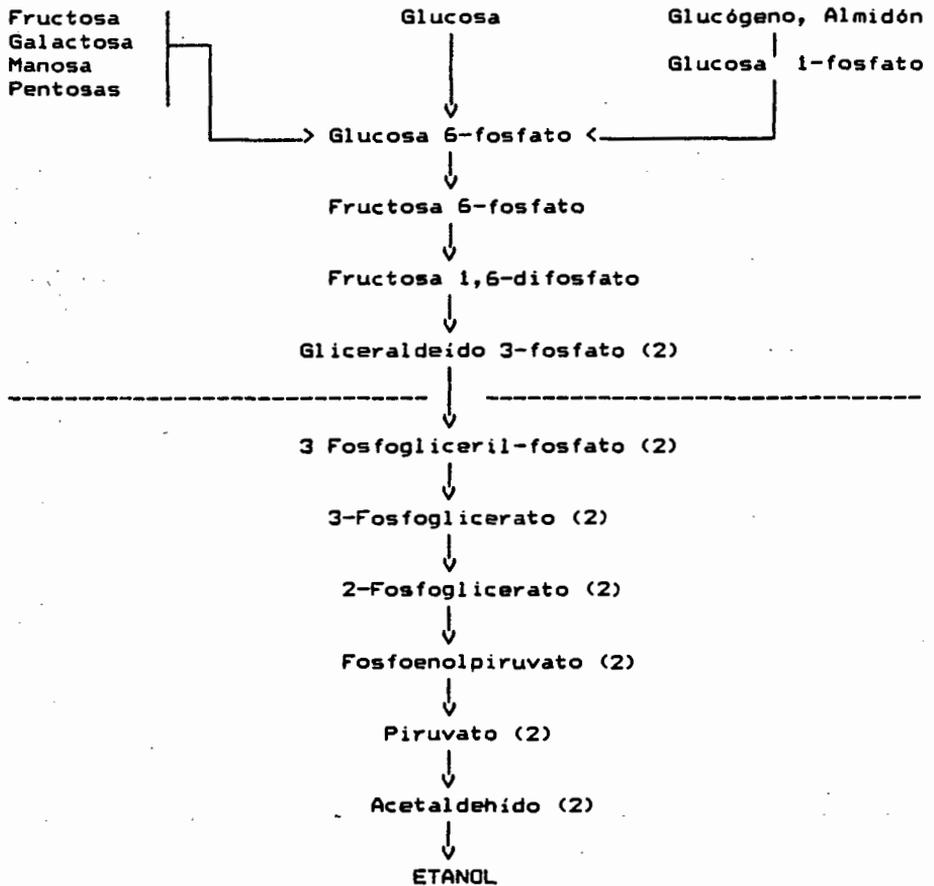


FIGURA 2. Proceso de Fermentación vía EMP.

FUENTE: Lehninger, 1985.

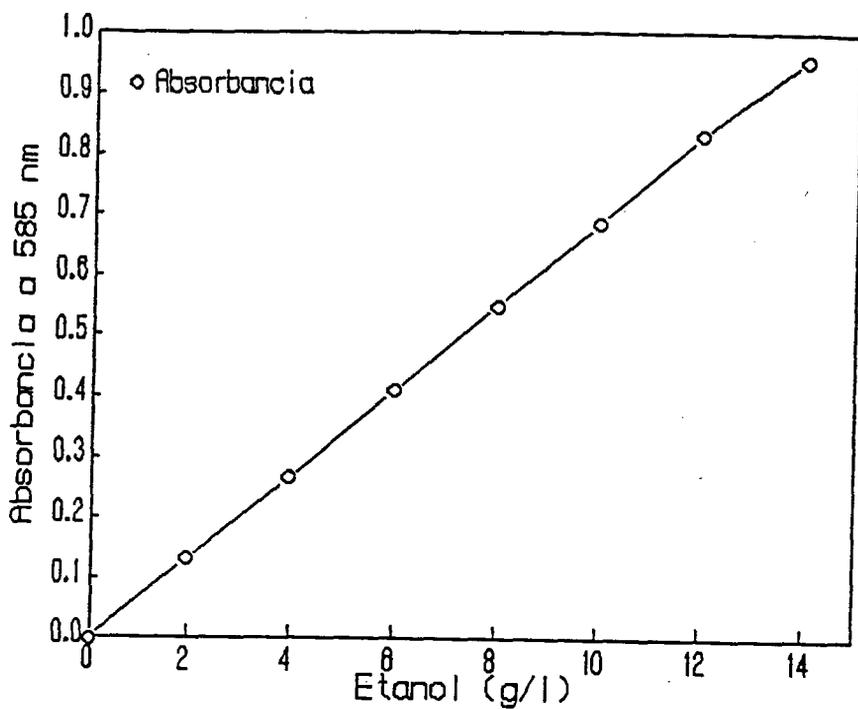


FIGURA 3. Curva de calibración para la determinación de etanol mediante la técnica de dicromato de potasio (Bohringer y Jakob, 1964).  
Ecuación:  $Y = -4.500002 \text{ E-}03 + 6.898215 \text{ E-}02 (X)$ .

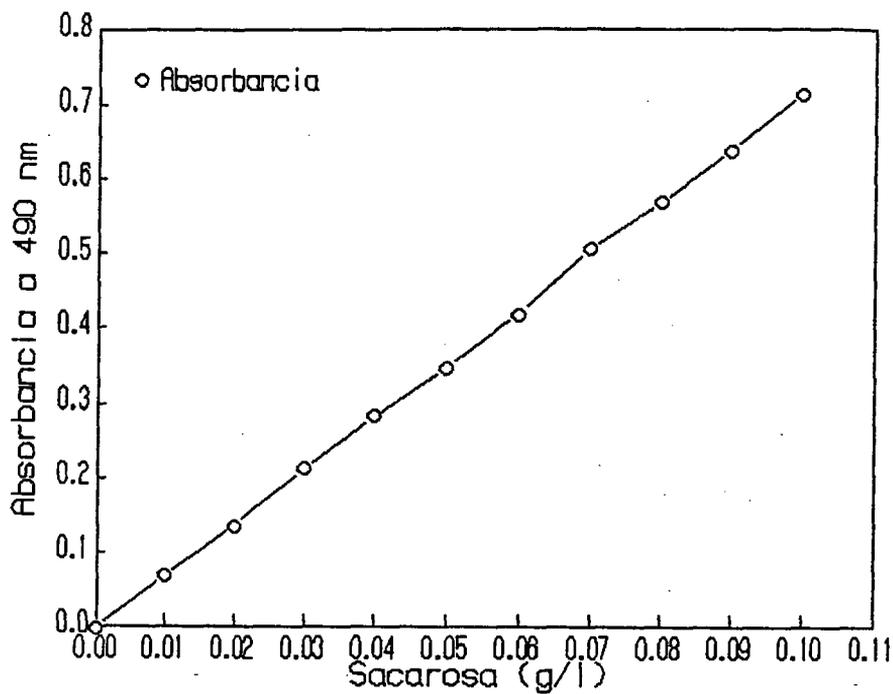


FIGURA 4. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

Ecuación:  $Y = -3.79545 \text{ E-}03 + 7.147727 (X)$ .

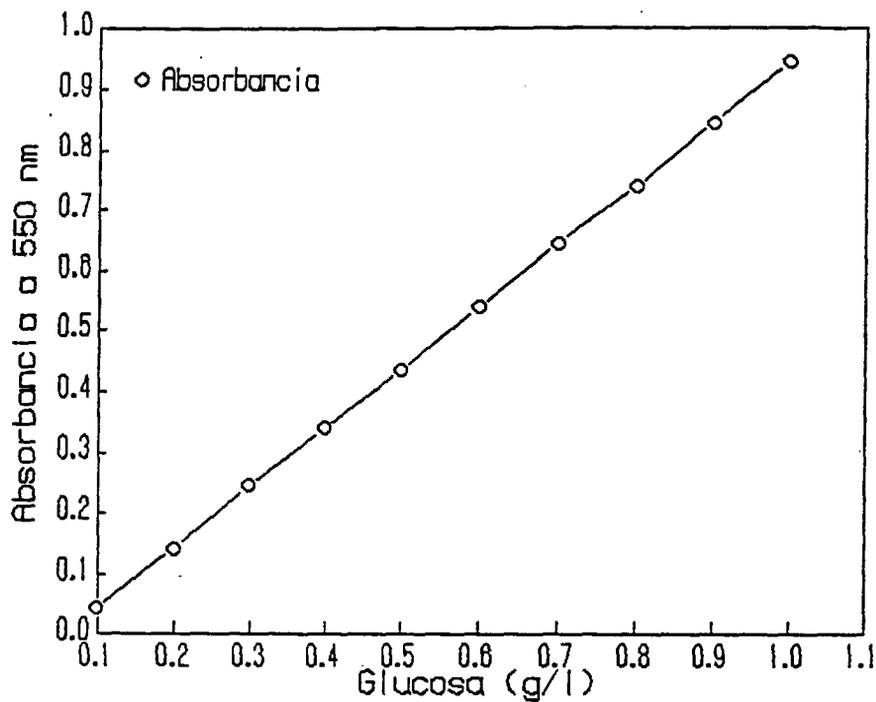


FIGURA 5. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores directos por el método del DNS (miller, 1959).

Ecuación:  $Y = -5.750001 \text{ E-}02 + 1 (X)$ .

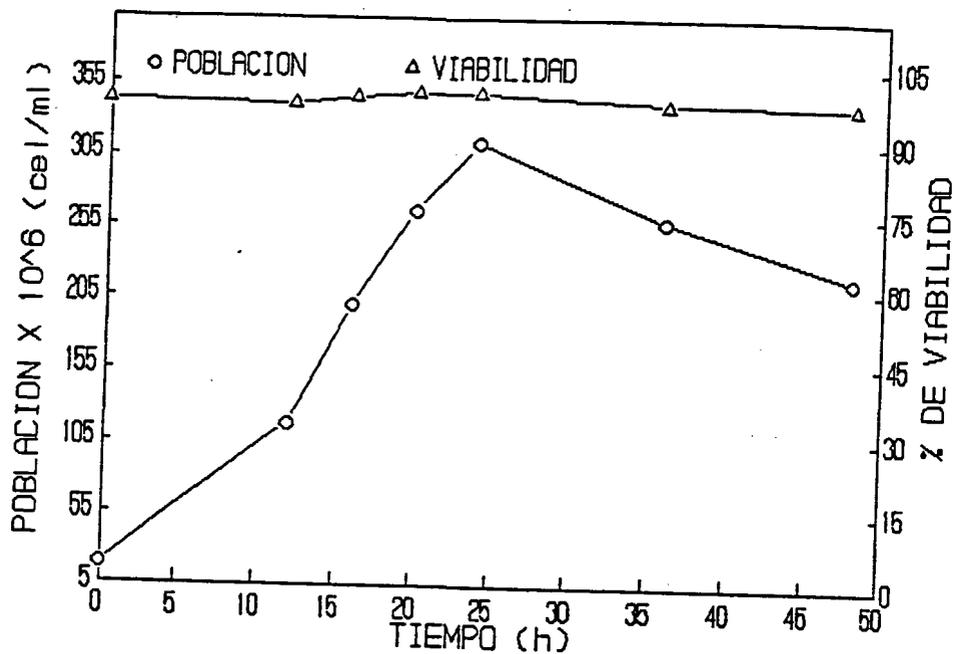


FIGURA 6. Estandarización del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en Medio Base sólido.

