



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE ETANOL POR
Zymomonas mobilis
A PARTIR DE AGUAMIEL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
MÓNICA MARTÍNEZ CHINO



EXAMENES PROFESIONALES
MÉXICO, D.F. FACULTAD DE QUÍMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Ma. Elsa Escudero García
VOCAL: Prof. Amelia Ma. de Gpe. Farres González Sarav
SECRETARIO: Prof. Abel Blancas Cabrera
1er. SUPLENTE: Prof. Luciano Hernández Gómez
2do. SUPLENTE: Prof. Martha Giles Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

UNAM, Planta Piloto, Instituto de Investigaciones Biomédicas y Facultad de Química,
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edif. E, Laboratorio 324.

ASESOR DEL TEMA:



Ing. Abel Blancas Cabrera

SUPERVISOR TECNICO:



Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

SUSTENTANTE:



Mónica Martínez Chino

AGRADECIMIENTOS

*A Dios y mis padres
por regalarme la vida*

*A mi madre por apoyarme
en todo incondicionalmente,
por su paciencia y amor.*

*A las personas que me alentaron
en los días difíciles (Erving ♥) y
aquellas que con sus sugerencias
me ayudaron en la elaboración de
este trabajo (Tere Flores y Jesús Villegas).
Así como a las personas que hicieron
Agradable mi estancia en la Planta
Piloto (Móni, Sr. Luis e Iván).*

*A la Dra. Carmen Wachter R. y
al Ing. Abel Blancas C. por la
confianza depositada en mí para
la realización de este proyecto.*

*A mis tíos Estela, Margarita,
José Luis y Rogelio, por su
apoyo y comprensión en todo
momento.*

*A los miembros del H. jurado por sus
comentarios para mejorar esta tesis.*

INDICE

	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1 Agave	4
3.2 Pulque	9
3.3 Aguamiel	9
3.3.1 Definición	9
3.3.2 Usos	9
3.3.3 Composición química y características físicas	10
3.4 <i>Zymomonas mobilis</i>	11
3.4.1 Metabolismo de sacarosa, glucosa y fructosa	12
3.4.2 Estructura y composición celular de la membrana	16
3.4.3 Estudios de <i>Zymomonas mobilis</i> en cultivo por lotes	17
3.4.3.1 Sustrato	18
3.4.3.2 Temperatura	18
3.4.3.3 Etanol	19
3.4.3.4 pH	19
3.4.3.5 Oxígeno	20
3.4.4 Estudios de <i>Zymomonas mobilis</i> en cultivo alimentado	20
4. Objetivos	21
5. Materiales y métodos	22
5.1 Microorganismo empleado	22
5.1.1 Pureza de <i>Zymomonas mobilis</i>	22
5.1.2 Reactivación de <i>Zymomonas mobilis</i>	22
5.2 Sustrato	22
5.3 Preparación del inóculo	22
5.4 Selección de una fuente de carbono para la producción de etanol en	

cultivo alimentado	23
5.5 Cultivos	23
5.5.1 Inóculo	23
5.5.2 Producción de etanol por cultivo en lote	23
5.5.3 Producción de etanol por cultivo en lote alimentado	23
5.5.3 Producción de etanol a partir de aguamiel con 13% de sólidos totales en cultivo alimentado	24
5.5.4 Análisis: pH, % Sólidos totales, Biomasa, Azúcares reductores Carbohidratos totales, Etanol, Polímeros, Sacarosa, Glucosa y Fructosa	25
6. Resultados	28
7. Conclusiones	47
8. Apéndices	48
9. Bibliografía	60

1. RESUMEN

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se obtiene mediante la fermentación natural de aguamiel en la que participan diversos tipos de microorganismos. Actualmente se está desarrollando un proceso para la obtención de una bebida similar, mediante la fermentación de aguamiel pasteurizado e inoculado con microorganismos aislados del pulque. La producción de etanol varía de acuerdo a la cantidad de azúcares fermentables presentes en el aguamiel, lo que depende del tipo de maguey, suelo y época del año en la que se cultiva. En este trabajo se buscó incrementar la producción de etanol a partir de aguamiel utilizando una cepa de *Zymomonas mobilis* aislada del pulque y probando dos sistemas de cultivo: por lotes y alimentado.

Se estudiaron algunas condiciones para la preparación del inóculo y la selección de una fuente de carbono para realizar un cultivo alimentado. Con un volumen de 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L y 200 rpm de agitación se obtuvo el mejor crecimiento de *Zymomonas mobilis* para la preparación de los inóculos. La fuente de carbono que generó la mayor producción de etanol en cultivo alimentado fue el jarabe de fructosa. En el caso del cultivo alimentado, con la adición inicial de jarabe de fructosa al aguamiel (13% de sólidos totales) y una alimentación posterior con el mismo jarabe, se obtuvo una mayor concentración de etanol (75.0-77.0 g/l) que en el cultivo en lote. Se observó que al realizar el cultivo alimentado con aguamiel de diferentes regiones (Nanacamilpa, Tlaxcala y Delegación Milpa Alta) los resultados obtenidos fueron similares.

2. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados son aquéllos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y actividad de microorganismos (García, 1993). Estos alimentos forman parte de la dieta de muchos grupos étnicos, que los han consumido desde tiempos inmemoriales. Entre las bebidas autóctonas de México se encuentra el pulque, que es una bebida alcohólica que se obtiene por fermentación natural de aguamiel (secreción azucarada de varias especies de magueyes pulqueros), es consumida como bebida embriagante y complemento dietético por indígenas y mestizos en las regiones del país en donde crecen dichos magueyes (Ulloa, 1982). A la fecha se conoce una variada microbiota del pulque, sin embargo se han determinado algunos microorganismos como esenciales para su elaboración: *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Lappe, 1993).

Desde 1970 *Zymomonas mobilis* ha sido objeto de un interés creciente para la producción de etanol por su tolerancia a altas concentraciones de azúcar y etanol, lo que la hace competir con las levaduras tradicionalmente utilizadas en la producción de etanol (Leveau, 2000).

Actualmente se pretende desarrollar una bebida similar al pulque mediante la fermentación de aguamiel pasteurizado, para eliminar flora microbiana no deseada, e inoculado con microorganismos aislados del mismo, incluyendo la bacteria *Zymomonas mobilis*, la cual participa en la producción de etanol. La producción de etanol durante la fermentación de aguamiel es baja y variable (Sánchez Marroquín, 1970), por lo que el objetivo principal de este proyecto es incrementar la concentración de etanol, seleccionando las mejores condiciones en: la propagación de *Zymomonas mobilis* para la preparación del inóculo (concentración y edad), así como en la fermentación en cultivo en lote y alimentado.

3. ANTECEDENTES

La fermentación de los alimentos es una práctica muy antigua presente en todas las culturas del mundo. Algunos de ellos, como la cerveza, el vino, los quesos y el pan han sido muy estudiados, se han aislado los microorganismos que producen los cambios deseados en sus materias primas y se consumen en cualquier parte del mundo. Algunos alimentos fermentados han trascendido sus fronteras de origen para convertirse en productos cotidianos en más de un continente, sin embargo aquéllos que se producen en forma artesanal o semicomercial, o bien para el consumo de culturas particulares, se denominan "tradicionales" (García,1993).

3.1 AGAVE

A través de la historia del México antiguo, mucho antes de que los españoles llegaran a América, el jugo de agave y la planta entera han sido parte importante de la cultura mexicana. En toda la región central de México, el altiplano y las zonas sureñas, desde tiempos inmemoriales, se ha producido y bebido el pulque. El agave, también llamado maguey, era considerado una planta sagrada en el México antiguo y ocupaba un lugar privilegiado tanto en la vida religiosa y ritual como en la mitología y la económica. Entre la mitología del maguey se cuenta la historia de la diosa Mayahuel, quien penetró en el maguey para hacer que brotara su "sangre", que es la materia prima esencial para producir tequila, mezcal y pulque. En antiguos códices se describe el gran aprovechamiento integral de agave así como su significado religioso, pues el jugo de agave se usaba en las ceremonias rituales "provocando en los devotos estados anímicos de euforia". El agave, sin embargo, no es exclusivo de México. Los españoles vieron la planta en las Antillas y la llamaron maguey, pero las diversas poblaciones indígenas tenían su propia denominación: en náhuatl *mell*, en purépecha *tacamba* y en otomí *guada*. El sueco Carl Von Linné lo bautizó mucho más tarde con el nombre de *agavus*, que en griego significa "admirable" (Blomberg, 2000).

Un maguey pulquero (*A. atrovirens*) pesa de una a dos toneladas y puede producir de 100 a 250 litros de aguamiel cada tres meses. Para la obtención de aguamiel debe

someterse a la planta a algunas operaciones anteriores a la floración. Se sabe que ésta se aproxima porque el cogollo, corazón o meyolote se adelgaza, las hojas externas pierden las espinas de los brotes en su parte inferior, los extremos de las pencas externas se doblan ligeramente hacia el centro de la planta y las púas terminales de las pencas y del cogollo se tornan más agudas y oscuras. Es preciso impedir la floración, cortando el “quioté” o brote floral, y dejar que se acumule la savia en la cavidad formada. A esta operación se le conoce como “castración” o “capazón”. Después viene el “añejamiento”. Durante esta etapa, que puede durar de seis a doce meses, las hojas centrales y el tallo alcanzan su máximo desarrollo y el aguamiel se concentra y aumenta su contenido de azúcares. Cuando aparecen manchas en las hojas de la planta, el maguey llega al añejamiento conveniente. Se procede entonces a la “picazón” (abrir en el centro del corazón una cavidad en la que se acumula el aguamiel) raspa los tejidos blandos para que no se detenga la salida del líquido y cubre la entrada con pedazos de penca de la propia penca. La “raspa” o “metzal” se efectúa con una cuchara elíptica, se limpia la cavidad; se extrae la raspadura que quedó dentro de ella y se abren los vasos de la planta para que fluya el aguamiel al cabo de uno o dos días. El raspado se repite a los ocho días, o antes si es necesario. La recolección del aguamiel se realiza todos los días, en la mañana y en la tarde (y cuando llueve también en el mediodía, para que el agua no la diluya demasiado). En cada extracción se repite la “raspa”. Cuando la raspadura es muy gruesa, el aguamiel tiende a ser de mala calidad, el tiempo de producción disminuye y se llega más pronto al fondo del corazón. A medida que se extrae el aguamiel, la planta absorbe sustancias del suelo y continúa la acumulación de savia. Un maguey puede explotarse cuando tiene más de cinco y menos de ocho años de vida, produce hasta siete litros diarios de aguamiel, durante tres meses y después se agota (Anónimo, Comercio Exterior, 1982).

3.2 PULQUE

El pulque (de náhuatl **polihuqui**, que significa podrido o descompuesto) es una bebida alcohólica que se obtiene por fermentación de aguamiel, que es la secreción

azucarada de varias especies de magueyes pulqueros, principalmente *Agave atrovirens karw.* Esta bebida típica de México es consumida por la población indígena y mestiza en muchas regiones del país, particularmente en los lugares en donde pueden ser cultivados los magueyes mencionados (Lappe, 1993).

El proceso de elaboración del pulque, que en forma tradicional ha sido pasado hasta la época actual, presenta variaciones de acuerdo con el grupo étnico involucrado. Generalmente el aguamiel, también llamado *tlachique*, es extraído de los magueyes por los tlachiqueros, nombre que se da a las personas que succionan el aguamiel con un guaje o acocote, hecho del fruto seco de calabaza. El aguamiel es entonces transportado dentro de recipientes peculiares, hechos de piel de becerro o de cerdo, para posteriormente ser vaciados en recipientes llamados tinacales, donde se realiza una fermentación espontánea durante unas horas o hasta varios días. La principal fuente de microorganismos se encuentra en las paredes de los tinacales que son utilizados en las sucesivas fermentaciones del aguamiel para convertirlo en pulque. Además del pulque común, existe una variedad de los llamados pulques curados, los cuales son elaborados de forma similar pero acondicionando diversos vegetales, principalmente frutas, así se tienen pulques curados de apio, guayaba, piña, fresa, etc. (Ulloa, 1982).

El pulque constituye además de una bebida embriagante, un complemento importante para la dieta diaria de grandes grupos de población, particularmente de recursos económicos escasos, ya que el costo de esta bebida es también relativamente modesto, comparado con el de otras bebidas de bajo contenido alcohólico, como la cerveza, que son elaboradas a nivel industrial y con un control de calidad más riguroso. Al inicio de la época colonial se establecieron tabernas o sencillos despachos para el pulque (pulquerías) donde se vendía y consumía el zumo fermentado del agave. Las pulquerías eran diferentes de los establecimientos donde se bebía vino y se reunían las familias (vinaterías). De esta manera todos los grupos sociales y cada raza tenían su propio lugar donde se encontraban y bebían.