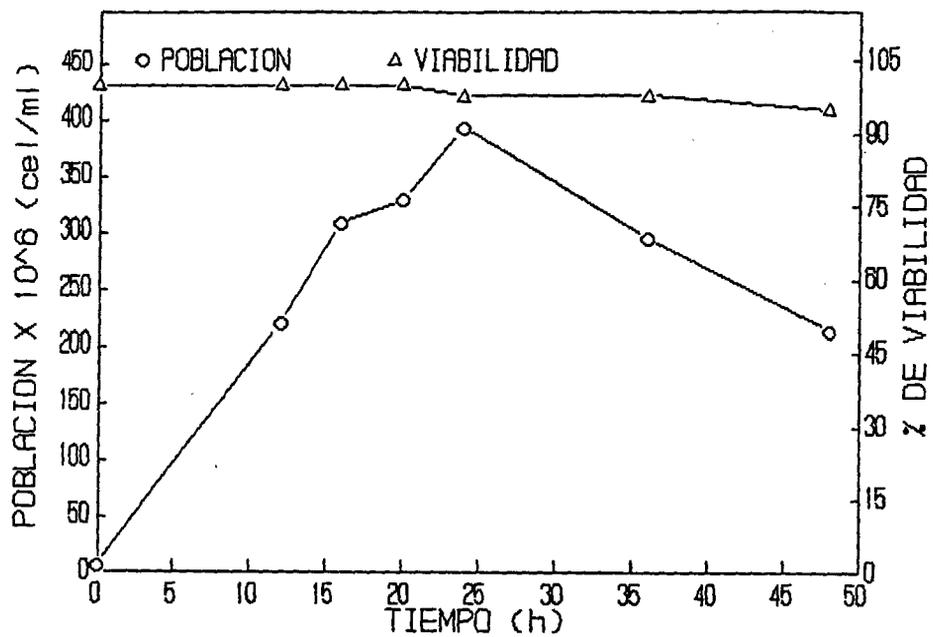


FIGURA 7. Estandarización del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio sólido de Mosto Tequilero.

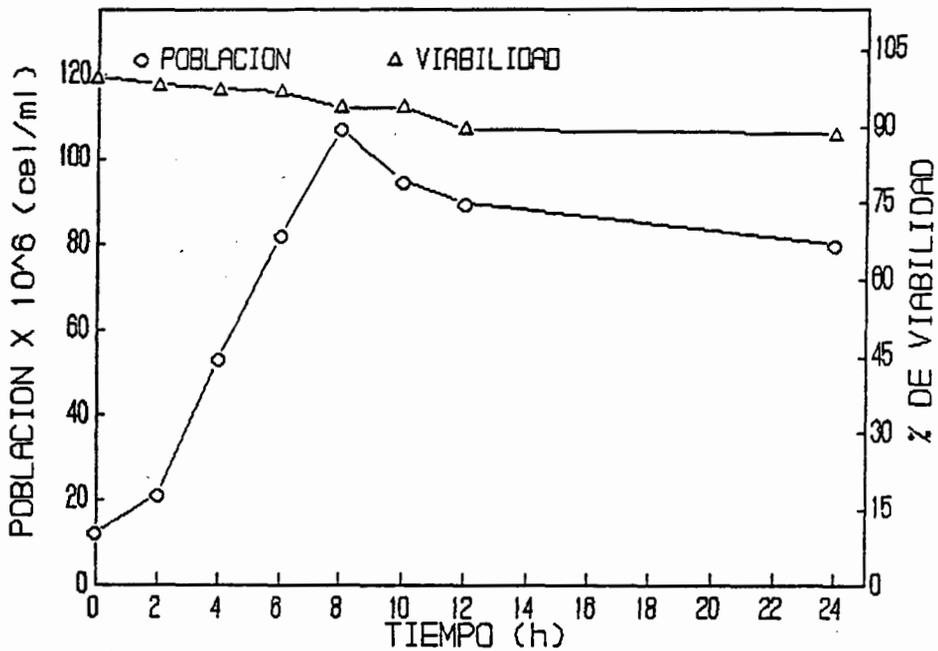


FIGURA 8. Estandarización del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en Medio líquido Base.

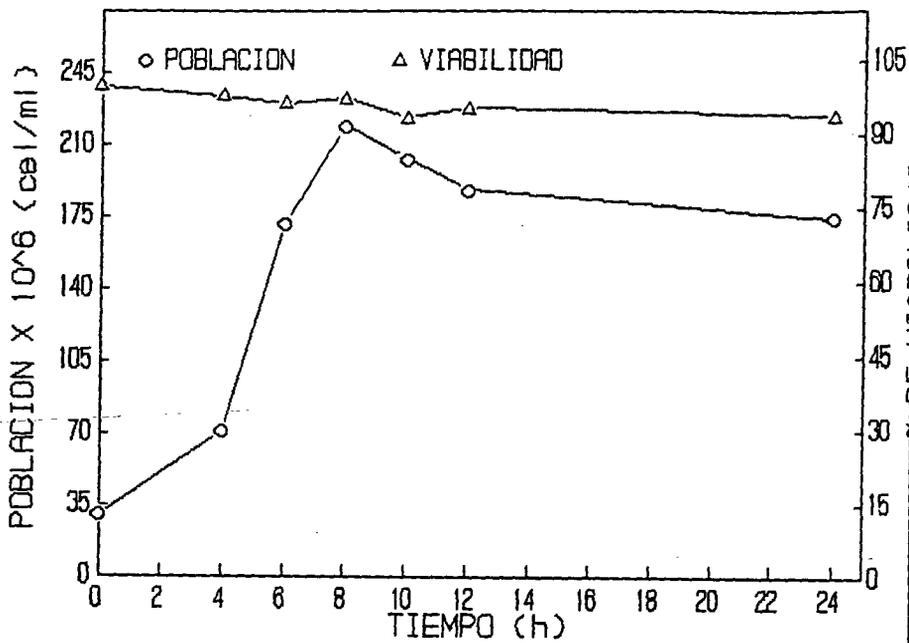


FIGURA 9. Estandarización del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido de Mosto Tequilero.

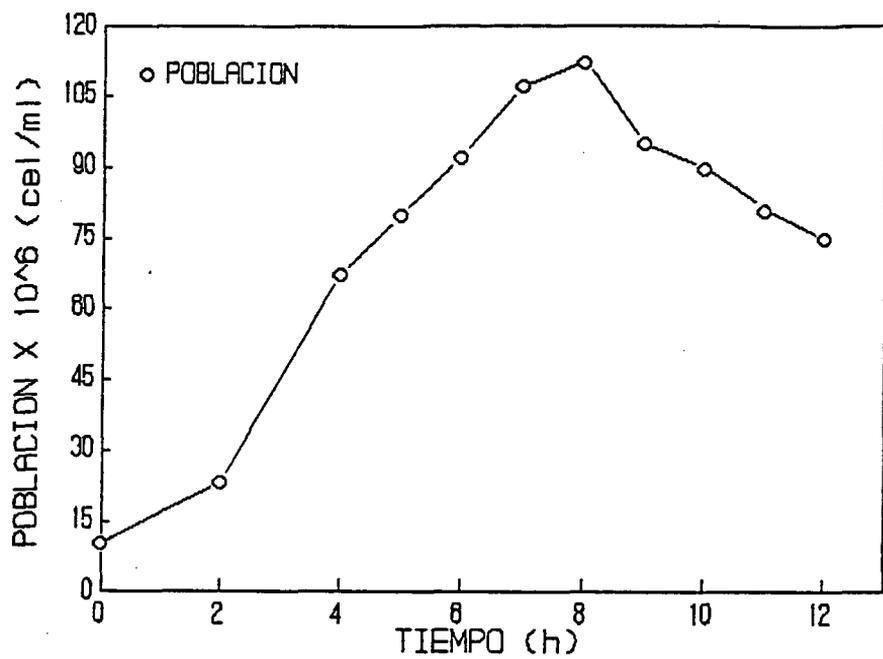


FIGURA 10. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 1 (Medio Base, sin calcio y sin etanol).

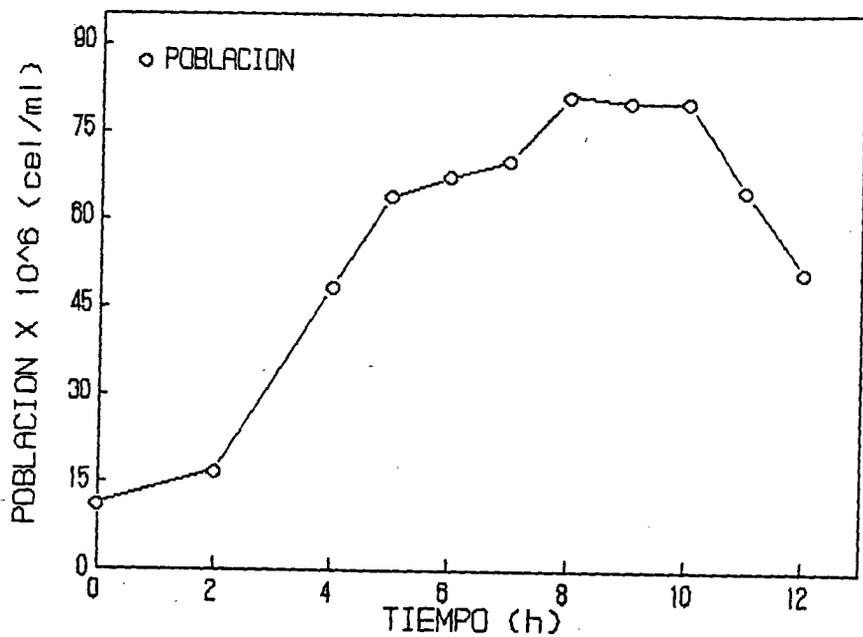


FIGURA 11. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 2 (Medio Base, sin calcio + etanol).

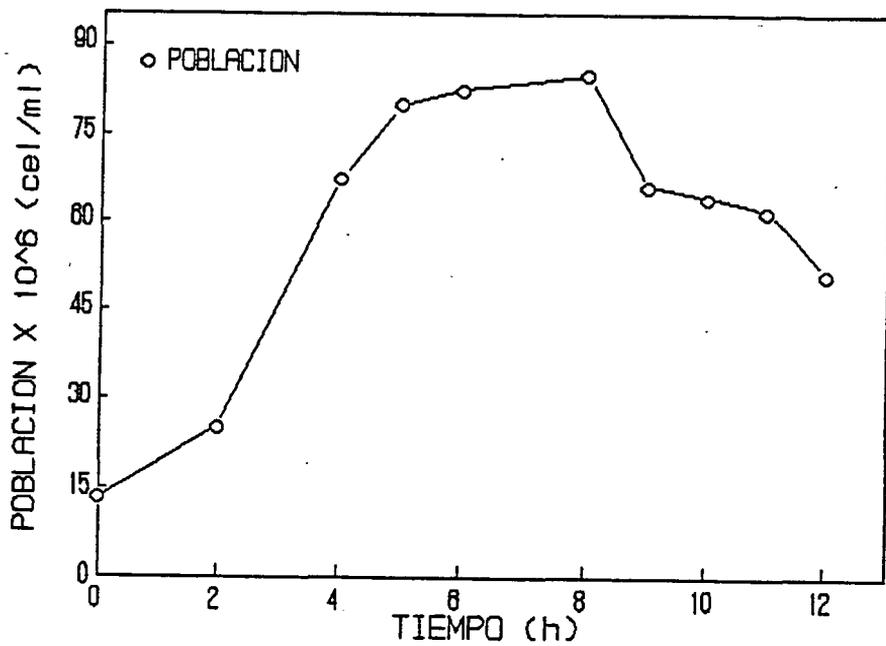


FIGURA 12. Cinética de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae en el MEDIO 3 (Medio Base con 20 mg/l de Ca + 3 % de etanol).