La producción y la venta de pulque alcanzaron sus niveles más altos a fines del siglo XIX y principios del actual. El pulque se producía principalmente en el altiplano de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Estado de México. El pulque comenzó a perder su

importancia en el año 1928, debido sobre todo a la introducción y elaboración de la cerveza en México. Otra de las razones fue que para comercializarlo en la ciudad de México y otras poblaciones era adulterado. En 1946 en una población localizada en el Valle de Zempoala, Santa María de Tecajete, en el estado de Hidalgo, se intentó producir el pulque en gran escala con el fin de lanzar al mercado un pulque enlatado llamado *Magueyín*. Esto fue un fracaso ya que al llegar a las tiendas el producto se encontraba en estado de descomposición (Blomberg, 2000).

Posteriormente en los años 60's se efectuaron experimentos para buscar una tecnología sobre bases científicas para la elaboración de pulque. Estas no alcanzaron el éxito deseado debido principalmente a dos causas: a) dificultad en el manejo simultáneo de las tres fermentaciones que acontecen durante la transformación del aguamiel en pulque, b) la extrema variabilidad de la composición del sustrato o sea, el aguamiel utilizada en la fermentación, lo que explica en parte la inconstancia de las características fundamentales de la bebida. Después de diversos experimentos basados en los anteriores problemas, en una planta piloto de la Facultad de Química (UNAM) se llevó a cabo la elaboración de pulque a nivel fermentador. El producto técnicamente elaborado correspondió a las normas de los pulques finos de tinacal, además de haber reunido las condiciones organolépticas preferidas por el consumidor. (Sánchez Marroquín, 1970)

En la actualidad existe una sola fábrica que produce pulque enlatado. La empresa llamada Bebidas Naturales San Isidro, ubicada en Nanacamilpa, Tlaxcala, inició la producción de esta bebida en 1994. La pequeña compañía tiene una capacidad de producción de 100000 litros de aguamiel al mes y 10000 litros de pulque. Se producen curados de varios sabores que son exportados a Estados Unidos (Blomberg, 2000).

El pulque ha sido estudiado por más tiempo en el aspecto microbiológico. Los primeros estudios realizados en México sobre esta bebida fueron de carácter histórico, social étnico y médico, hasta finales del siglo XIX, en que se iniciaron las investigaciones microbiológicas y químicas. En 1864, Río de la Loza realizó la primera observación del pulque al microscopio. Creyó ver cúmulos de sustancias albuminoides pero no microorganismos. En 1870, José Barragán describió las primeras levaduras aisladas del pulque, a las que identificó como especies del genero *Cryptococcus*. Este estudio

fue notable, pues en aquella época estaban realizándose investigaciones similares en otros países con mayor tradición científica. En 1892, Fernando Altamirano señaló que el aspecto opalino del pulque se debía a la presencia de multitud de bacterias suspendidas en el mucílago. Este trabajo es importante ya que es el primero que reconoce las bacterias, microorganismos que después serían objeto de estudios más detallados.

En 1886, Angel Gaviño logró aislar una levadura rosa, probablemente una especie de *Rhodotorula* y varias especies de bacterias, cocos, diplococos y bacilos. En 1901, este mismo autor presentó un trabajo sobre microorganismos del pulque y describió a la levadura *Saccharomyces cerevisiae agavica* y a la bacteria *Bacterium aceti*. En ese mismo año Antonio Carvajal aisló las bacterias *Micrococcus luteus*, *M. translucidus*, y las levaduras *S. cerevisiae agavica silvestre*, a la que consideró el agente principal de la fermentación alcohólica del pulque y *Torula rosada*, de esta pensó que era una levadura contaminante. Posteriormente describió la bacteria *Bacterium aceti*.

Durante 15 años el estudio microbiano del pulque quedó en completo olvido y no fue sino hasta 1916 cuando el profesor Miguel Cordero se ocupó de nuevo de este tema. A partir del aguamiel aisló varias levaduras, que fueron identificadas por el investigador francés Guilliermond en los géneros *Pichia* y *Saccharomyces*, sin indicar especies.

Siete años más tarde, Paul Lindner, del Instituto de Fermentaciones de Berlín, realizó una estancia de dos años en México con objeto de estudiar los problemas relativos a la fabricación científica del pulque. Como resultado de dichos estudios, en 1926 se publicaron los trabajos *Importancia práctica y científica del estudio del pulque y Mejoras para el empleo del aguamiel*; además, se identificaron las bacterias *Bacterium iridescens* y *B. vermiforme*. De 1928 a 1932, el mismo investigador realizó importantes estudios bacterianos y describió las especies *Diplobacter viscosus*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus major*, *P. minor*, *S. corrosus*, *Sarcina corrosa* y *Termobacterium mobile*. En 1931, Fernández de Tagle presentó el estudio de las vitaminas y de la fermentación viscosa en el pulque y señaló a *Leuconostoc mesenteroides* como el microorganismo responsable de la fermentación viscosa. En 1932, Gerardo Varela describió dos especies de *Escherichia*, *E. wekanda* y *E. formica*, procedentes del pulque, y realizó un análisis interesante sobre la calidad higiénica de la bebida.

De 1936 a 1942 Ruíz Oronoz estudió las levaduras del pulque y describió las especies *Saccharomyces carbajali*, *Pichia barragni*, *Torulopsis hydromelitis*, *T. aguamellis* y *Rhodotorula incamata* como nuevas. A partir de 1942 el grupo de trabajo de Alfredo Sánchez Marroquín realizó estudios sobre la microbiología del pulque y la actividad metabólica de las diversas especies de microorganismos. Dicho grupo reconoció las especies *L. dextranicum* y *L. mesenteroides* como parte de la biota normal del pulque, y publicó ocho comunicaciones en la serie titulada **Microbiología del pulque**.

En 1948 Pedro Brechtel presentó un estudio bacteriológico del aguamiel y del pulque, describió las especies *Micrococcus candidus*, *M. roseus*, *M. ruizii*, *Sarcina flava* y *Bacillus teres*.

Continuando con sus estudios sobre la microbiología del pulque, en 1962 Sánchez Marroquín presentó un análisis de los estudios realizados durante 92 años sobre este tema, este trabajo incluyó estudios sobre el metabolismo de cinco nuevas especies de levaduras, registradas por Ruíz Oronoz, tres de las cuales consideró sinónimos de otras especies: *Saccharomyces carbajali* (*S. cerevisiae*), *Pichia barragani* (*Pichia membranaefaciens*), y *Torulopsis hydromelitis* (*Candida parapsilosis*). En 1977 este mismo autor señaló que los microorganismos esenciales en el proceso de la fermentación del pulque eran diversas especies de *Leuconostoc*, principalmente *L. dextranicum* y *L. mesenteroides*, Lactobacilos homolácticos y heterolácticos, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. A las especies de *Leuconostoc* las consideró responsables de la viscosidad de la bebida, debido a la producción de dextranas. A los lactobacilos homofermentativos y heterofermentativos les adjudicó la mayor producción de ácido láctico y acético, a *Zymomonas mobilis* y *S. cerevisiae* los consideró como los organismos productores de alcohol. Sin embargo según sus apreciaciones, el microorganismo clave de la fermentación del pulque era *Zymomonas mobilis* ya que además de transformar la glucosa en alcohol, producía ácido láctico, acetil carbinol y presentaba una acción antimicrobiana contra coliformes y algunos hongos filamentosos, que en cierta forma explicaba las propiedades medicinales del pulque.

En 1989 con el objeto de contribuir al conocimiento más detallado de las levaduras del pulque y determinar las especies más constantes en el producto fermentado, Lappe y

colaboradores estudiaron 21 levaduras obtenidas de pulque de diversas localidades. Determinaron como especies constantes a *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Pichia carsonii* y *Candida guilliermondii* como nuevos registros para el pulque.

En 1990 Herrera y Calderón Villagómez estudiaron las levaduras del pulque natural y del pulque curado con avena, registraron por primera vez, para el pulque natural, las especies *Candida colliculosa*, *C. rugosa*, *C. rugopelliculosa*, *K. marxianus* var. *lactis*, *S. cerevisiae* razas *aceti* y *globosus*. Estas mismas especies, con excepción de *C. colliculosa*, fueron encontradas en el pulque curado con avena (Lappe, 1993).

Aunque a la fecha se conoce una variada microbiota del pulque y se han determinado algunos microorganismos como esenciales para la elaboración de la bebida, se desconoce si existe o no una sucesión en la microbiota a lo largo del proceso de fermentación.

3.3 AGUAMIEL

3.3.1 Definición

Es la materia prima para la elaboración del pulque; es la savia azucarada del maguey. Si proviene de magueyes de la variedad mansos, es un líquido azucarado, incoloro, transparente, con cierto olor herbáceo y sabor dulce agradable. El aguamiel producido por magueyes de especies más corrientes y aquéllos que se cosechan en terrenos húmedos de clima templado, son opalinos o blanquecinos, mucilaginosos y en ellos el sabor dulce es menor, hasta llegar a ser, en algunos casos insípido (Loyola, 1956).

3.3.2 Usos

El empleo principal que se da al aguamiel es la elaboración del pulque aunque se ha llegado a utilizar para preparar jarabes y mieles, pero la cantidad utilizada para estos fines es insignificante. Su consumo como bebida es el único uso importante que tiene el aguamiel, aparte de la elaboración del pulque, y para tal fin se toma en su estado

natural en lugar del agua. Para aprovechar las propiedades curativas que se le atribuyen, la gente del campo la consume frecuentemente en ayunas y en dosis pequeñas. Tiene también cierto poder laxante (Loyola et al, 1956).

Los azúcares y componentes del aguamiel también sirven como sustrato para otras fermentaciones (láctica y cítrica) y como medio inicial para diversos procesos de biosíntesis, como la producción de vitaminas, giberelinas, dextranas, aminoácidos, etc (Anónimo, Comercio Exterior, 1982).

3.3.3 Composición química y características físicas

Los únicos datos químicos y físicos del aguamiel y del pulque son los reportados por Cravioto-Massieu y colaboradores (1978), los cuales se presentan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Composición química del aguamiel y pulque (Cravioto- Massieu et al 1978).

COMPONENTES (%)	AGUAMIEL	PULQUE
Humedad	94	97
Cenizas	0.4	0.2
Proteína	0.3	0.44
Calcio*	20	10
Fósforo	-	0.7
Hierro*	0.02	0.02
Tiamina*	0.03	0.02
Riboflavina*	0.03	0.02
Niacina*	0.4	0.3
Ac. Ascórbico*	6.7	6.2

*Determinados en mg.

Tabla 2. Características físicas de aguamiel y pulque (Cravioto-Massieu et al., 1978).

AGUAMIEL	PULQUE
Líquido azucarado	Color blanco
Incoloro	Viscoso
Ligeramente ácido	Contenido de alcohol 4-6%
Transparente	PH 3,5 a 4,0
Olor herbáceo	Azúcares reductores totales 0.2-0.5%
Sacarosa 5-11%	

Como se mencionó anteriormente, *Zymomonas mobilis* es uno de los microorganismos responsable de la producción de etanol en la elaboración del pulque a partir de aguamiel, además de tener varias ventajas sobre las levaduras comúnmente utilizadas para la producción de etanol.

3.4 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis fue descubierta como contaminante durante la producción de sidra en 1912. Su eficiencia para la producción de alcohol es conocida desde 1931 gracias a los estudios de Kluyver y Hoppenbrouwers. En los años 60 fue utilizada a nivel industrial para la producción del pulque, obtenido por fermentación en cocultivo con *Lactobacillus sp.* y *Leuconostoc mesenteroides* (Sánchez Marroquín, 1957). Debido a su morfología y al hecho de metabolizar su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff, *Zymomonas mobilis* ha sido clasificada dentro de la familia de las *Pseudomonadaceae*. Utilizando criterios taxonómicos relacionados con más de cuarenta cepas, Swings y Deley propusieron una clasificación que agrupa a todas las cepas de *Zymomonas* en una especie (*Zymomonas mobilis*) y dos subespecies: *Zymomonas mobilis mobilis* y *Zymomonas mobilis pomaceae*. La mayor parte de las cepas pertenece a la subespecie *mobilis* (Gunasekaran, 1997). Algunas características del género *Zymomonas* se resumen en la tabla 3.

Zymomonas mobilis es una bacteria quimiorganótrofa que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio y en algunos casos por la biotina. El nitrógeno es necesario para

su crecimiento, y se le proporciona por medio de sales minerales, aminoácidos o péptidos. Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria, el azufre, magnesio y potasio son proporcionados en forma de sales. Los oligoelementos (Mo, Fe, Zn, Mn, etc.) necesarios al metabolismo de la bacteria se encuentra en estado de trazas en las sales utilizadas para la preparación del medio de cultivo (Swing, 1977).

Tabla 3. Características fenotípicas de *Zymomonas* (Demain, 1985).

- 1.- Bacilo gramnegativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo.
- 2.- Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos.
- 3.- Arreglo celular pleomórfico (cadenas, rosetas, filamentos).
- 4.- Ausencia de esporas, de cápsulas y de constituyentes de almacenamiento celular.
- 5.- Catalasa positiva y oxidasa negativa.
- 6.- Anaeróbico y microaerófilico.
- 7.- Las únicas fuentes de carbono que metaboliza son: glucosa, fructosa y sacarosa.