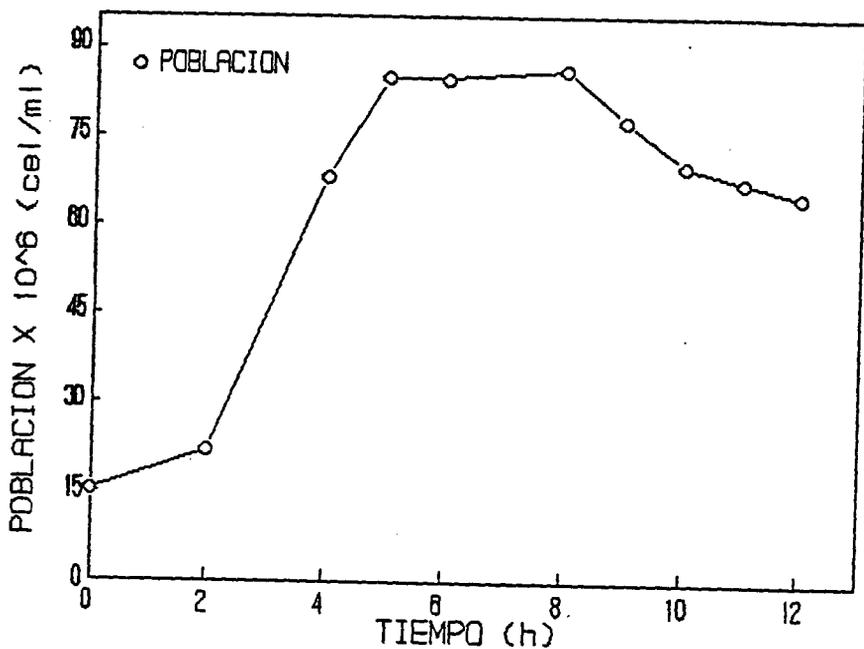


FIGURA 13. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 4 (Medio Base con 40 mg/l de Ca + 8% de etanol).

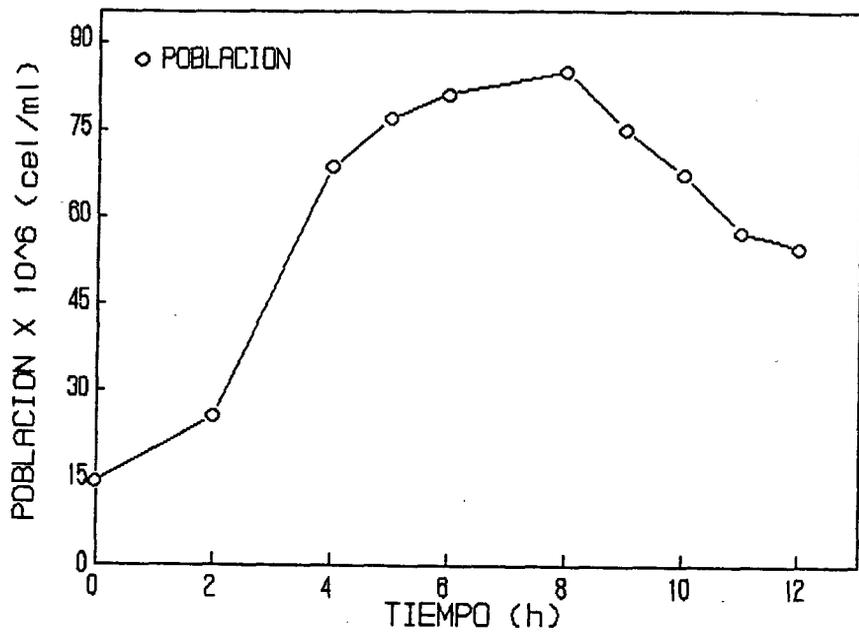


FIGURA 14. Cinática de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 5 (Medio Base con 60 mg/l de Ca + 8% de etanol).

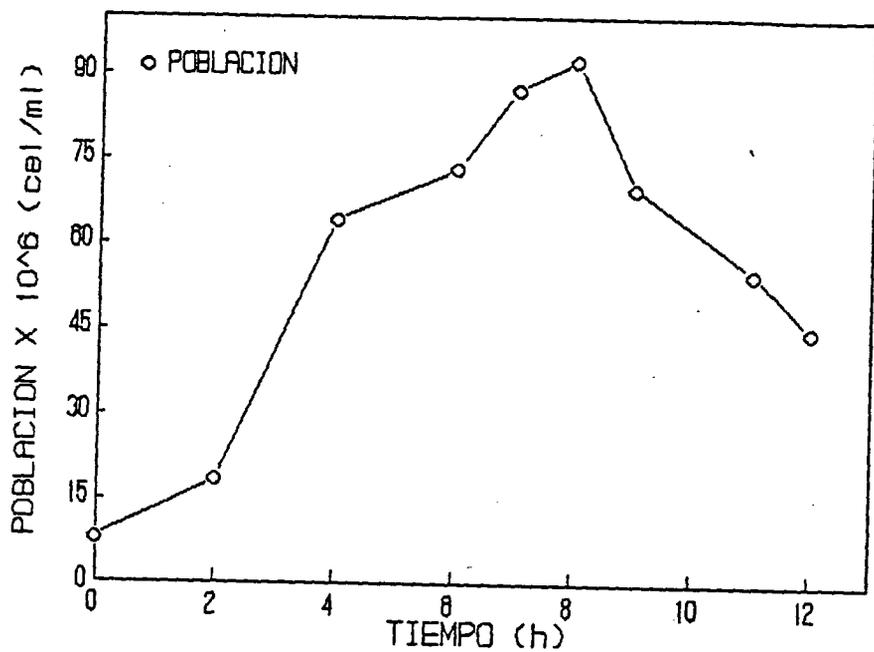


FIGURA 15. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 6 (Medio Base con 80 mg/l de Ca + 8% de etanol):

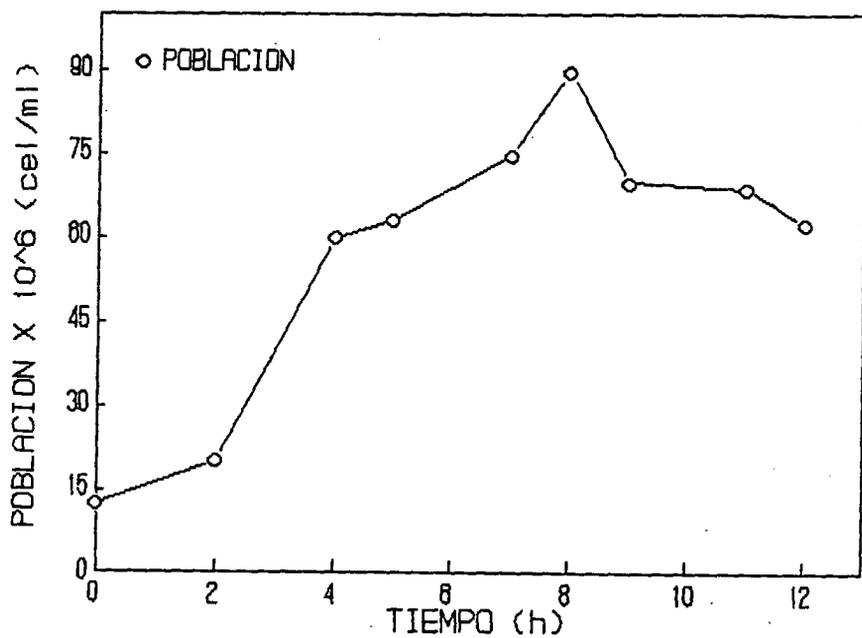


FIGURA 16. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 7 (Medio Base con 100 mg/l de Ca + 8% de etanol).

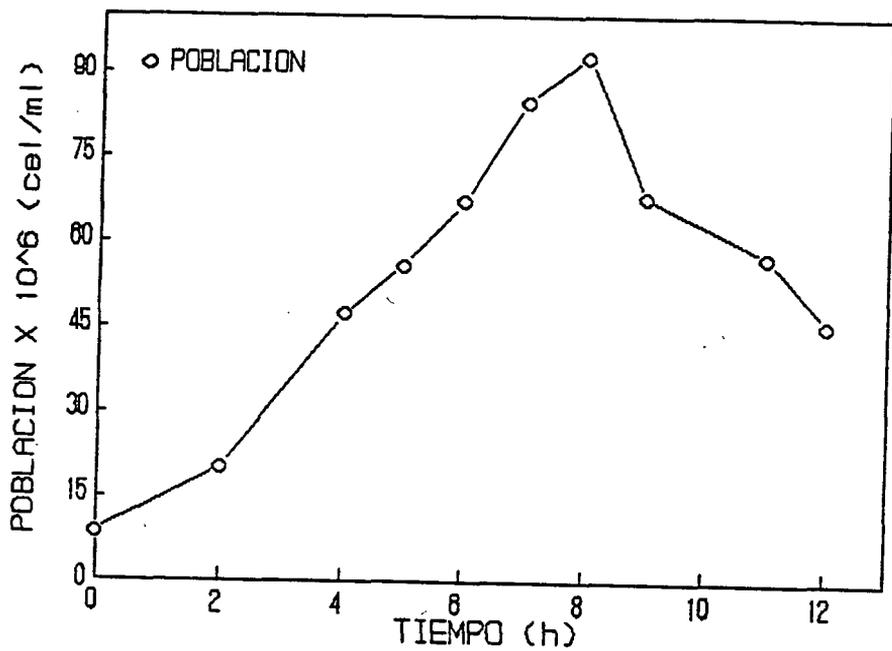


FIGURA 17. Cinética de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae en el MEDIO 8 (Medio Base con 120 mg/l de Ca + 8% de etanol).

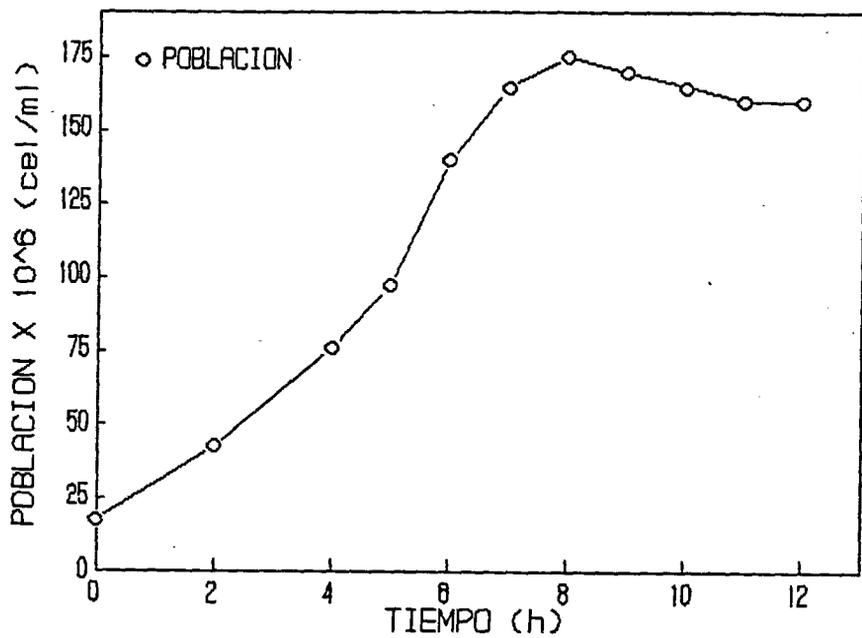


FIGURA 18. Cinética de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae en el MEDIO 9 (Mosto Tequilero).