3.4.1 Metabolismo de sacarosa, glucosa y fructosa

Zymomonas mobilis puede producir 1.9 mol de etanol por 1 mol de glucosa fermentada por la vía modificada de Entner-Doudoroff, generalmente utilizada por los organismos aerobios estrictos (Doelle, 1985). Desde el punto de vista energético *Zymomonas mobilis* ha sido considerada ineficiente para producir biomasa, ya que una sola molécula de ATP es producida por cada molécula de monosacárido metabolizada. Sin embargo, si se considera la producción de etanol, esta bacteria representa un reactor biológico muy eficaz (Demain, 1985).

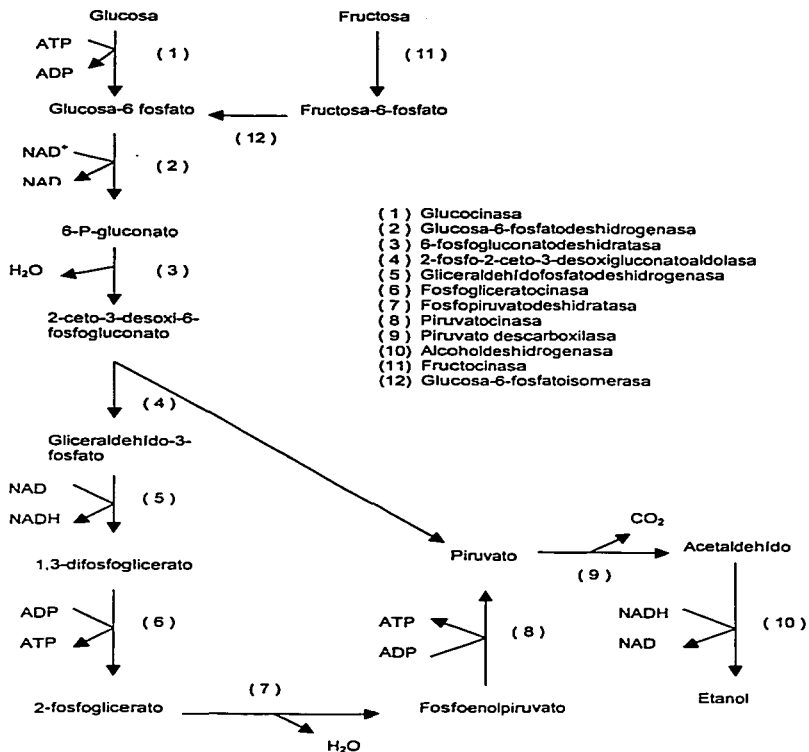


Figura 1. Vía metabólica de degradación de sustrato de Entner-Doudoroff (Sprenger, 1996).

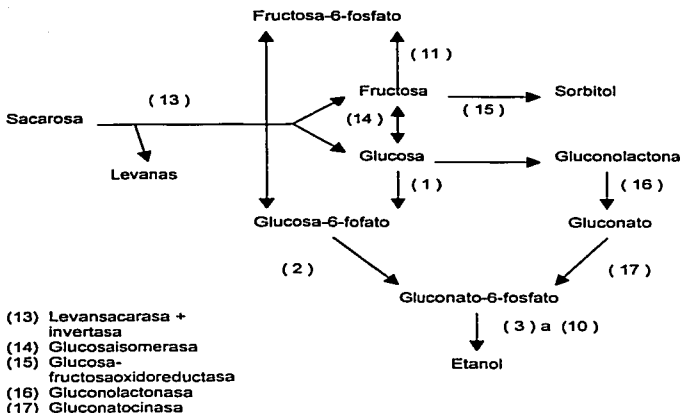


Figura 2. Vía metabólica de producción de etanol a partir de sacarosa (Sprenger, 1996).

Dependiendo del sustrato carbonado a utilizar existen dos vías de oxidación del sustrato:

- Cuando el sustrato es glucosa o fructosa, el etanol y el CO₂ son los productos mayoritarios de la fermentación (Figura 1).
- Cuando el sustrato es la sacarosa, levanas y sorbitol también se producen (Figura 2). Cuando la fuente de carbono está constituida por una mezcla de glucosa y de fructosa puede producirse sorbitol (Viikari, 1986).

Las enzimas implicadas en la utilización directa de los azúcares y las enzimas responsables de la formación de etanol a partir del piruvato, han sido más estudiadas. Cuando *Zymomonas mobilis* crece en sacarosa se da una conversión del disacárido en glucosa y fructosa usando tres enzimas: una levansacarasa extracelular (Lev U), la cual

forma oligosacáridos de fructosa, levanas y glucosa; una invertasa extracelular (Inv B) que forma glucosa y fructosa y una segunda invertasa (Inv A) de la cual no se tiene claro su papel (Sprenger, 1996).

Las enzimas responsables de la fosforilación de la glucosa (glucocinasa) y de la fructosa (fructocinasa), son proteínas altamente específicas para con sus sustratos. Aunque la síntesis de ambas enzimas es constitutiva, su actividad se ve estimulada en presencia de sus respectivos sustratos. La glucocinasa se inhibe en presencia de glucosa-6-fosfato y de nucleótidos (AMP,ADP, ATP, UTP, ITP y CTP). La fructocinasa se inhibe por la glucosa y por la glucosa-6-fosfato. Aparentemente cuando la glucosa y la fructosa están presentes en el medio de cultivo, la fructocinasa se regula por la glucosa, mientras que la glucocinasa está bajo control de nucleótidos (Lee, 2000).

La formación de 6-P-gluconato a partir de glucosa-6-fosfato ó de fructosa-6-fosfato es catalizada por la acción de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. En el caso de la fructosa-6-fosfato, es necesaria la acción previa de una isomerasa.

Cuando la glucosa y la fructosa están presentes en concentraciones elevadas, la formación de sorbitol y de una gluconolactona es catalizada por una glucosa-fructosaoxidorreductasa. La gluconolactona formada es un compuesto muy inestable que es rápidamente transformado en gluconato por la acción de una gluconolactonasa. El gluconato-6-fosfato es formado por fosforilación del gluconato por una gluconatocinasa.

Zymomonas mobilis no crece en presencia de gluconato como única fuente de carbono, la actividad gluconatocinasa interviene solamente cuando el gluconato y el sorbitol son formados por la acción de una oxidorreductasa.

La 6-fosfogluconato-deshidrogenasa es un dímero que contiene tres átomos de hierro en cada subunidad. El glicerofosfato (análogo del 6-fosfogluconato) y el fosfato inorgánico actúan como inhibidores competitivos para esta enzima. La acción catalizada por esta enzima es irreversible y puede tener un papel muy importante en el control del metabolismo.

La formación de gliceraldehído-3-fosfato y de piruvato por rompimiento del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato es catalizada por una aldolasa (2-ceto-3-desoxi-6-

fosfogluconatoaldolasa). Debido a la reversibilidad de la reacción, el exceso de esta enzima podría asegurar la hidrólisis de la hexosa.

La piruvato Descarboxilasa es una enzima presente solamente en algunas especies bacterianas. En *Zymomonas mobilis* el papel de esta enzima y el de la alcoholdehidrogenasa es muy importante, ellas son responsables de la transformación del 95% del piruvato producido, en etanol y CO₂ (Gunasekaran, 1997). Aunque haya una gran similitud entre la piruvato Descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* y la de las levaduras, la actividad específica de las enzimas bacterianas es cinco veces mayor a la de las levaduras. En los dos casos, magnesio y ATP son necesarios para la actividad de la enzima. Generalmente las enzimas responsables de la formación de etanol a partir de los azúcares, tienen actividades específicas elevadas, al igual que cierta tolerancia al último compuesto de la cadena catabólica, el etanol (García, 1993).

3.4.2 Estructura y composición de la membrana celular

La membrana celular de *Zymomonas mobilis* es característica de las bacterias gramnegativas, ésta comprende una membrana externa, una membrana interna y la mureína. Los fosfolípidos principales de *Zymomonas mobilis* están representados por la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol y el difosfatidilglicerol. También están presentes la fosfatidilcolina y la fosfatidildimetiletanol-amina, ambos fosfolípidos están raramente presentes en las bacterias gramnegativas (Demain, 1985).

La proporción de ácidos grasos insaturados y principalmente del ácido cisvaccénico es elevada (70-80% de los ácidos grasos totales). También se ha demostrado la presencia de hopanoides (30% del total de los lípidos celulares), cuya estructura es muy similar a la de los esteroides, y que juegan un papel muy importante para la estabilidad de la membrana en concentraciones elevadas de etanol y oxígeno. Los tres principales hopanoides de *Zymomonas mobilis* son: THBH (tetrahidroxibacteriohopanotetrol), THBH-GA (tetrahidroxibacteriohopano-glucosamina) y THBH-ET (tetrahidroxihopano-eter) (Moreau et al., 1997).

3.4.3 Estudios de *Zymomonas mobilis* en cultivos por lotes

Los estudios de Rogers y cols. en 1979 mostraron el interés de la utilización de *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol. La tabla 4 resume los resultados obtenidos durante un estudio comparativo de la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* y por la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* a partir de un medio con concentraciones elevadas de glucosa.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces carlsbergensis* (Roger, et al, 1979).

PARAMETROS	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
μ (1/h)	0.13	0.055
q_s (g/g h)	5.5	2.1
q_p (g/g h)	2.5	0.87
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.029	0.033
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.47	0.44
Etanol máx (g/l)	102	108

μ : Velocidad específica de crecimiento.

q_s : Velocidad específica de consumo de sustrato. q_p : Velocidad específica de producción de etanol.

$Y_{p/s}$: Rendimiento de etanol. $Y_{x/s}$ Rendimiento de biomasa.

Algunas ventajas de *Zymomonas mobilis* sobre la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* son:

- Velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de etanol elevadas.
- Rendimiento de etanol superior y rendimiento de biomasa inferior.
- No necesita aporte de oxígeno.
- Mayores posibilidades de manipulación genética.

3.4.3.1 Sustrato

Algunas cepas de *Zymomonas mobilis* pueden crecer en medios con concentraciones muy elevadas de azúcares. De las cepas estudiadas por Swing y Deley (1977), veintidós crecieron en medios con 400 g/l de glucosa. Todas las cepas crecieron en presencia de 200 g/l de glucosa. El aumento de la concentración inicial de azúcares tiene un efecto más importante sobre los parámetros relacionados con el crecimiento (μ y $Y_{x/s}$) que sobre aquéllos relacionados con la producción de alcohol (Q_p y $Y_{p/s}$). A partir de resultados obtenidos con diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* se pudo estimar que el carbono incorporado a la biomasa varía entre 0.5 y 4.5% de la fuente inicial de carbono, el resto es utilizado para la formación de los productos de la fermentación (Demain, 1985). Aunque la mayor parte de la fuente carbonada es utilizada para la producción de etanol y CO_2 , se forman cantidades no despreciables de subproductos en presencia de sacarosa o de mezclas de glucosa y fructosa. A partir de sacarosa la formación de levanas y de sorbitol provoca una disminución de hasta el 20% en el rendimiento de producción de etanol en comparación con el obtenido con glucosa. Cuando la fructosa es utilizada como fuente de carbono, los subproductos pueden representar hasta un 9% de la fuente de carbono inicial, mientras que a partir de glucosa éstos representan un máximo de 4%. Por lo tanto, la glucosa podría ser el sustrato ideal para la producción de alcohol por *Zymomonas mobilis*, sin embargo la formación de subproductos también depende de factores como son: temperatura, pH, aireación, tipo de cultivo, etc. (García, 1993).

Se ha determinado que con una concentración de 200g/l de sacarosa puede obtenerse 95.5 g/l de etanol, lo que corresponde a un rendimiento de 0.47 (Doelle, 1985).

3.4.3.2 Temperatura

Zymomonas mobilis es capaz de crecer en una gama de temperaturas de 25 a 40° C, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 35°C. A temperaturas superiores a 30°C, los rendimientos de etanol y biomasa se ven más afectados

(Leveau, 2000). La temperatura tiene un efecto muy importante sobre la composición y fluidez de la membrana celular. A altas temperaturas la concentración de fosfolípidos disminuye. Contrariamente a *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* es incapaz de mantener constante la fluidez de la membrana al ser cultivada a diferentes temperaturas. A altas temperaturas la fluidez disminuye proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos insaturados. El aumento de la temperatura induce la acumulación de etanol en el interior de las células, lo que amplifica su efecto inhibitorio (Swing, 1977).