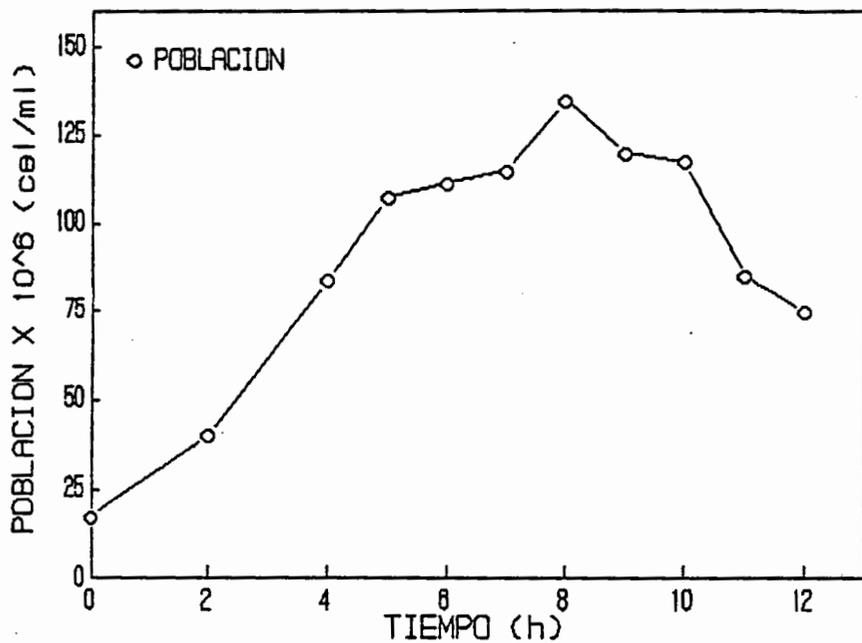


FIGURA 19. Cinética de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae en el MEDIO 10 (Mosto Tequilero + etanol).

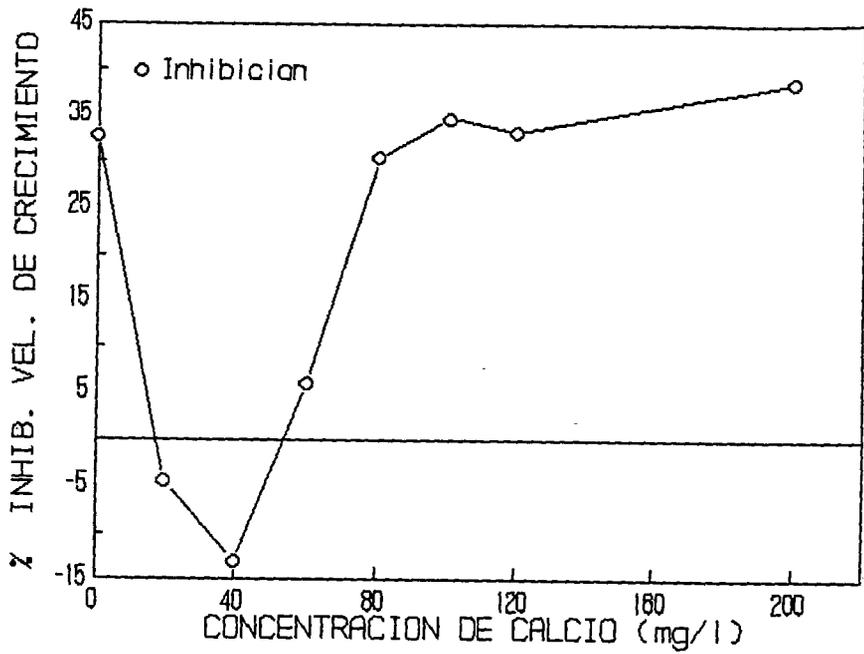


FIGURA 20. Valores promedio del porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios -- utilizados.

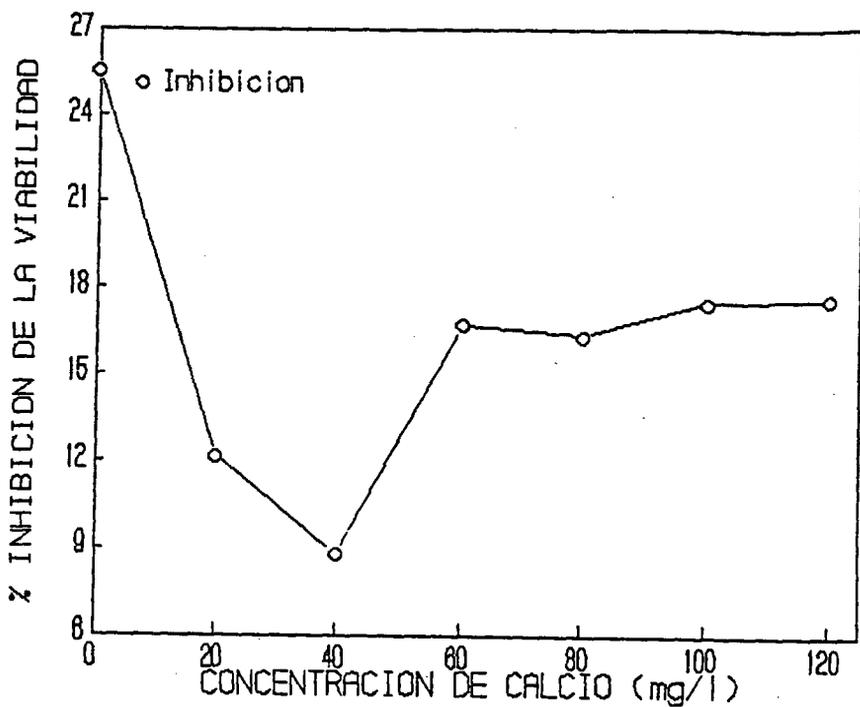


FIGURA 21. Valores promedio del porcentaje de inhibición de la --viabilidad de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

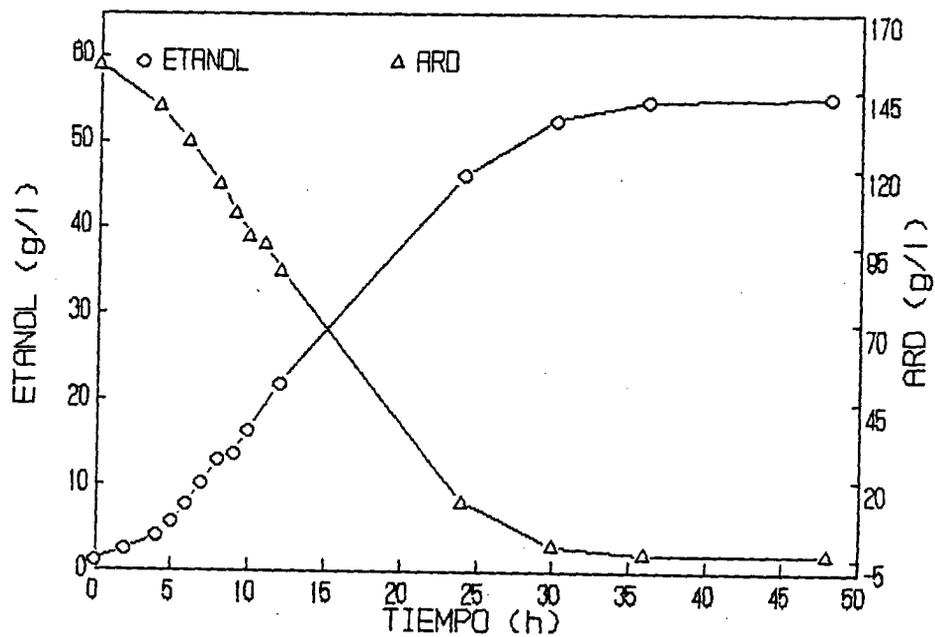


FIGURA 22. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 1.

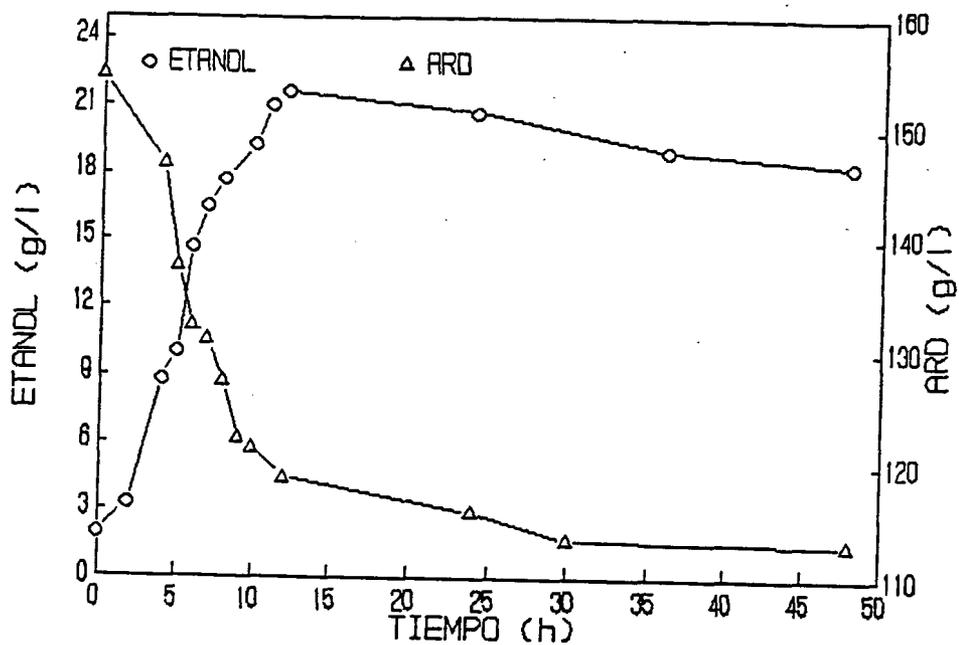


FIGURA 23. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 2.