3.4.3.3 Etanol

De las cepas estudiadas por Swing y Deley, todas crecieron en presencia de 55 g/l de etanol adicionado al medio de cultivo, mientras que solo 12 cepas pudieron desarrollarse en presencia de 100 g/l de alcohol adicionado. De igual manera que la temperatura tiene un efecto muy importante en la composición de la membrana celular, un aumento de la permeabilidad de la membrana en presencia de elevadas concentraciones de etanol provoca la fuga de cofactores necesarios para ciertas actividades enzimáticas (Jobses, 1985). Estudios realizados sobre el efecto del etanol adicionado al medio de cultivo y del producido por *Zymomonas mobilis* mostraron que en ambos casos, su efecto inhibitorio fue más importante sobre el crecimiento que sobre su producción (García, 1993).

3.4.3.4 pH

Dependiendo de las cepas, *Zymomonas mobilis* puede crecer en una amplia gama de valores de pH, desde 3 hasta 7. De las cepas estudiadas por Swings y Deley (1977) alrededor de 20 pudieron crecer a valores de pH de 3.5. Tradicionalmente, valores de pH de 5.0 a 6.5 se han usado para estudiar el metabolismo de *Zymomonas mobilis*, pero el hecho de que la bacteria pueda crecer a valores de pH inferiores a 5 la hace interesante desde el punto de vista biotecnológico, ya que los riesgos de contaminación pueden ser reducidos considerablemente. Doelle y Greenfield (1985) constataron que

en condiciones particulares de temperatura y pH, la formación de levanas y de sorbitol puede ser reducida considerablemente al utilizar sacarosa como fuente de carbono.

3.4.3.5 Oxígeno

Aunque *Zymomonas mobilis* puede crecer en aerobiosis, el oxígeno tiene un efecto negativo sobre la producción de alcohol. Este induce la formación de subproductos de la fermentación; acetato, acetaldehído y lactato (Demain, 1985). Estudios realizados por Moreau (1997) han demostrado que *Zymomonas mobilis* es más tolerante al etanol en condiciones de anaerobiosis. Aparentemente el efecto inhibitorio está ligado a la concentración del sustrato. Para concentraciones de sustrato bajas la tasa de crecimiento (μ) y el rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$) son independientes de la presencia de oxígeno. Por el contrario, en presencia de concentraciones elevadas de azúcares, los parámetros relacionados con el crecimiento (μ y $Y_{x/s}$) disminuyen en presencia de oxígeno, con una reducción de 25% del rendimiento de etanol en comparación con el rendimiento obtenido en anaerobiosis. El hecho de que *Zymomonas mobilis* no necesite de oxígeno para su crecimiento representa una gran ventaja cuando se trata de la producción de etanol a escala industrial (García, 1993).

3.4.4 Estudios de *Zymomonas mobilis* en cultivo alimentado

Aunque *Zymomonas mobilis* puede convertir eficiente y rápidamente a etanol concentraciones de 100 a 250 g/l de glucosa, a concentraciones de 200 g/l se da una disminución de la velocidad específica de crecimiento, rendimiento celular, rendimiento de etanol y un aumento en el tiempo de la fermentación. Por lo anterior para obtener una alta concentración de etanol se ha utilizado el cultivo alimentado, llegando a una concentración total de 200g/l de glucosa consumida, obteniéndose una concentración final de etanol de 87 g/l. En este tipo de cultivo se alimenta, continua o intermitentemente la fuente de carbono sin la eliminación del cultivo crecido, reduciendo el tiempo de fermentación y la inhibición de *Zymomonas mobilis* por sustrato. (Jobses et al., 1986; Siva et al., 1995; Trevan et al., 1990).

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener el máximo rendimiento y la máxima productividad de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de aguamiel.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las mejores condiciones para la preparación del inóculo.
- Seleccionar una fuente de carbono que adicionada a un cultivo alimentado incremente la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de aguamiel.
- Determinar las condiciones del cultivo en lote para incrementar la producción de etanol.
- Obtener la menor producción de polímeros para que la fuente de carbono sea utilizada principalmente para la producción de etanol.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Microorganismo empleado

5.1.1. *Zymomonas mobilis*

Se utilizó una cepa aislada de pulque(*Zymomonas mobilis* CDBB B-000603, adquirida de la colección de cultivos microbianos del CINVESTAV-IPN), conservada en perlas de vidrio y almacenada en ultracongelador a -70°C .

5.1.2 Pureza de *Zymomonas mobilis*

Se realizó tinción gram y se observó la morfología de sus colonias sembrando por estría en medio MYC (Apéndice 1).

5.1.3 Reactivación de *Zymomonas mobilis*

Se sembró una perla de vidrio del cultivo almacenado a -70°C en 5 ml de medio MYC, incubado a 30°C por 48 h. Posteriormente se realizó una resiembra de 5 ml de cultivo en 50 ml de medio MYC, incubando a 30°C por 48 h.

5.2 Sustrato

Se utilizó aguamiel obtenido de Nanacamilpa, Tlaxcala y de la delegación Milpa Alta, pasteurizada (equipo Elecrem) a 75°C durante 5 minutos y almacenada a -10°C .

5.3 Preparación del inóculo

Se pasteurizó aguamiel (7% sólidos totales) en un equipo elecrem a 75°C por 5 minutos. Con la cepa activa (4.1.3) se inocularon al 6%(VM): a) 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L, sin agitación; b) 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L, con agitación (200 rpm) y c) 450 ml de aguamiel en matraz de 500 ml, con agitación (200 rpm). Todos incubados a 30°C por 48 h. Se tomó una muestra de 5 ml cada 3 h.

5.4 Selección de una fuente de carbono para la producción de etanol en cultivo alimentado

Se utilizaron 7 matraces de 500 ml con tapón de rosca, cada uno con 300 ml de aguamiel (9% sólidos totales) pasteurizado y se adicionó a cada matraz un azúcar diferente: a) 5.4 g de azúcar blanca (comercial), b) 5.4 g de azúcar morena (comercial), c) 5.4 g de sacarosa (Bioxon cat. 217000), d) 5.4 g de dextrosa (grado alimentario, Arancia), e) 5.4 g de fructosa (grado reactivo, Merck), f) 40 ml de jarabe de fructosa (55% fructosa y 45% glucosa, grado alimentario, Arancia) y g) azúcar invertido (59% de hidrólisis, grado alimentario, Química Barsa), respectivamente. Todos los matraces se ajustaron a un 10% de sólidos totales, se inocularon al 6% (v/v) y se incubaron a 30°C por 48 h con 200 rpm de agitación. Se tomaron muestras de 5 ml cada 12 h.

5.5 CULTIVOS

5.5.1 Inóculo

Se colocaron 600 ml de aguamiel pasteurizado en un matraz de 1 L, inoculado con un 6% (V/V) de la cepa activa de *Zymomonas mobilis*. Se incubó a 30°C durante 20 h, con 200 rpm de agitación.

5.5.2 Producción de etanol por cultivo en lote

Se colocaron 3 L de aguamiel pasteurizada en un fermentador (New Brunswick Scientific). Se adicionó un 6% (V/V) de inóculo, manteniendo la temperatura de 30°C por 48 h, con agitación de 200 rpm y para tener condiciones de anaerobiosis se suministró un flujo de 1.5 L /min. de CO₂ durante las primeras 6 h. Se tomaron muestras de 20 ml cada 3 h

5.5.3 Producción de etanol por cultivo en lote alimentado

A) Con una alimentación: Se colocaron 3 L de aguamiel pasteurizada (9% sólidos totales) en un fermentador, inoculado al 6% (v/v). Se incubó a 30 °C por 48 h, agitando a 200 rpm. y en condiciones de anaerobiosis, para lo cual se suministró CO₂ (1.5 L/min.) durante las primeras 6 h. Se realizó un

seguimiento del consumo de azúcares reductores durante la fermentación donde se determinó el tiempo en que la fuente de carbono se agotó y se inició la alimentación con jarabe de fructosa. La cantidad de jarabe de fructosa que se adicionó fue proporcional a la cantidad máxima de hidrólisis de la sacarosa que se obtuvo en el cultivo por lotes (36 g/l), lo que se registró en las primeras horas de la fermentación. Se alimentó con 115 ml de jarabe de fructosa (Arancia) previamente pasteurizado por 5 minutos a 75°C. Se tomó muestra de 20 ml cada 3 h. Se realizaron los mismos análisis que en la fermentación por lotes.

B) Con dos alimentaciones: Para esta fermentación se siguió la misma metodología que con una alimentación, solo que en este caso se alimentó dos veces con 115 ml de jarabe de fructosa.

5.5.4 Producción de etanol a partir de aguamiel con 13% de sólidos totales en cultivo alimentado

Se tomaron 3 L de aguamiel pasteurizada (9% sólidos totales) al cual se le adicionaron 130 ml de jarabe de fructosa para alcanzar un 13% de sólidos totales. Las condiciones de inóculo y de incubación fueron las mismas que en el cultivo en lote. Se realizó una alimentación con 320 ml de jarabe de fructosa siguiendo el consumo de azúcares reductores para determinar el momento de iniciar el cultivo alimentado. La cantidad de jarabe de fructosa que se alimentó correspondió a la máxima hidrólisis de la sacarosa que se registró en la primera etapa de esta fermentación.

Esta fermentación también se llevó a cabo con aguamiel de la delegación Milpa Alta el cual contenía 13% de sólidos totales. Para partir de las mismas condiciones de sustrato que se tuvo con el aguamiel de Tlaxcala, se diluyó a un 9% de sólidos totales con agua de la llave estéril. Posteriormente se siguió la misma metodología que en el primer experimento.

5.5.5 Análisis

pH

Se tomaron 5 ml de muestra y se midió el pH en un potenciómetro Corning pH 430 (cat. 477965).

Porcentaje de sólidos totales

Se tomó una gota de la muestra y se colocó en un refractómetro Fisher 0-32%.

Densidad óptica

Se tomó un 1 ml de la muestra y se realizó una dilución 1:10, determinando densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5.

Determinación de etanol

La determinación de etanol presente en el medio se realizó con un kit enzimático (kit de Boehringer No. cat. 176290) (Apéndice 2).

Acidez titulable

Se tomaron 5 ml de la muestra, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se añadieron dos gotas de fenoftaleína como indicador (solución al 0.1 en etanol). Se tituló con una solución valorada de NaOH 0.1 N, hasta la aparición de un color rosado que permaneciera durante 30 segundos. Se calculó el contenido de acidez y se expresó como ácido láctico por 100 ml de muestra, utilizando el valor de 0.09 que representa los miliequivalentes de ácido láctico.

$$\% \text{de ácido láctico} = \frac{\text{ml gastados} \times N (\text{NaOH}) \times 0.09 \text{ meq de ácido láctico}}{\text{ml de muestra}} \times 100$$

Cuantificación de azúcares reductores

Se utilizó la técnica de DNS (Miller, G. L., 1959) para lo cual se colocó 1 ml de la muestra previamente diluida (1/100) en un tubo de ensayo. Se adicionó 1ml del

reactivo DNS se tapó y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se dejó enfriar y se agregaron 10 ml de agua destilada determinándose la absorbancia a 540 nm con un blanco de agua más reactivos en espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5). Se realizó una curva estándar con soluciones de 0.4 a 2.0 mg/ml de glucosa tratadas en las mismas condiciones que la muestra problema.

Cuantificación de azúcares totales

Se utilizó la técnica del fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956) para lo cual se colocó 1 ml de la muestra previamente diluida (1/ 1000) en tubo de ensayo y se adicionaron 0.6 ml de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclando perfectamente después de la adición. Posteriormente se adicionaron cuidadosamente 3.6 ml de ácido sulfúrico concentrado, mezclando perfectamente. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min.) Determinándose la absorbancia a 480 nm con un blanco de agua más reactivos en espectrofotómetro (Spectronic Genesis). Se realizó una curva estándar con soluciones de 20 a 100 µg de glucosa / ml tratadas de la misma forma que la muestra problema.

Cuantificación de polímeros

Se utilizó la técnica descrita por Trejo (1995). Se colocó 1 ml de la muestra en un tubo de ensayo y se agregó 0.166 ml de ácido tricloroacético al 80% se agitó y centrifugó a 3000 rpm por 20 min. Posteriormente 1ml de sobrenadante se mezcló con 1 ml de etanol absoluto dejándose reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 720 nm con un blanco de agua más reactivos en espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5). Se realizó una curva estándar con soluciones de 0.6 a 3.0 mg/ml de dextrana (40 KD, Pharmacia Biotech).

Cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa

Para la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se utilizó un sistema enzimático comercial Sacarosa/D-glucosa/D-fructosa (Kit de Boehringer No.

176290), el cual se basa en la determinación de D-glucosa antes y después de la hidrólisis enzimática de sacarosa; D-fructosa se determina subsecuentemente a la determinación de D-glucosa (Apéndice 2).

Curva estándar de peso seco

Para determinar la biomasa se realizó una curva de densidad óptica contra peso seco para lo cual se tomo 1 ml de muestra (crecimiento máximo) y se realizó una dilución 1:10. De esta dilución se tomaron de 0.1 a 1 ml llevándoles a un volumen total de 1 ml y se tomaron las lecturas de absorbancia a 540 nm.