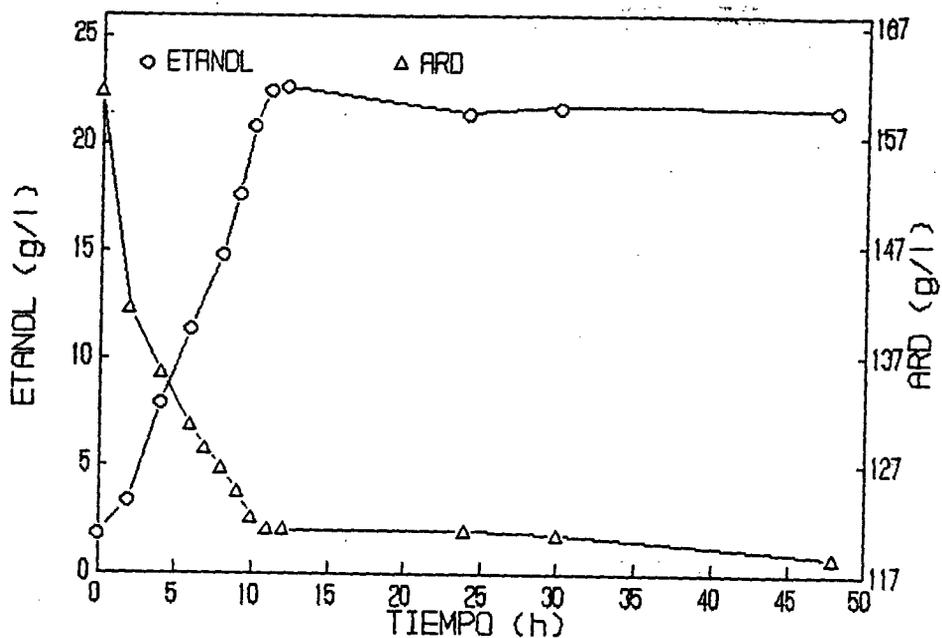


FIGURA 24. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 3.

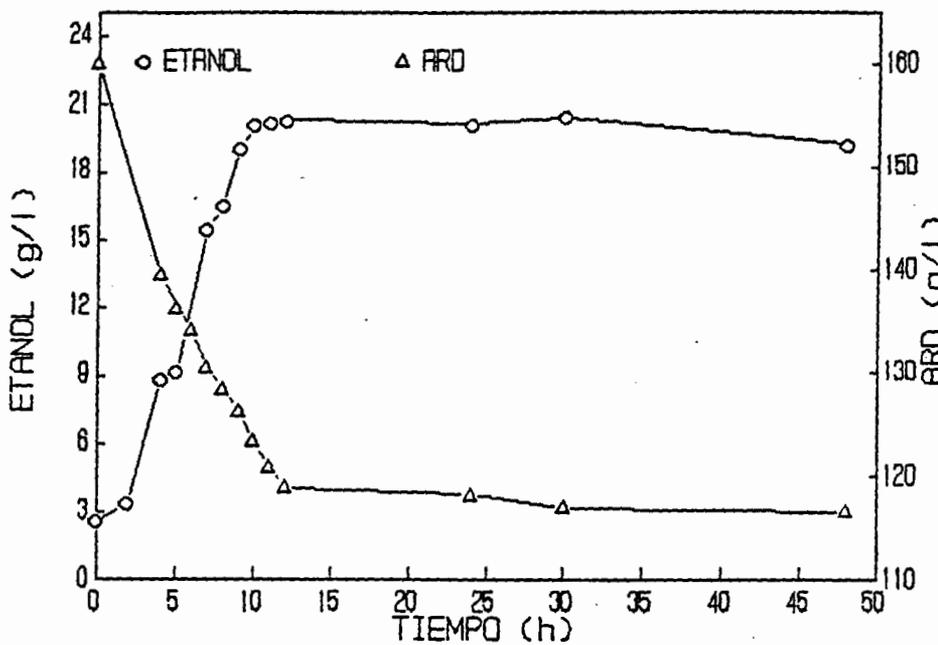


FIGURA 25. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de Saccharomyces cerevisiae en el MEDIO 4.

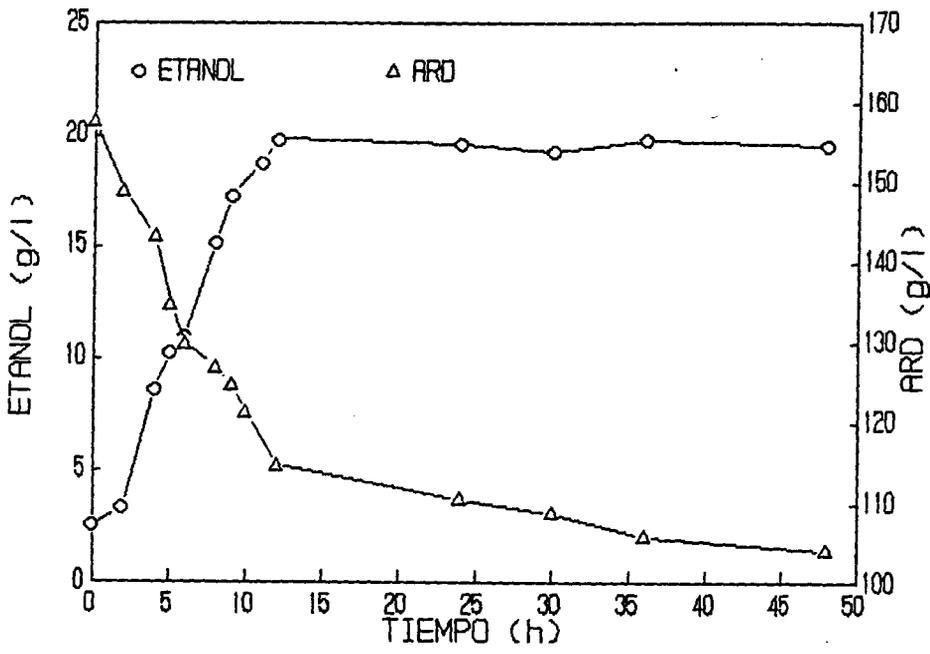


FIGURA 26. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 5.

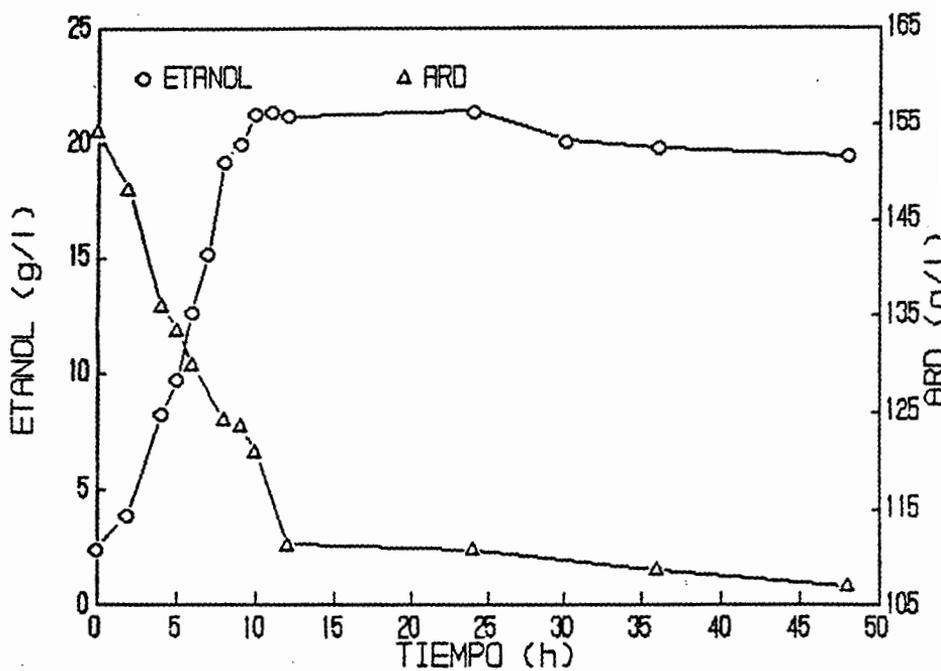


FIGURA 27. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 6.

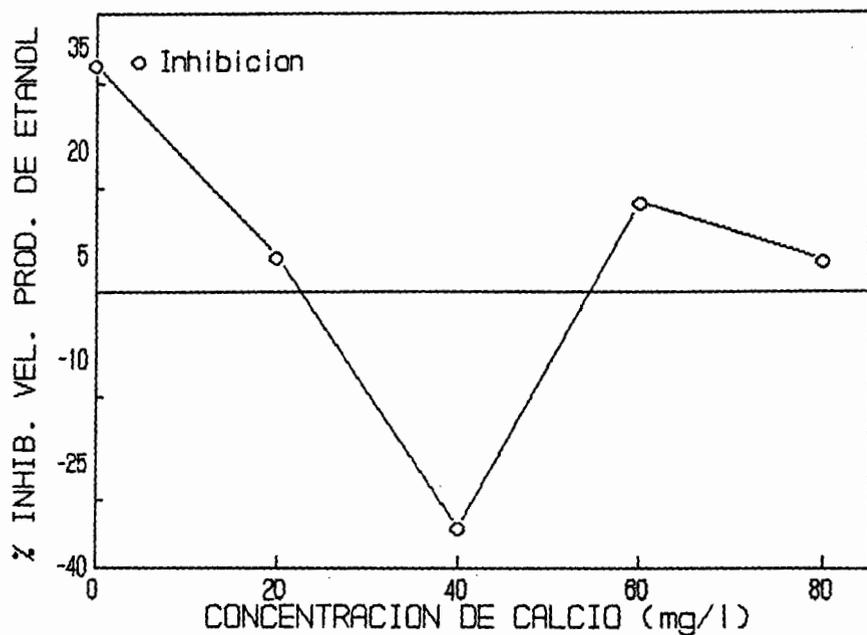


FIGURA 28. Valores promedio del porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

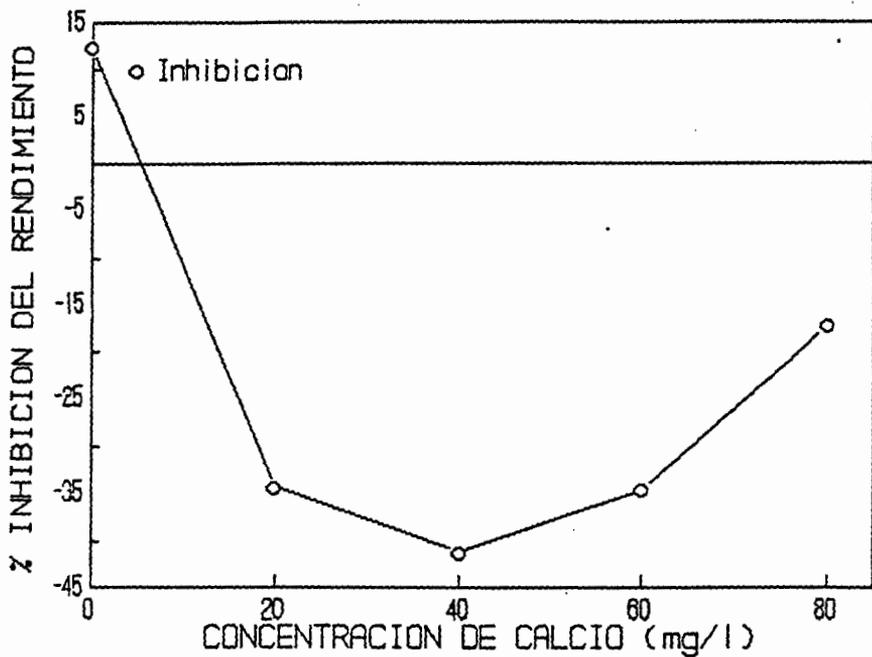


FIGURA 29. Valores promedio del porcentaje de inhibición de inhibición del rendimiento ( $Y_p/s$ ) de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

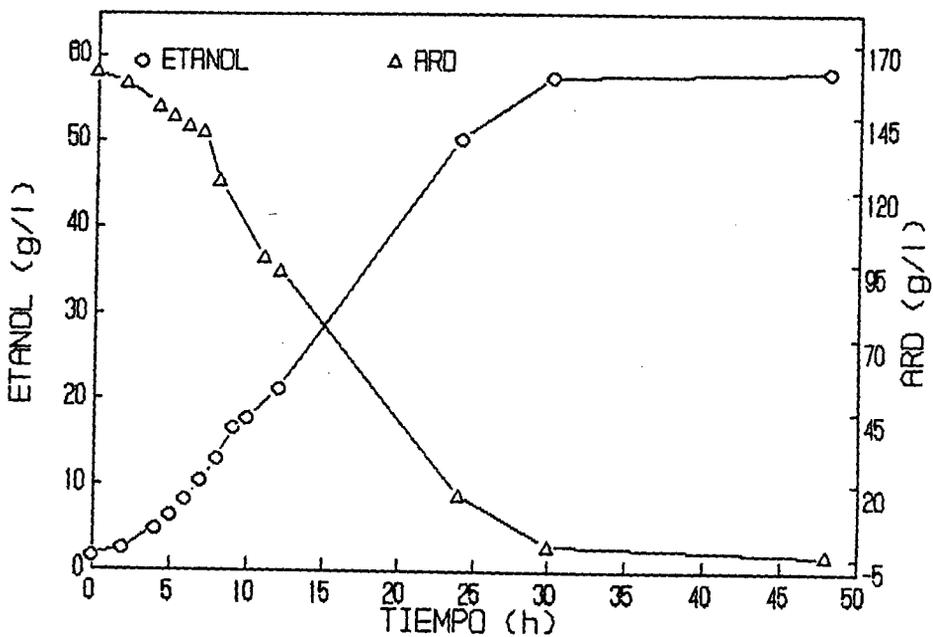


FIGURA 30. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 11.

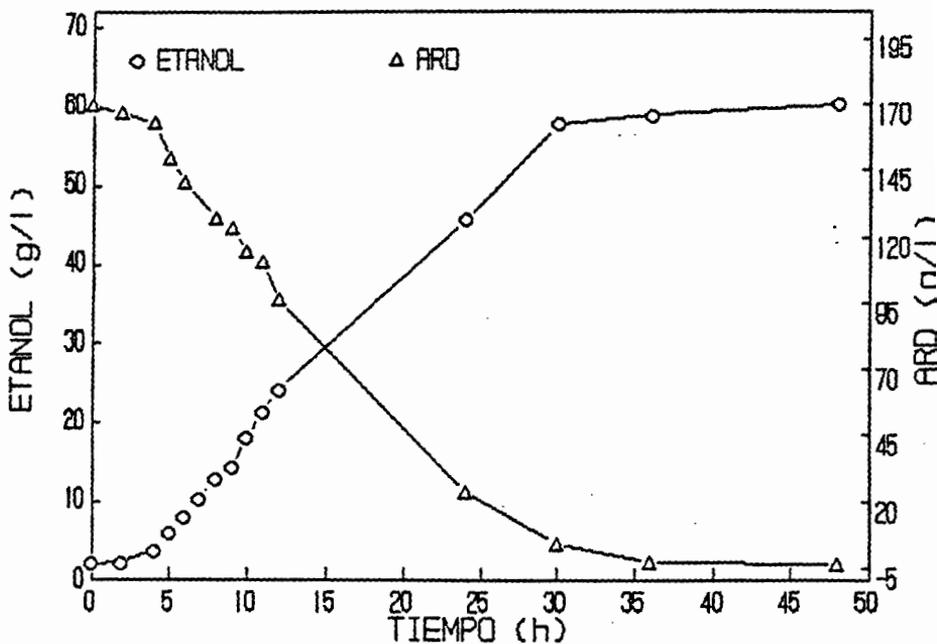


FIGURA 31. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de Saccharomyces cerevisiae en - en MEDIO 12.

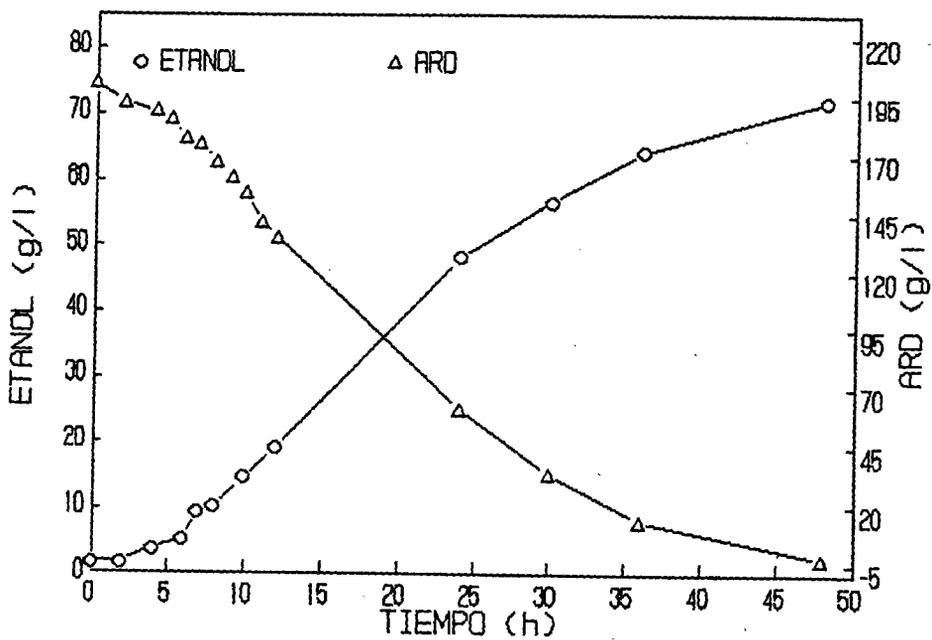


FIGURA 32. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en el MEDIO 13.

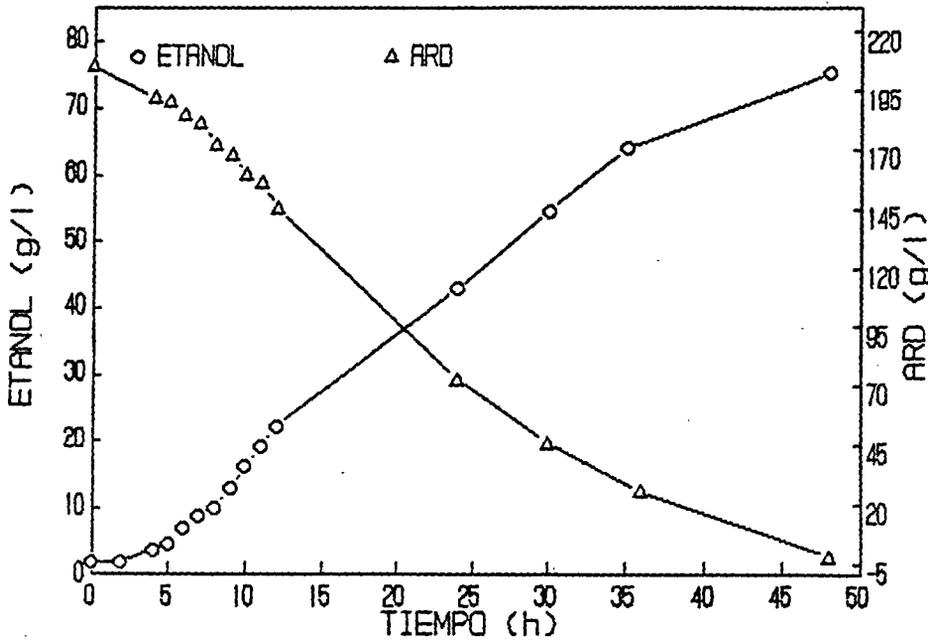


FIGURA 33. Curva de producción de alcohol y consumo de azúcares reductores directos de *Saccharomyces cerevisiae* en - en MEDIO 14.

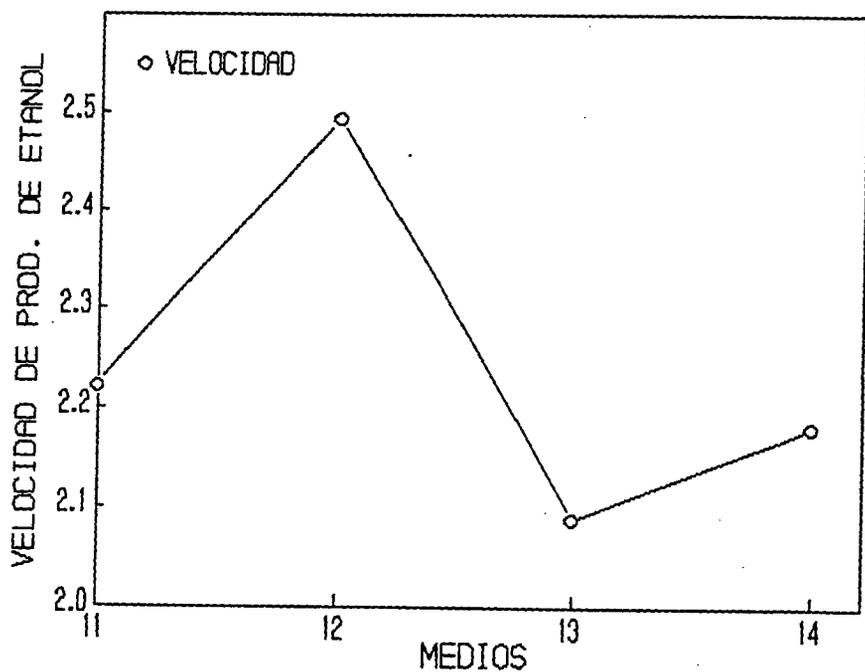


FIGURA 34. Valores promedio de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a las diferentes concentraciones de glucosa probadas con la concentración de calcio seleccionada en los medios utilizados.

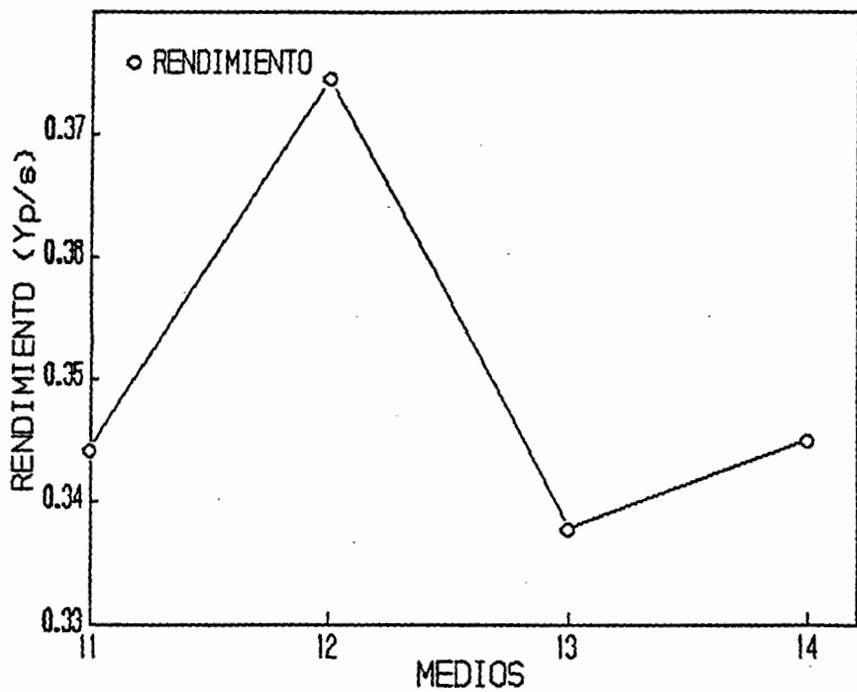


FIGURA 35. Valores promedio de los rendimientos alcanzados ( $Y_p/s$ ) de acuerdo a los medios utilizados con las diferentes concentraciones de glucosa probadas y la concentración de calcio seleccionada.