Posteriormente de la muestra sin diluir se colocaron de 0.1 a 1 ml en tubos eppendorff, llevándolos a un volumen total de 1 ml con agua. Se centrifugaron a 4°C con 12000 r.p.m. por 15 min, se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado adicionando 1 ml de agua. Después de retirar el sobrenadante las muestras se colocaron en una estufa (THELCO GCA/PRECISION SCIENTIFIC) a 50°C por 24 h hasta peso constante. La curva se realizó por duplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

Preparación del inóculo

Para obtener la mayor concentración de biomasa en el inóculo se estudiaron diferentes condiciones de volumen de llenado de matraz con y sin agitación para conocer las mejores condiciones anaerobias para el crecimiento de *Zymomonas mobilis*: a) 600 ml de aguamiel en matraz de 1L, sin agitación; b) 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L, con agitación (200 rpm) y c) 450 ml de aguamiel en matraz de 500 ml con agitación (200 rpm).

En la Figura 3 se muestran los resultados del crecimiento expresado como biomasa (g/l) durante la fermentación de aguamiel por *Zymomonas mobilis* a diferentes condiciones de cultivo. Para las tres condiciones se observó una fase *lag* similar, de alrededor de 10 h. Durante la fase exponencial se observó un menor crecimiento con 600 ml de aguamiel en matraz de 1L, sin agitación donde se obtuvo un valor de biomasa de 1.99 g/l y el crecimiento fue similar en condiciones de agitación con 600 y 450 ml de aguamiel en matraz de 1L y 500 ml se obtuvieron valores de biomasa de 2.4 y 2.3 g/l respectivamente. Estos valores de biomasa son similares a los reportados por Abate (1996) para el cultivo de *Zymomonas mobilis* en 200 g/l de sacarosa donde se tiene un valor de 2.0 g/l. Para reducir la fase de adaptación de *Zymomonas mobilis* en la fermentación de aguamiel, es necesario tener una alta concentración de biomasa en la fase exponencial de su crecimiento donde se encuentra metabólicamente activa (Trevan, 1990). En este caso, la fase exponencial terminó alrededor de las 24 h, por lo que si incubamos nuestro inóculo por menos de 24 h con seguridad tendremos el mayor número de células metabólicamente activas.

Las Figuras 3 muestra los valores de porcentaje de sólidos totales, los que representan el consumo de azúcares durante la fermentación. Durante las primeras horas de fermentación no se dió una disminución considerable del porcentaje de sólidos totales en las tres condiciones debido a la adaptación de *Zymomonas mobilis* en el medio. De las 9 a las 21 h ocurrió el mayor consumo

de sólidos totales de 6 hasta 3% lo que coincidió con la fase exponencial de crecimiento. En las tres condiciones el pH disminuyó de 8 hasta 5 (Figura 3), lo que se atribuye a la producción de ácido láctico por *Zymomonas mobilis* (Lappe, 1993).

La agitación tiene un efecto positivo en el crecimiento, puesto que se obtuvo un crecimiento de 1.0 g/l menor que cuando no se agitó (Figura 3). Esto puede deberse a que con la agitación se da una mayor disponibilidad de los nutrientes del medio para ser utilizados por *Zymomonas mobilis*. Se seleccionó la condición con 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L con agitación para la preparación del inóculo, ya que con 450 ml de aguamiel en matraz de 500 ml se tuvo problemas de contaminación por el contacto del medio con el tapón del matraz. Se tomaron 20 h para incubar ya que en este tiempo el crecimiento de *Zymomonas mobilis* se encuentra en su fase exponencial donde se tiene la mayor concentración de células metabólicamente activas.

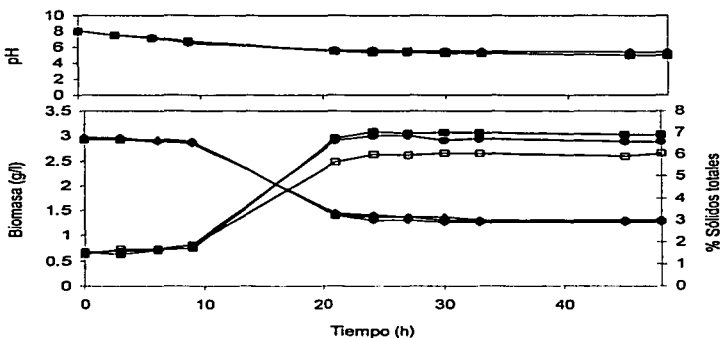


Figura 3. Crecimiento de *Zymomonas mobilis*, disminución de sólidos totales y pH en: 600 ml de aguamiel en matraz de 1L, sin agitación (●, ○); 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L, con agitación (■, □); 450 ml de aguamiel en matraz de 500 ml, con agitación (▲, △). Símbolo relleno crecimiento, pH y sin relleno sólidos totales.

Selección de una fuente de carbono para la producción de etanol en cultivo por lote alimentado.

Debido a que la concentración de carbohidratos del aguamiel es variable, es necesario ajustarla en un valor constante. Para esto se probaron diferentes fuentes posibles de carbono.

La Figura 5 muestra el crecimiento de *Zymomonas mobilis* durante la fermentación de aguamiel adicionada con diferentes azúcares: a) sacarosa (grado reactivo), b) azúcar morena, c) azúcar blanca, d) dextrosa (grado alimentario), e) fructosa (grado reactivo), f) jarabe de fructosa (grado alimentario) y g) azúcar invertida (grado alimentario). De acuerdo con la literatura la glucosa es la fuente de carbono ideal para la producción de alcohol por *Zymomonas mobilis*, ya que la formación de subproductos es mínima a comparación de cuando se utiliza fructosa o sacarosa (García, 1985). Sin embargo, en este caso el crecimiento de *Zymomonas mobilis* fue similar para todos los azúcares adicionados (Figura 5). El mayor incremento en la producción de etanol se obtuvo con la adición de jarabe de fructosa (50.6 g/l) como se muestra en la Figura 4.

Los sólidos totales disminuyeron durante la fermentación, permaneciendo constantes a partir de las 24 h (Figura 6). Esto coincidió con el tiempo en el que se detuvo el crecimiento y la producción de etanol, lo que indica que la producción de etanol esta asociada al crecimiento de *Zymomonas mobilis* (Figuras 4 y 5).

Aun con la adición de los diferentes azúcares se observó una disminución de pH (7.0 a 5.0) similar a lo obtenido en las fermentaciones anteriores (Figura 7).

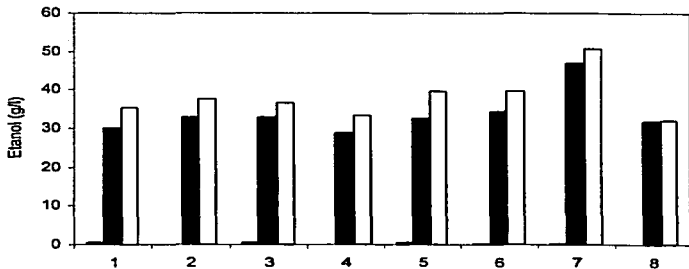


Figura 4. Producción de etanol (g/l), durante la fermentación por *Zymomonas mobilis* de aguamiel adicionada con: 1) Aguamiel sin adicionar, 2) Sacarosa, 3) Azúcar blanca, 4) Dextrosa, 5) A zúcar morena, 6) Fructosa, 7) Jarabe de fructosa y 8) Azúcar invertido. Las 0 h ■, 24 h ■ y 48 h □.

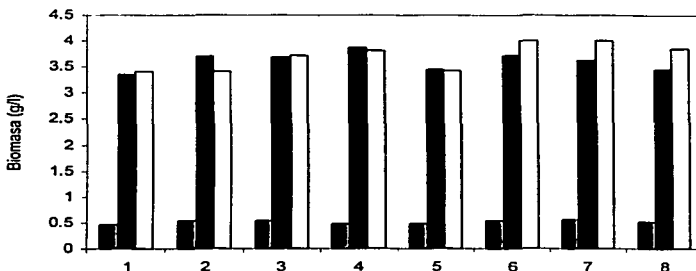


Figura 5. Crecimiento de *Zymomonas mobilis* en aguamiel adicionada con: 1) Aguamiel sin adicionar, 2) Sacarosa, 3) Azúcar blanca, 4) Dextrosa, 5) A zúcar morena, 6) Fructosa, 7) Jarabe de fructosa y 8) Azúcar invertido. Las 0 h ■, 24 h ■ y 48 h □.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

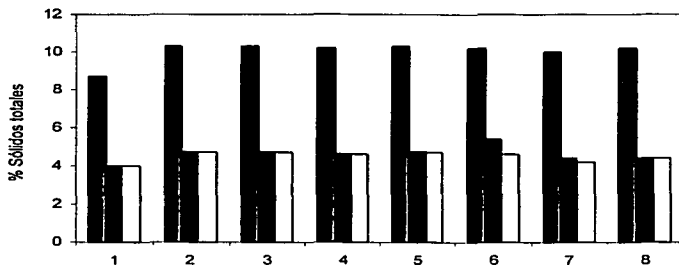


Figura 6. Consumo de sólidos totales, durante la fermentación por *Zymomonas mobilis* de agumiel adicionada con: 1) Agumiel sin adiconar, 2) Sacarosa, 3) Azúcar blanca, 4) Dextrosa, 5) A azúcar morena, 6) Fructosa, 7) Jarabe de fructosa y 8) Azúcar invertido. Las 0 h □ 24 h ■ y 48 h ▒.

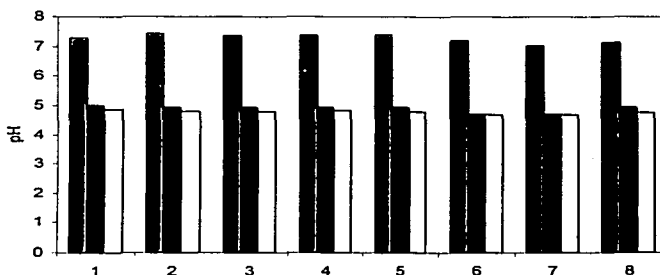


Figura 7. Evolución del pH durante la fermentación por *Zymomonas mobilis* de agumiel adicionada con: 1) Agumiel sin adiconar, 2) Sacarosa, 3) Azúcar blanca, 4) Dextrosa, 5) Azúcar morena, 6) Fructosa, 7) Jarabe de fructosa y 8) Azúcar invertido. Las 0 h □, 24 h ■ y 48 h ▒.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Producción de etanol por cultivo en lote.

Se llevó a cabo la fermentación de aguamiel por lotes con *Zymomonas mobilis*, para lo cual se utilizó aguamiel con 9% de sólidos totales y como inóculo un cultivo de *Zymomonas mobilis* con 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L con agitación (200 rpm) e incubado a 30°C por 20 h. La fase *lag* fue de 3 h, menor a la obtenida a nivel matraz (9 h), lo que indica que las condiciones obtenidas para la preparación del inóculo en la primera parte fueron adecuadas (Figura 9). Se obtuvo una velocidad de crecimiento específica μ de 0.16 h⁻¹ y un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) de 0.03 biomasa (g/l) / sustrato consumido (g/l) (Tabla 5). La fase exponencial terminó alrededor de las 15 h, a partir de la cual la biomasa permaneció constante (Figura 8). Esto coincidió con el consumo de azúcares reductores, los cuales al inicio de la fermentación se incrementaron hasta llegar a su máximo a las 9 h (Figura 8). A partir de aquí disminuyeron continuándose hasta agotarse (15 h). Esto indica que se hidrolizó la sacarosa desdoblándose en sus monosacáridos correspondientes (glucosa y sacarosa), para posteriormente ser metabolizados por *Zymomonas mobilis*. Los carbohidratos totales disminuyeron durante la fermentación, pero a diferencia de los azúcares reductores no fueron consumidos totalmente (carbohidratos residuales 7.43 g/l) (Figura 8).

La máxima concentración de etanol fue de 35.5 g/l, registrándose a las 21 h de fermentación con un rendimiento de etanol ($Y_{p/s}$) de 0.48 etanol (g/l) / sustrato consumido (g/l), el cual se encuentra dentro del rango obtenido generalmente para sacarosa (Lee et al, 1981; Viikari, 1986). En este cultivo se observó que la producción de etanol está asociada al crecimiento de *Zymomonas mobilis*. La producción de etanol por *Zymomonas mobilis* es reducida cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono, debido a la formación de un polímero de fructosa (levana) el cual se forma como consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa (Viikari, 1986). A concentraciones bajas de sacarosa (10-15%) el producto que se obtiene en mayor cantidad es etanol, mientras que con un 50-70% de sacarosa se da la síntesis de polímeros de fructosa (Bekers et al., 2002). Esto puede explicar que durante la fermentación no se observó

producción de polímeros ya que el aguamiel utilizado fue de una concentración de sacarosa menor al 10% (Figura 9).

El pH disminuyó de 6.0 hasta 5.0 similar a lo obtenido a nivel matraz (Figura 9).