## **X. TABLAS**

No. de Reacción	Reacción Catalizada	Enzima Involucrada	Cofactores
1	Glucosa + ATP $\rightarrow$ glucosa 6 fosfato + ADP	Hexoquinasa	Mg <sup>2+</sup>
2	Glucosa 6-fosfato $\rightleftharpoons$ fructosa 6-fosfato	Glucosafosfatoisomerasa	
3	Fructosa 6-fosfato + ATP $\rightarrow$ fructosa 1,6-difosfato + ADP	Fosfofructoquinasa	Mg <sup>2+</sup>
4	Fructosa 1,6-difosfato $\rightleftharpoons$ gliceraldehído 3 fosfato + dihidroxicetona fosfato	Aldolasa	Zn <sup>2+</sup>
5	Dihidroxicetona fosfato $\rightleftharpoons$ gliceraldehído 3-fosfato	Triosafosfatoisomerasa	
6	Gliceraldehído 3-fosfato + NAD <sup>+</sup> + Pi $\rightleftharpoons$ 1,3-difosfoglicerato + NADH	Gliceraldehído 3-fosfato	
7	1,3-difosfoglicerato + ADP $\rightleftharpoons$ 3-fosfoglicerato + ATP	Fosfogliceratoquinasa	Mg <sup>2+</sup>
8	3-fosfoglicerato $\rightleftharpoons$ 2-fosfoglicerato	Fosfogliceratomutasa	2,3-difosfoglicerato
9	2-fosfoglicerato $\rightleftharpoons$ fosfoenolpiruvato + H <sub>2</sub> O	Enolasa	Mg <sup>2+</sup>
10	Fosfoenolpiruvato + ADP $\rightarrow$ piruvato + ATP	Piruvatoquinasa	
11	Piruvato $\rightarrow$ acetaldehído + CO <sub>2</sub>	Piruvatodescarboxilasa	Pirofosfato de tiamina Mg <sup>2+</sup>
12	Acetaldehído + NADH $\rightleftharpoons$ etanol + NAD <sup>+</sup>	Alcoholdehidrogenasa	Zn <sup>2+</sup>

TABLA 1. REACCIONES ENZIMATICAS INVOLUCRADAS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

FUENTE: ROSE, A. AND HARRISON, J.S., 1980.

MEDIOS	CONCENTRACION DE CALCIO mg/l	PORCENTAJE DE ETANOL
1 (Testigo)	0	0
2 (Testigo)	0	8 %
3	20 mg/l	8 %
4	40 mg/l	8 %
5	60 mg/l	8 %
6	80 mg/l	8 %
7	100 mg/l	8 %
8	120 mg/l	8 %
9 (Testigo)	200 mg/l	0
10	200 mg/l	8 %

TABLA 2. Relación de medios utilizados en la fermentación para el crecimiento y porcentaje de viabilidad

MEDIOS	CONCENT. DE Ca mg/l	VEL. DE CRECIM. (10°C/m.h)	% DE INHIB DE LA VEL. DE CRECIM.	PORCENTAJE DE VIABILIDAD	% DE INHIB. DE LA VIABILIDAD
1 (Test)	0	15.15	0	97	0
2 (Test)	0	10.17	32.87	72	25.61
3	20 mg/l	15.79	-4.22	85	12.21
4	40 mg/l	17.09	-12.80	88	8.86
5	60 mg/l	14.22	6.13	80	16.74
6	80 mg/l	10.53	30.49	81	16.38
7	100 mg/l	9.88	34.78	80	17.52
8	120 mg/l	10.11	33.26	79	17.67
9 (Test)	200 mg/l	25.44	0	98	0
10	200 mg/l	15.61	38.66	90	8.63

TABLA 3. Resultados obtenidos en la etapa de crecimiento en los diferentes medios probados.

## ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	119.76114	13			
CALCIO	108.92354	6	18.153924	11.726	3.87
ERROR	10.83760	7	1.548229		

**HIPOTESIS NULA:** No existen diferencias significativas en la velocidad de crecimiento ( $\times 10^8$  cel/ml.h) debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

**TABLA 4.** Análisis de varianza de la velocidad de crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	6017.8935	15			
CALCIO	5548.1069	7	792.58670	13.497	3.50
ERROR	469.7866	8	58.72333		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

TABLA 5. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de la velocidad crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

## ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: VIABILIDAD DE CRECIMIENTO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	598.03429	13			
CALCIO	490.43429	6	81.739048	5.318	3.87
ERROR	107.60000	7	15.371429		

**HIPOTESIS NULA:** No existe diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

**TABLA 6.** Análisis de varianza del porcentaje de viabilidad del crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

## ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA VIABILIDAD

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	401.00564	13			
CALCIO	337.35979	6	56.226631	6.184	3.87
ERROR	63.64585	7	9.092264		

**HIPOTESIS NULA:** No existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la viabilidad debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

**TABLA 7.** Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de la viabilidad del crecimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas en los medios utilizados.

MEDIOS	CONCENTRACION DE CALCIO mg/l	PORCENTAJE DE ETANOL
1 (Testigo)	0	0
2 (Testigo)	0	8 %
3	20 mg/l	8 %
4	40 mg/l	8 %
5	60 mg/l	8 %
6	80 mg/l	8 %

TABLA B. Relación de medios utilizados en la etapa de fermentación alcohólica para determinar la habilidad fermentativa.

MEDIOS	CONCENT. DE Ca mg/l	VEL. DE PROD. ETOH (gr/l.h)	% DE INHB. VELOC. DE PROD. ETOH	RENDIMIENTO (Yp/s)	% DE INHB. DEL RENDIMIENTO
1 (test)	0	2.2226	0	0.3442	0
2 (test)	0	1.4928	32.83	0.3009	12.57
3	20 mg/l	2.1062	5.23	0.4617	-34.13
4	40 mg/l	2.9764	-34.00	0.4856	-41.08
5	60 mg/l	1.9311	13.11	0.4629	-34.48
6	80 mg/l	2.1212	4.56	0.4028	-17.03

TABLA 9. Resultados obtenidos en la etapa de fermentación alcohólica de los diferentes medios probados.

## ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ALCOHOL

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	2.3626475	9			
CALCIO	2.3247424	4	0.5811856	76.663	5.19
ERROR	0.0379050	5	0.0075810		

**HIPOTESIS NULA:** No existen diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol (g/l.h), debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

**TABLA 10.** Análisis de varianza de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

**ANALISIS DE VARIANZA**

**RESPUESTA ANALIZADA: PORCENTAJE INHIBICION DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ALCOHOL**

<b>FUENTE DE VARIACION</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS LIBERTAD</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F CALCULADA</b>	<b>F TABLAS</b>
TOTAL	4788.5064	9			
CALCIO	4721.8651	4	1180.4663	88.569	5.19
ERROR	66.6413	5	13.3283		

**HIPOTESIS NULA:** No existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

**TABLA 11.** Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a las concentraciones de calcio probadas.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: RENDIMIENTO (Yp/s)

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.0170817	9			
CALCIO	0.0151268	4	0.0037817	9.637	5.19
ERROR	25.7794	5	5.15587		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencia significativas en el rendimiento (Y p/s) debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

TABLA 12. Análisis de varianza del rendimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: PORCENTAJE DE INHIBICION DEL RENDIMIENTO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	3795.3286	9			
CALCIO	3767.3522	4	941.83805	168.327	5.19
ERROR	27.9764	5	5.59528		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del rendimiento debido a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

TABLA 13. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del rendimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de calcio probadas.

MEDIOS	CONCENTRACION DE GLUCOSA g/l	CONCENTRACION DE CALCIO mg/l
11 (Testigo)	150 g/l	0
12	150 g/l	40 mg/l
13 (Testigo)	200 g/l	0
14	200 g/l	40 mg/l

**TABLA 14.** Relación de medios utilizados en la fermentación probando diferentes concentraciones de azúcar, con la concentración de calcio seleccionada.

MEDIOS	CONCENT. DE Ca mg/l	CONCENT. DE GLUCOSA g/l	VELOCIDAD DE PRODUC. DE ALCOHOL	RENDIMIENTO (Y p/s)	PORCENTAJE DE EFICIENCIA
11 (test)	0	150 g/l	2.2226	0.3442	68 %
12	40 mg/l	150 g/l	2.4950	0.3745	81 %
13	0	200 g/l	2.0884	0.3378	66 %
14	40 mg/l	200 g/l	2.1811	0.3450	68 %

TABLA 15. Resultados obtenidos en la fermentación en relación a la producción de alcohol, rendimiento y eficiencia de acuerdo a las diferentes concentraciones de azúcar probadas.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ALCOHOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.1998483	7			
CALCIO	0.0664484	1	0.0664484	2.989	5.99
ERROR	0.1333999	6	0.0222333		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol debido a la concentración de calcio seleccionada.

TABLA 16. Análisis de varianza de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a la concentración de calcio seleccionada.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ALCOHOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.1998483	7			
GLUCOSA	0.1001505	1	0.1001505	6.027	5.99
ERROR	0.0996978	6	0.0166163		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol debido a las diferentes concentraciones de glucosa probadas.

TABLA 17. Análisis de varianza de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a las diferentes concentraciones de glucosa probadas.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: VELOCIDAD DE PRODUCCION DE ALCOHOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO Y GLUCOSA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.1998483	7			
CALCIO * GLUCOSA	0.1646366	2	0.0823183	11.689	5.79
ERROR	0.0352117	5	0.0070423		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en la velocidad de producción de alcohol debido a las diferentes concentraciones de glucosa probadas con la concentración de calcio seleccionada.

TABLA 18. Análisis de varianza de la velocidad de producción de alcohol de acuerdo a las diferentes concentraciones de glucosa con la concentración de calcio seleccionada.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: RENDIMIENTO (Yp/s) DE ACUERDO A LAS  
CONCENTRACIONES DE CALCIO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.0045095	7			
CALCIO	0.0003264	1	3.26401E-004	0.468	5.99
ERROR	0.0041831	6	6.97183E-004		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en el rendimiento (Yp/s) debido a la concentración de calcio seleccionada.

TABLA 19. Análisis de varianza del rendimiento de acuerdo a la concentración de calcio seleccionada.

ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: RENDIMIENTO (Yp/s) DE ACUERDO A LAS  
CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLA
TOTAL	0.0045095	7			
GLUCOSA	0.0002868	1	2.86801E-004	0.408	5.99
ERROR	0.0042227	6	7.03783E-004		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en el rendimiento (Y p/s) debido a las diferentes concentraciones de glucosa probadas.

TABLA 20. Análisis de varianza del rendimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de glucosa probadas.