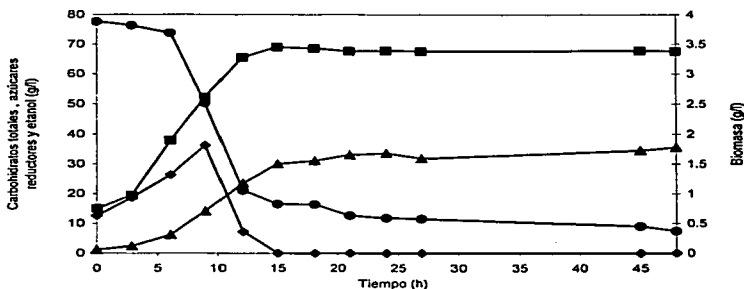


Figura 8. Crecimiento de *Zymomonas mobilis* (■), producción de etanol (▲), consumo de carbohidratos totales (●) y azúcares reductores (◆), durante la fermentación por lotes de aguamiel por *Zymomonas mobilis*.

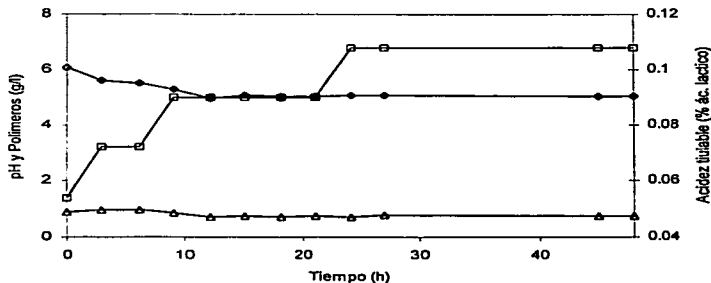


Figura 9. Evolución de pH (◇), acidez (□) y producción de polímeros (▲), durante la fermentación por lotes de aguamiel por *Zymomonas mobilis*.

Producción de etanol en cultivo por lotes alimentado

A) Con una alimentación. La producción de etanol en el cultivo en lotes de aguamiel fue baja (35.5 g/l) por lo que se utilizó el cultivo en lote alimentado para incrementar la producción de etanol, se llevo a cabo en dos etapas:

En la primera etapa de este cultivo se utilizó aguamiel en su estado natural (9% sólidos totales) se dio un comportamiento similar al cultivo en lotes, con una velocidad específica de crecimiento de 0.16 h^{-1} y un rendimiento de biomasa de 0.030 (biomasa (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) (Tabla 5). Aproximadamente a las 15 h se obtuvo el máximo crecimiento de *Zymomonas mobilis*, el cual coincidió con el consumo total de azúcares reductores, registrándose una concentración de etanol de 30.9 g/l con un rendimiento de 0.35 (etanol (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) (Figura 10).

Cuando los azúcares reductores se consumieron totalmente se dio inicio a la segunda etapa de este cultivo para lo cual se alimentaron 115 ml de jarabe de fructosa, los cuales se consumieron después de 6 h. En esta etapa se obtuvieron valores de velocidad de crecimiento específica y rendimiento de biomasa menores en comparación con la primera etapa del cultivo. Esto indica que *Zymomonas mobilis* después de la alimentación no incrementó su biomasa. Por el contrario, el rendimiento de etanol de la segunda etapa fue mayor (0.83) y se obtuvo una concentración máxima de etanol de 64.4 (g/l). Estos resultados indican que la fuente de carbono alimentada fue utilizada por *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol y no para la producción de biomasa. Cuando el crecimiento ocurre, la mayor parte del sustrato es incorporado a la biomasa dejando poco para la formación de productos. Sin embargo cuando se tiene una baja velocidad específica de crecimiento (casi cero), se da una alta eficiencia en la formación del producto (Jobses et al, 1986), lo que se observó en este tipo de cultivo. La concentración de etanol fue considerablemente mayor que la obtenida en el cultivo en lote de aguamiel (35.5 g/l).

El pH disminuyo de igual manera que en el cultivo por lote de aguamiel de 6.34 a 4.89 (Figura 11).

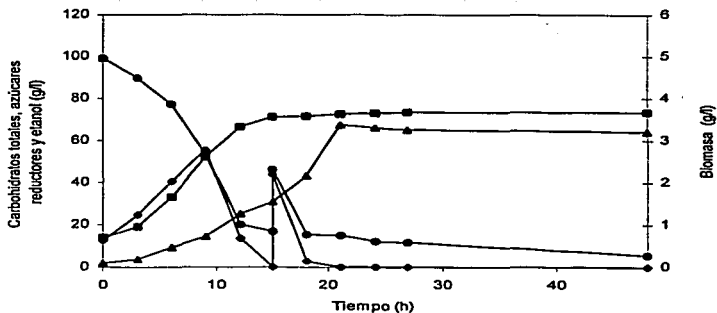


Figura 10. Crecimiento de *Zymomonas mobilis* (■), producción de etanol (▲), consumo de carbohidratos totales (●) y azúcares reductores (◆), durante la fermentación de aguamiel por lotes con una alimentación por *Zymomonas mobilis*.

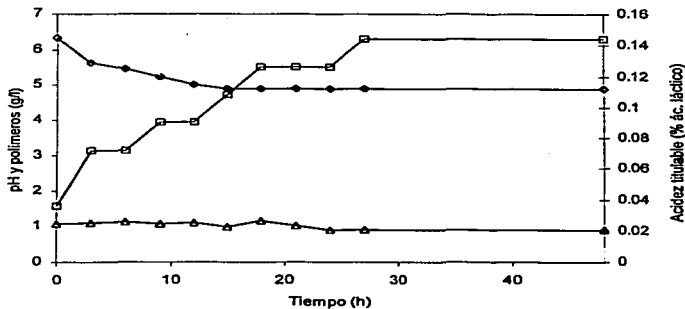


Figura 11. Evolución de pH (◇), acidez (◻) y producción de polímeros (Δ), durante la fermentación de aguamiel por lotes con una alimentación por *Zymomonas mobilis*.

B) Con dos alimentaciones. Durante la fermentación con una alimentación se incrementó considerablemente la concentración de etanol y como pudo observarse, los azúcares reductores se consumieron totalmente después de la alimentación. Se realizó una fermentación con dos alimentaciones, con la finalidad de seguir aumentando la concentración de etanol, la cual se realizó en tres etapas: La primera etapa de este cultivo en lote se inició en las mismas condiciones que la fermentación anterior (aguamiel al 9% de sólidos totales). En esta etapa se obtuvo una velocidad específica de crecimiento y un rendimiento de biomasa de 0.17 h^{-1} y 0.03 (biomasa (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) respectivamente, valores similares a los obtenidos en el cultivo en lotes. La concentración máxima de etanol fue de 30.8 g/l (Figura 12), con un rendimiento de 0.34 (etanol (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) (Tabla 5).

La primera alimentación se realizó a las 15 h de cultivo. Como se observó en el cultivo en lotes con una alimentación, después de la adición del jarabe de fructosa la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa disminuyeron.

El rendimiento de etanol fue un poco menor al de la primera etapa (0.30), alcanzándose una concentración máxima de etanol de 40.7 g/l (21 h).

La segunda alimentación se realizó a las 21 h, tiempo en el cual la cantidad de azúcares reductores alimentados se había consumido totalmente (Figura 12). Con esta realimentación se obtuvo un mayor rendimiento de etanol (0.64 etanol (g/l)/ sustrato consumido (g/l)), lo que puede relacionarse con que *Zymomonas mobilis* en esta etapa no está utilizando la fuente de carbono para su crecimiento sino para la producción de etanol. En este cultivo se alcanzó una producción máxima de etanol de 60.1 g/l a las 48 h. Como se observó, en este caso una doble alimentación no incrementó la producción de etanol obtenida con una alimentación (Figura 10) con jarabe de fructosa, además de que el tiempo en el que se registró la máxima producción de etanol fue mayor. No se observó producción de polímeros, lo que indica que la fuente de carbono se utilizó para la producción de etanol (Figura 13).

Los valores de pH siguieron el mismo perfil que en las fermentaciones anteriores (Figura 13).

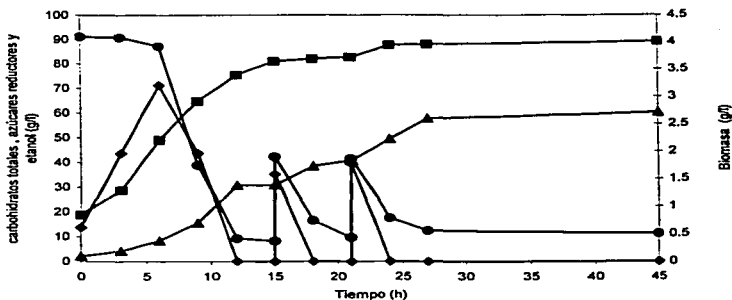


Figura 12. Crecimiento de *Zymomonas mobilis* (■), producción de etanol (▲), consumo de carbohidratos totales (●) y azúcares reductores (◆), durante la fermentación de aguamiel por lotes con dos alimentaciones.

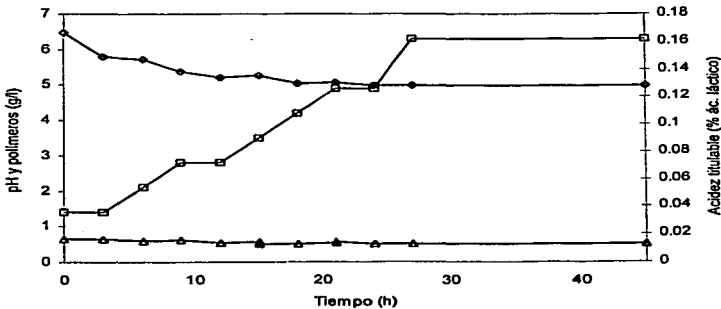


Figura 13. Evolución de pH (◆), acidez (□) y producción de polímeros (▲), durante la fermentación por *Zymomonas mobilis* de aguamiel por lotes con dos alimentaciones.

Producción de etanol a partir de aguamiel con 13% de sólidos totales en cultivo por lote alimentado

Como ya se mencionó *Zymomonas mobilis* puede crecer a altas concentraciones de azúcares (García, 1993). Debido a esto se llevó a cabo un cultivo en lotes con una alimentación donde el aguamiel utilizado se adicionó con jarabe de fructosa para alcanzar un 13% de sólidos totales.

La primera etapa inició con aguamiel adicionado con jarabe de fructosa (13% de sólidos totales) donde se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.15 h⁻¹ y un rendimiento de biomasa de 0.01(biomasa (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) menores a las fermentaciones anteriores (Tabla 5). En 1979 Rogers y colaboradores demostraron que el aumento de la concentración inicial de azúcares tiene un efecto más importante sobre los parámetros relacionados con el crecimiento (μ , $Y_{x/s}$) (Figura 14).

Los azúcares reductores son consumidos casi totalmente a las 18 h registrándose una concentración de etanol de 44.6 g/l con un rendimiento de etanol de 0.32 (etanol (g/l)/ sustrato consumido (g/l)). En este momento se realizó la alimentación. Después de 3 h de la adición no se observó mayor crecimiento de *Zymomonas mobilis*. En esta etapa se obtuvo una concentración total de etanol de 75.8 g/l con un rendimiento de 0.23 (etanol (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) (Figura 17). A diferencia de las otras fermentaciones se obtuvo un residuo mayor de azúcares reductores de 12.43 g/l y 20.29 g/l de carbohidratos totales (Figuras 15 y 16). Esto pudo deberse a que la concentración de etanol en el medio era ya inhibitoria para el metabolismo de *Zymomonas mobilis* (Swing, 1977).

No se registró la producción de polímeros durante este cultivo (Figura 18).

Los valores de pH fluctuaron durante la fermentación por la adición de jarabe de fructosa, sin embargo, disminuyó de 6.69 a 4.9 (Figura 20).

Con esta fermentación se obtuvo la máxima concentración de etanol, por lo que para corroborar estos resultados, se llevó a cabo con aguamiel de otra localidad (Delegación Milpa Alta), el cual contenía un 13% de sólidos totales. Para su utilización se diluyó a 9% de sólidos totales para partir de las mismas condiciones que en el primer experimento. Se realizaron dos cultivos más con este aguamiel.

En la primera etapa de estas fermentaciones el consumo total de azúcares reductores se registró 3 h después de lo obtenido en la fermentación con aguamiel de Tlaxcala (21 h) (Figura 15). Este desfase puede deberse a la dilución realizada en un principio al aguamiel para ser utilizado, ya que los componentes del aguamiel (otros nutrientes) también fueron diluidos. Para esta etapa se obtuvo una velocidad específica de 0.14 y 0.15 h⁻¹ respectivamente, con un rendimiento de biomasa de 0.01 (biomasa (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) en ambos cultivos (Figura 14). La producción de etanol fue de 43.5 y 46.7 con rendimientos de 0.38 y 0.36 (etanol (g/l)/ sustrato consumido (g/l)) respectivamente (Figura 17). Durante la etapa posterior a la alimentación no se incrementó la concentración de biomasa, registrándose una producción final de etanol de 77.0 y 75.0 g/l (Figuras 14 y 17). Los parámetros de crecimiento y producción de etanol fueron parecidos a los del primer experimento con aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala (Tabla 5). De igual forma no se registró producción de polímeros. El crecimiento de *Zymomonas mobilis* y la producción de etanol se vio retardado en el cultivo realizado con aguamiel de la Delegación Milpa Alta, lo que puede estar relacionado con la dilución antes mencionada.