## ANALISIS DE VARIANZA

RESPUESTA ANALIZADA: RENDIMIENTO ( $Y_{p/s}$ ) DE ACUERDO A LAS  
CONCENTRACION DE CALCIO Y GLUCOSA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.0045095	7			
CALCIO * GLUCOSA	0.0011967	2	5.98326E-004	0.903	5.79
ERROR	0.0033128	5	6.62570E-004		

HIPOTESIS NULA: No existen diferencias significativas en el rendimiento ( $Y_{p/s}$ ) debido a las diferentes concentraciones de glucosa probadas con la concentración de calcio seleccionada.

TABLA 21. Análisis de varianza del rendimiento de acuerdo a las diferentes concentraciones de glucosa con la concentración de calcio seleccionada.

gl	.05	.01
1	.99692	.999877
2	.95000	.990000
3	.8783	.95873
4	.8114	.91720
5	.7545	.8745
6	.7067	.8343
7	.6664	.7977
8	.6319	.7646
9	.6021	.7348
10	.5760	.7079
11	.5529	.6835
12	.5324	.6614
13	.5139	.6411
14	.4973	.6226
15	.4821	.6055
16	.4683	.5897
17	.4555	.5751
18	.4438	.5614
19	.4329	.5487
20	.4227	.5368
25	.3809	.4869
30	.3494	.4487
35	.3246	.4182
40	.3044	.3932
45	.2975	.3721
50	.2732	.3541
60	.2500	.3248
70	.2319	.3017
80	.2172	.2830
90	.2050	.2673

TABLA 22. Valores de  $r$  a los Niveles de Confianza de 0,05 y 0,01.

FUENTE: Fisher y Yates, F. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research, 4a.ed., Oliver & Boyd Edimburgo.

## **XI. ANEXO**

## XI ANEXO

1. La velocidad de crecimiento y la velocidad de producción de alcohol se calculan por medio de una regresión a la región lineal de la curva, ya sea para el crecimiento o para producción de alcohol, en donde la pendiente corresponderá a la velocidad máxima para cada caso. Se calculan con la ayuda de un programa de computadora llamado "NUMERICO".

2. El porcentaje de inhibición, para el crecimiento, viabilidad, producción de alcohol y rendimiento se calcula en base al medio testigo al cual no se adiciona etanol, con respecto a los medios a los que si se les adicionó, por medio de una regla de tres:

Medio sin adición de \_\_\_\_\_ 100 % de respuesta  
etanol

Medio con adición de \_\_\_\_\_ X  
etanol

El 100 % de respuesta se resta con el obtenido en el medio con etanol (100 - X) quedando el 0 % de inhibición para el medio sin etanol y el resultado de la diferencia es el porcentaje de inhibición de ese medio.

3. El rendimiento (Yp/s): son los gramos producidos del metabolito en cuestión entre los gramos de sustrato consumido.

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

4. La eficiencia se calcula con respecto al máximo teórico por una regla de tres:

0.51 \_\_\_\_\_ 100 % de eficiencia

Y p/s experimental \_\_\_\_\_ X

## **XII. BIBLIOGRAFIA**

## XII BIBLIOGRAFIA

- Aranha, H.; Evans, S.L.; Arceneaux, E.L., and Byers, B.R. 1986. Calcium Modulation of growth of Streptococcus mutans. Journal of General Microbiology, 132, p. 2661-2663.
- Blanco, G., y Herryman, M. 1987. Evaluación Económica de la producción de alcohol con diferentes tecnologías. Revista ICIDCA. Vol. XXXL, p. 32-36.
- Bohringer, P., and Jakob, L. 1986. The determination of alcohol using chromic acid. Zeitschr. Flussiges Abst., 31, p. 223.
- Chye, T.T., and Meng. 1975. L.C., J. Singapore Nat. Acad. Sci. 4., p. 152.
- Concheiro, A.A. 1985. Biotecnología y Energía. Perspectivas de la Biotecnología en México. Ed: Ramirez, G.R. CONACYT, p. 445-461.
- Crueger, W., and Crueger, A. 1984. Biotectology: A texbook of Industrial Microbiology. Ed: Brock T.D. 1er. Edition, Sanaver Associates Inc., p. 121-126.
- D'amore, T.; Panchal, C.J., and Stewart, G.G. 1988. Intracellular Etanol Acumulation in Saccharomyces cerevisiae during Fermentation. Applied and Enviromental Microbiology, 54 (1), p. 110-114.
- Dasari, G.; Worth, M.A.; Connor, M.A., and Pamment, N.B. 1990. Reasons for the Apparent Difference in the Effects of Produced and Added Ethanol on Culture Viability during Rapid Fermentations by Saccharomyces cerevisiae. Biotech. and Bioeng. Vol. 35, p. 109-122.
- Dubois, M., and Gilles, K.A. 1956. Colorimetric Method for Determínation of sugar and Related Substances. Analytical Chemistry. 28 (3), p. 350-356.
- Ernandez, J.R.; Matulionis, M.; Cruz, S.H.; Bertolini, M.C., and Lalece, C. 1990. Isolation the new ethanol-tolerant yeasts for fuel Ethanol production the sucrose. Biotechnology Letters. Vol. 12, No. 6, p. 463-468.

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

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

Jones, R.P.; Pamment, N., and Greenfield, P. 1981. Alcohol Fermentation by Yeast the Effect of Environmental and Other Variables. *Process Biochemistry*. p. 42-49.

Jones, R.P., and Greenfield, P.F. 1984. A Review of Yeast Ionic Nutrition, Part I: Growth and Fermentation Requirements. *Process Biochemistry*. p. 48-59.

Jones, R.P., and Gadd, G.M. 1990. Ionic nutrition of Yeast Physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 12, p. 402-418.

Jurado, A.; Santana, A.C.; Da Costa, M., and Madeira, V.M. 1987. Influence of Divalent cations on the Growth and Morphology of Bacillus stearothermophilus. *Journal of General Microbiology*. 133, p. 507-513.

Kalmokoff, M.L., and Ingledew, W.N. 1985. Evaluation of Ethanol Tolerance in selected Saccharomyces strains. *ASBC Journal*. 43 (4), p. 184-196.

Kar, R., and Viswanathan, L. 1985. Ethanolic Fermentation by Thermotolerant Yeast. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B, p.235-238

Kilian, S.G.; Du Preez, J.C., and Gericke, M. 1989. The effects of ethanol on growth rate and passive proton diffusion in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, p. 90-94.

Kirk-Othmer. 1981. Producción Industrial de Alcohol. *Enciclopedia de la Tecnología Química*. UTEHA 1, p. 745-781.

Laure, F.; Lafon-Lafourcade, S., and Ribereau-Gayon, P. 1984. Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae and the activities of hexokinase and alcohol deshydrogenase. *Biotechnology letters*. No.10, p.687-692.

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

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

Maiorella, B.L.; Blanch, H.W., and Wilk, K.C. 1981. Alcohol Production and Recovery. Advances in Biochem. Engin. Ed. A. Fiechter "Bioenergy". p.43-92.

Mancilha, Z.M.; Pearson, A.M.; Walter, J., and Hogaboam, G.J. 1984. Increasing Alcohol Yield by Selected Yeast Fermentation of Sweet Sorghum Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXVI, p. 634-642.

Mansur, M.; Suárez, M.; Hernández, L.; Zuaznaba, Z.; Williams, I. 1986. Selección de cepas de levaduras para la fermentación alcohólica con jugo de caña. ICIDCA Cuba. p.101-105.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. chem. 31, p. 425-428.

Mosley, G.A.; Card, G.L., and Koostra, W.L. 1976. Effect of calcio and anaerobiosis on the thermostability of Bacillus stearothermophilus. Can. J. Microbiol. 22, p. 468-474.

Moulin, G.; Boze, H., and Galzy, P. 1980. Inhibition of alcoholic Fermentation by Substrate and Ethanol. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 22, p. 2375-2381.

Nabais, R.C.; Sá-Correia, I. Viegas, C.A., and Novais, J.M. 1988. Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of Saccharomyces bayanus and Alcoholic Fermentation by Yeast. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 54, No. 10, p. 2439-2446.

Nagodawithana, T.W., and Steinkraus, K.H. 1977. Influence of the rate of ethanol production and acumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in "rapid fermentation". Appl. Environm. Microbiol. 31, p. 158-162.

Noa, S.H. 1991. La Diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. Proyecto de diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar en América Latina y el Caribe GEPLACEA/PNUD/RLA/186/011, p. 89-92.

Novak, M.; Strehaiano, M., and Goma, G. 1981. Alcoholic Fermentation: On the inhibitory Effect of Ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 23, p.201-211.

Okolo, B.N.; Johnston, J.R., and Berry, D.R. 1990. Kinetics of alcohol tolerance of distilling yeast. *Enzyme Microb. technol.* Vol. 12, p. 783-787.

Palacios, H. 1956. Fabricación de alcohol. SALVA EDITORES, S.A. Tomo 1.

Pascual, C.; Alonso, A.; García, I., and Romay, C. 1988. Effect to Ethanol on glucose Transport, key Glucolytic Enzymes, and Proton Extursion in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 32, p.374-378.

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

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

Presscot y Dunn. 1976. Producción Industrial de alcohol por Fermentación Industrial. p. 110-133.

Rose, A.H., and Harrison, J.S. 1980. The Yeast Fisiology and Biochemistry of Yeast. Academic Press London and New York. 2, p. 122-124.

Rose, A.H., and Beavan, M.J. 1982. In Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals. A.Hollaender, R.Robson, P.Rogers, A.San Pietro, R.Valentine and R.Wolfe, Eds. (Plenum, New York), p. 513.

Rosa, M.F., and Sá-Correia, I. 1992. Ethanol Tolerance and activity of plasma membrana ATPasa in Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme Microb. Technol.* Vol.14, p.23-27.

Rodríguez, B.I. 1990. Optimización de la producción de etanol en los Ingenios de caña de azúcar. Informe técnico final. (CONACYT P122CCOT884225).

Rodríguez, G.D. 1990. Evaluación de la Tolerancia al Etanol de dos cepas de Saccharomyces cerevisiae. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, U de G.

Ruiz, O.C. 1990. Determinación de la influencia del Ion Amonio en la Velocidad de Fermentación Alcohólica. Tesis profesional Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas, U de G.

Saita, M., and Slaughter, J. 1984. Aceleration of the Rate of Fermentation by Saccharomyces cerevisiae in the Presence of Amonium Ion. *Enzyme Microb. Technol.*, 6, p. 375-378.

Salgueiro, S.P.; Sá-Correia, I. and Novais, J.M. 1988. Ethanol-Induced Leakage in Saccharomyces cerevisiae: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity. *Appl. and Environmental Microbiology*. Vol.54, No. 4 p. 903-909.

Stewart, G.G. and Rusell, I. 1985. The Biology of Saccharomyces. In: *Biology of Industrial Microorganisms*. Demain A.L. and Solomon N.A. (Comp.) *Biotechnology serie*, p. 511-536.

Sturion, C.A. 1988. Tecnología de la Producción de Alcohol por Fermentación. *Revista GEPLACEA*, p. 25-38.

Suresh, S. and Tauro, P. 1987. Detection and biochemical characterisation of fast and slow ethanol-producing yeast. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotech.* Vol. 3, No.2, p. 155-160.

Travassos, L.R. and Cury, A. 1966. *Anal. Microbiol.* 14. p. 11.

Thomas, D.S.; Hossack, J.A., and Rose, A.H. 1978. Plasma Membrane Lipid Composition and Ethanol Tolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Arch. Microbiol.* 117, p: 239-245.

Walsh, R.M., and Martin, P.A. 1977 *J. Inst. Brew.* 83. p. 83-169.