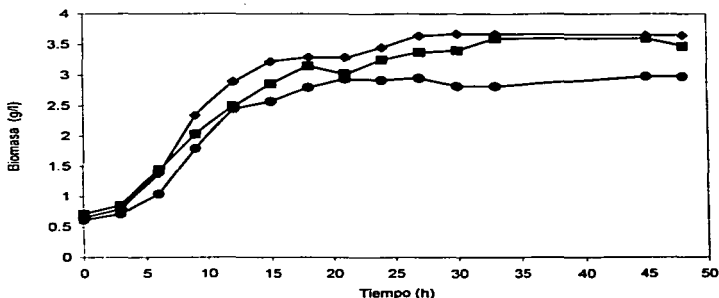


Figura 14. Crecimiento de *Zymomonas mobilis*, durante la fermentación de aguamiel adicionada con jarabe de fructosa al 13% más una alimentación. Primera fermentación: aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala (●), segunda (■) y tercera (▲) fermentación: aguamiel de Milpa alta.

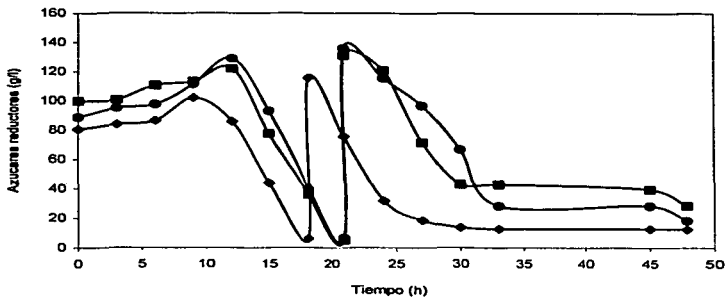


Figura 15. Consumo de azúcares reductores, durante la fermentación de aguamiel adicionada con jarabe de fructosa al 13% más una alimentación. Primera fermentación: aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala (♦), segunda (■) y tercera (●) fermentación: aguamiel de la Delegación Milpa alta.

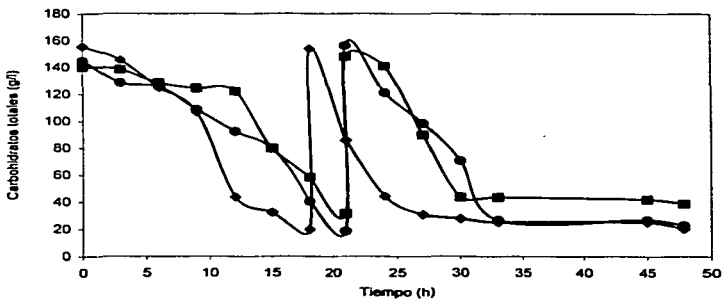


Figura 16. Consumo de carbohidratos totales, durante la fermentación de aguamiel adicionada al 13% de sólidos totales más una alimentación. Primer fermentación: aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala (♦), segunda (■) y tercer (●) fermentación: aguamiel de la Delegación Milpa alta.

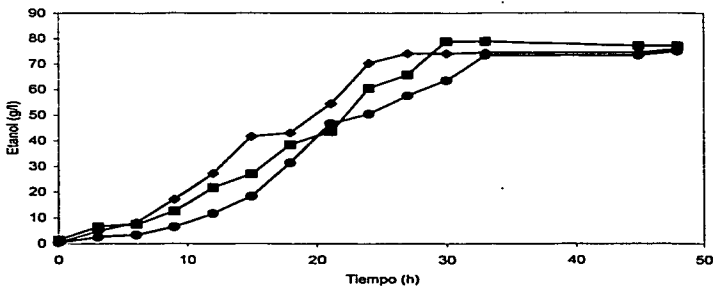


Figura 17. Producción de etanol durante la fermentación de aguamiel adicionada al 13% de sólidos totales con jarabe de fructosa más una alimentación. Primer fermentación (♦): aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala, segunda (■) y tercera (●) fermentación: aguamiel de la Delegación Milpa Alta.

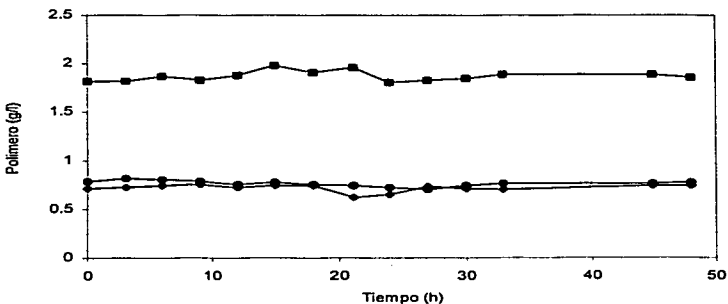


Figura 18. Producción de polímeros durante la fermentación de aguamiel adicionada al 13% de sólidos totales con jarabe de fructosa más una alimentación. Primer fermentación (♦): aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala, segunda (■) y tercera (●) fermentación: aguamiel de la Delegación Milpa Alta.

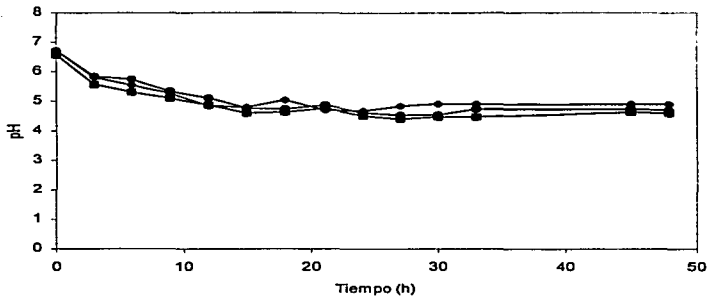
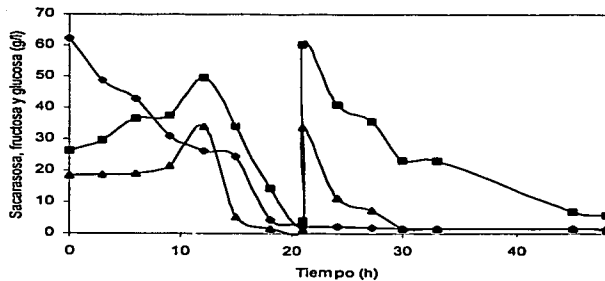
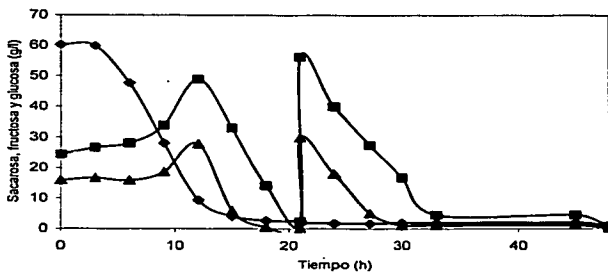


Figura 19. Evolución de pH durante la fermentación de aguamiel adicionada al 13% de sólidos totales con jarabe de fructosa más una alimentación. Primer fermentación (●): aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala, segunda (■) y tercera (●) fermentación: aguamiel de la Delegación Milpa Alta.

Durante las fermentaciones realizadas con aguamiel proveniente de la Delegación Milpa alta, se llevó a cabo un seguimiento del consumo de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) el cual se muestra en la Figura 20. Inicialmente el aguamiel contenía alrededor de 60 g/l de sacarosa, 25 g/l de fructosa y 17 g/l de glucosa. En ambos perfiles se observó que la sacarosa disminuyó desde el inicio de la fermentación, mientras la glucosa y fructosa aumentaron en el medio hasta llegar a un máximo, debido a la hidrólisis de la sacarosa. Los tres azúcares se consumieron casi totalmente a las 21 h, en este momento se realizó una alimentación con jarabe de fructosa. Después de la alimentación no se detectó sacarosa en el medio, ya que el jarabe de fructosa solo contenía un 55% de fructosa y un 45% de glucosa. La glucosa en los dos perfiles se consumió casi totalmente alrededor de las 30 h, mientras que el consumo de fructosa fue un poco más lento, agotándose alrededor de las 45 h. Esto puede explicarse porque se ha reportado que *Zymomonas mobilis* metaboliza más fácilmente la glucosa (Lee, 2000).



A)



B)

Figura 20. Concentración de sacarosa (♦), fructosa (■) y glucosa (▲), durante la fermentación de aguamiel adicionada al 13% de sólidos totales con jarabe de fructosa más una alimentación. A) segunda fermentación y B) tercera fermentación con aguamiel de la Delegación Milpa Alta.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de los diferentes cultivos de *Zymomonas mobilis* con aguamiel.

Parámetros	Cultivo por lote	Cultivo alimentado ^a		Cultivo alimentado ^b			Cultivo alimentado ^c		Cultivo alimentado ^d		Cultivo alimentado ^d	
	1	1	2	1	2	3	1	2	1	2	1	2
Etapas	1	1	2	1	2	3	1	2	1	2	1	2
Fermentación (h)	48	15	48	15	21	48	18	48	21	48	21	48
Biomasa (g/l)	2.63	2.85	2.98	2.8	2.8	3.1	2.64	3.00	2.31	2.76	2.33	2.37
Etanol (g/l)	35.5	30.9	64.4	30.8	40.7	60.1	44.6	75.8	43.5	77.0	46.7	75.0
$Y_{x/s}$ (g/l) / Sustrato consumido (g/l)	0.03	0.03	0.004	0.03	0.002	0.009	0.01	0.002	0.01	0.004	0.01	0.003
$Y_{p/s}$ (g/l) / Sustrato consumido (g/l)	0.48	0.35	0.82	0.34	0.30	0.64	0.32	0.23	0.38	0.30	0.36	0.24
Carbohidratos totales iniciales (g/l)	77.64	99.17	46.27	91.11	42.29	41.52	155.61	153.77	140.30	147.85	144.84	156.13
Carbohidratos totales residuales (g/l)	7.43	16.52	5.52	8.25	9.68	11.21	19.68	20.29	31.21	38.66	18.56	22.74
μ (h^{-1})	0.16	0.16	0.003	0.17	0.003	0.002	0.15	0.007	0.14	0.005	0.15	0.008
Productividad total (g/h)	0.71	1.32		1.20			1.56		1.57		1.55	

a) Cultivo con una alimentación.

b) Cultivo con dos alimentaciones.

c) Cultivo adicionado con jarabe de fructosa a un 13% de sólidos totales más una alimentación, aguamiel de Tlaxcala.

d) Cultivo adicionado con jarabe de fructosa a un 13% de sólidos totales más una alimentación, aguamiel de la Delegación Milpa alta.

En la Tabla 5 se resumen los parámetros cinéticos de las diferentes fermentaciones de aguamiel por *Zymomonas mobilis* realizadas para incrementar la concentración de etanol. Aunque en los cultivos alimentados el rendimiento de etanol fue menor en comparación al cultivo por lote, la producción y productividad fueron mayores. Como ya se mencionó en la fermentación donde se adicionó jarabe de fructosa desde el inicio, se dio una disminución en la velocidad específica de crecimiento y en el rendimiento de biomasa, sin embargo en este se obtuvo la máxima producción de etanol (75.0-77.0 g/l).

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con el trabajo realizado para incrementar la producción de etanol en la fermentación de aguamiel por *Zymomonas mobilis* se concluye que:

- Para obtener la mayor concentración de biomasa en el inóculo, se observó que la agitación tuvo un efecto positivo en el crecimiento de *Zymomonas mobilis*, en un cultivo de 600 ml de aguamiel en matraz de 1L. La fase exponencial del crecimiento se obtuvo entre las 10 y 24 h del cultivo, por lo que se seleccionaron 20 h para la incubación del inóculo y así obtener la mayor concentración de células metabólicamente activas.
- Durante el cultivo de *Zymomonas mobilis* en aguamiel adicionada con diferentes azúcares como fuente de carbono se encontró que el jarabe de fructosa incrementó la producción de etanol en un 43% con respecto al aguamiel sin adicionar.
- La utilización del cultivo por lote alimentado con jarabe de fructosa incrementó la productividad y producción de etanol con respecto al cultivo por lotes en donde se obtuvo 35.5 g/ de etanol. Sin embargo, la mayor concentración se dió en el cultivo con aguamiel ajustada a 13% de sólidos totales con jarabe de fructosa más una alimentación con el mismo, donde se obtuvieron valores de 75.0 a 77.0 g/l de etanol.
- En los diferentes cultivos y de acuerdo al método utilizado no se registró la producción de polímeros, lo que puede deberse a que la concentración de sacarosa presente en el aguamiel es menor a la reportada para su formación que es de 50-70%.
- Aunque la composición química del aguamiel puede variar de acuerdo a las condiciones en las que se cultiva el maguey (suelo y época del año), al utilizar aguamiel de diferentes regiones (Nanacamilpa, Tlaxcala y Delegación Milpa Alta) se obtuvieron resultados similares en la producción de etanol.

8. APENDICES

APENDICE 1

MEDIO DE CULTIVO MYC

Dextrosa	1.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Peptona bacteriológica	2.0 g
Agua destilada	1L

APENDICE 2

Tabla 6. Resultados de peso seco (g/l), % sólidos totales y pH durante la fermentación de aguamiel por *Zymomonas mobilis* en: 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L, sin agitación; 600 ml de aguamiel en matraz de 1 L y 450 ml de aguamiel en matraz de 450 ml con agitación. (El resultado es el promedio de tres valores)

Tiempo (h)	Sin agitación			Con agitación (200 rpm)					
	600 ml en matraz de 1 L			600 ml en matraz de 1 L			450 ml en matraz de 500 ml		
	Peso seco (g/l)	% Sólidos totales	pH	Peso seco (g/l)	% Sólidos totales	pH	Peso Seco (g/l)	%Sólidos totales	pH
0	0.64	6.8	7.98	0.67	6.7	8.01	0.67	6.7	7.99
3	0.73	6.8	7.46	0.64	6.7	7.54	0.69	6.7	7.48
6	0.74	6.6	7.09	0.71	6.6	7.15	0.72	6.7	7.19
9	0.81	6.5	6.54	0.76	6.6	6.7	0.81	6.6	6.57
21	2.47	3.3	5.61	2.95	3.2	5.53	2.9	3.2	5.46
24	2.63	3.2	5.67	3.08	3	5.5	3.01	3.1	5.4
27	2.61	3.1	5.52	3.04	3	5.44	3.01	3.1	5.32
30	2.65	3	5.52	3.07	2.9	5.33	2.91	3.1	5.31
33	2.64	3	5.49	3.06	2.9	5.23	2.94	3	5.22
45	2.6	3	5.39	3.03	2.9	4.99	2.89	3	5.03
48	2.64	3	5.4	3.02	2.9	4.98	2.88	3	5.03

Tabla 7. Resultados de peso seco (g/l), etanol (g/l), % sólidos totales y pH durante la fermentación por *Zymomonas mobilis* de aguamiel adicionada con diferentes azúcares. (El resultado es el promedio de dos valores)

Parámetro	Peso seco (g/l)			Etanol (g/l)			% Sólidos totales			pH		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48
Aguamiel	0.46	3.36	3.4	0.5	29.9	35.3	8.7	4.0	4.0	7.3	4.98	4.86
Sacarosa	0.53	3.7	3.4	0.0	32.8	37.5	10.3	4.7	4.7	7.43	4.93	4.81
Azúcar blanca	0.54	3.67	3.72	0.4	32.7	36.6	10.3	4.7	4.7	7.36	4.92	4.81
Dextrosa	0.47	3.87	3.82	0.0	28.7	33.3	10.2	4.6	4.6	7.37	4.94	4.84
Azúcar morena	0.48	3.45	3.42	0.4	32.4	39.7	10.3	4.7	4.7	7.39	4.92	4.8
Fructosa	0.54	3.72	4.0	0.3	34.4	39.7	10.2	5.4	4.6	7.19	4.69	4.68
Jarabe de fructosa	0.56	3.61	4.0	0.3	47.0	50.6	10.0	4.4	4.2	7.03	4.7	4.7
Azúcar invertido	0.52	3.44	3.84	0.0	31.7	32.1	10.2	4.4	4.4	7.13	4.92	4.77

Tabla 8. Resultados de pH, % acidez, polímeros (g/l), % sólidos totales, Peso seco (g/l), azúcares reductores (g/l), carbohidratos totales (g/l) y etanol (g/l) durante la fermentación de aguamiel por lote.

Tiempo (h)	pH	%Acidez	Polímeros (g/l)	%Sólidos totales	Peso seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Carbohidratos totales (g/l)	Etanol (g/l)
0	6.08	0.054	0.89	9	0.75	12.61	77.64	1.1
3	5.62	0.072	0.96	8.8	0.97	18.61	76.31	2.3
6	5.49	0.072	0.95	8.2	1.89	26.28	73.76	6.1
9	5.28	0.09	0.87	7	2.61	36.21	50.29	14.1
12	4.98	0.09	0.7	5.2	3.28	7.2	21.11	23.5
15	5.06	0.09	0.74	4.4	3.45	0	16.52	30.0
18	5.05	0.09	0.71	4.4	3.43	0	16.41	31.1
21	5.05	0.09	0.74	4.4	3.38	0	12.64	33.0
24	5.06	0.108	0.72	4.4	3.39	0	11.82	33.6
27	5.06	0.108	0.77	4.4	3.38	0	11.52	31.8
45	5.05	0.108	0.75	4.4	3.39	0	9.07	34.5
48	5.05	0.108	0.74	4.4	3.38	0	7.43	35.5

Tabla 9. Resultados de pH, % acidez, polímeros (g/l), % sólidos totales, Peso seco (g/l), azúcares reductores (g/l), carbohidratos totales (g/l) y etanol (g/l) durante la fermentación de aguamiel por lote con una alimentación.

Tiempo (h)	pH	%Acidez	Polímeros (g/l)	%Sólidos totales	Peso seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Carbohidratos totales (g/l)	Etanol (g/l)
0	6.34	0.036	1.07	8.8	0.7	12.43	99.17	1.8
3	5.62	0.072	1.10	8.4	0.95	24.63	89.78	3.9
6	5.47	0.072	1.11	8	1.64	40.56	77.13	9.5
9	5.24	0.090	1.06	6.8	2.61	55.51	53.56	14.5
12	5.00	0.090	1.08	5	3.33	13.41	20.09	25.3
15	4.91	0.108	0.97	4	3.55	0	16.52	30.9
15	4.91	0.108	0.97	7	3.55	43.86	46.27	30.9
18	4.90	0.126	1.14	5.2	3.57	2.99	15.5	43.3
21	4.90	0.126	1.00	5	3.62	0	14.78	67.6
24	4.89	0.126	0.91	5	3.64	0	11.92	66.1
27	4.89	0.144	0.90	5	3.68	0	11.52	65.2
48	4.89	0.144	0.91	5	3.68	0	5.52	64.4

Tabla 10. Resultados de pH, % acidez, polímeros (g/l), % sólidos totales, Peso seco (g/l), azúcares reductores (g/l), carbohidratos totales (g/l) y etanol (g/l) durante la fermentación de aguamiel por lote con dos alimentaciones.

Tiempo (h)	pH	%Acidez	Polímeros (g/l)	%Sólidos totales	Peso seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Carbohidratos totales (g/l)	Etanol (g/l)
0	6.46	0.036	0.64	9	0.84	13.61	91.11	2.1
3	5.81	0.036	0.65	8.6	0.96	43.71	90.8	4.1
6	5.72	0.054	0.6	7.8	1.89	71.21	87.19	8.4
9	5.37	0.072	0.61	6.6	2.91	43.71	38.86	15.4
12	5.2	0.072	0.54	4.6	3.39	0	9.17	30.8
15	5.27	0.072	0.55	4.2	3.64	0	8.25	30.8
15	5.16	0.09	0.51	6.8	3.64	35.21	42.29	30.8
18	5.04	0.108	0.5	5	3.69	0	16.41	38.4
21	5.08	0.108	0.54	5	3.72	0	9.68	40.7
21	4.97	0.126	0.55	7.8	3.72	39.58	41.52	40.7
24	4.99	0.126	0.51	6	3.94	0	17.43	49.4
27	4.99	0.162	0.51	6	3.96	0	12.43	57.7
48	4.99	0.162	0.5	6	4.01	0	11.21	60.1

Tabla 11. Resultados de pH, % acidez, polímeros (g/l), % sólidos totales, Peso seco (g/l), azúcares reductores (g/l), carbohidratos totales (g/l) y etanol (g/l) durante la fermentación de aguamiel al 13% de sólidos totales con una alimentación. Aguamiel de Nanacamilpa Tlaxcala.

Tiempo (h)	pH	%Acidez	Polímeros (g/l)	%Sólidos totales	Peso seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Carbohidratos totales (g/l)	Etanol (g/l)
0	6.69	0.036	0.71	12.4	0.65	80.5	155.61	0.5
3	5.79	0.054	0.72	12	0.79	83.84	145.4	4.8
6	5.55	0.072	0.74	11.4	1.38	86.4	125	8.2
9	5.28	0.072	0.76	10.4	2.34	101.94	106.63	17.1
12	4.83	0.108	0.72	8.8	2.89	85.81	43.56	27.2
15	4.8	0.126	0.75	6.8	3.22	43.91	32.23	41.6
18	5.03	0.144	0.74	5.8	3.29	6.13	19.68	43.0
18	4.94	0.144	0.69	13.4	3.29	115.52	153.77	44.6
21	4.7	0.144	0.62	11.6	3.29	75.58	85.61	54.4
24	4.66	0.162	0.65	9.4	3.45	31.71	44.12	70.3
27	4.83	0.162	0.73	8.6	3.64	18.53	30.7	74.1
30	4.9	0.162	0.71	8.4	3.67	13.61	27.54	74.1
33	4.9	0.18	0.7	8.4	3.67	12.82	25.09	74.4
48	4.9	0.198	0.75	8.4	3.65	12.43	20.29	75.8

Tabla 12. Resultados de pH, % acidez, polímeros (g/l), % sólidos totales, Peso seco (g/l), azúcares reductores (g/l), carbohidratos totales (g/l) y etanol (g/l) durante la fermentación de aguamiel al 13% de sólidos totales con una alimentación. Aguamiel de la Delegación Milpa Alta.

Tiempo (h)	pH	%Acidez	Polímeros (g/l)	%Sólidos totales	Peso seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Carbohidratos totales (g/l)	Etanol (g/l)
0	6.56	0.054	1.82	12.8	0.71	99.78	140.3	1.4
3	5.56	0.072	1.82	12.6	0.85	100.57	138.34	6.4
6	5.31	0.09	1.87	12	1.44	110.52	128.32	7.5
9	5.11	0.09	1.83	11.4	2.03	113.16	124.37	12.5
12	4.86	0.18	1.88	10.6	2.49	121.98	122.12	21.7
15	4.61	0.198	1.98	9	2.86	77.54	79.71	26.9
18	4.62	0.216	1.91	7.4	3.15	35.84	58.25	38.5
21	4.78	0.234	1.96	6.2	3.02	4.95	31.21	43.5
21	4.78	0.234	1.96	15	3.02	130.86	147.85	43.5
24	4.5	0.324	1.81	13.6	3.25	120.56	140.71	60.5
27	4.4	0.324	1.83	12.4	3.37	71.52	89.75	65.8
30	4.48	0.324	1.85	10.8	3.4	42.92	43.35	78.8
45	4.64	0.324	1.89	9.6	3.6	39.53	41.73	77.1
48	4.61	0.324	1.86	9	3.47	28.36	38.66	77.0

Tabla 13. Resultados de pH, % acidez, polímeros (g/l), % sólidos totales, Peso seco (g/l), azúcares reductores (g/l), carbohidratos totales (g/l) y etanol (g/l) durante la fermentación de aguamiel al 13% de sólidos totales con una alimentación. Aguamiel de la Delegación Milpa Alta. (Duplicado)

Tiempo (h)	pH	%Acidez	Polímeros (g/l)	%Sólidos totales	Peso seco (g/l)	Azúcares Reductores (g/l)	Carbohidratos totales (g/l)	Etanol (g/l)
0	6.69	0.036	0.79	12.4	0.61	88.76	144.84	0.5
3	5.84	0.054	0.82	11.6	0.71	95.06	128.52	2.5
6	5.75	0.054	0.81	11	1.04	97.61	125.45	3.4
9	5.33	0.072	0.79	10.6	1.79	111.39	108.62	6.4
12	5.1	0.072	0.76	9.6	2.45	128.9	92.29	11.7
15	4.77	0.108	0.78	8.2	2.57	93.09	79.68	18.3
18	4.73	0.108	0.76	6.8	2.8	39.77	40.29	31.4
21	4.88	0.144	0.75	6	2.94	6.53	18.56	46.7
21	4.88	0.144	0.75	13.8	2.94	135.8	156.13	46.7
24	4.6	0.18	0.72	12.4	2.92	115.32	121.01	50.4
27	4.52	0.216	0.7	10.8	2.95	96.63	98.36	57.6
30	4.54	0.216	0.75	10	2.82	66.73	70.52	63.5
45	4.73	0.216	0.77	9.4	2.98	28.36	26.52	73.4
48	4.71	0.216	0.78	8.8	2.8	18.33	22.74	75.0

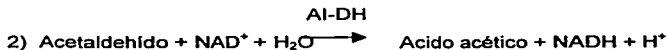
APENDICE 3

PRINCIPIO ENZIMATICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ETANOL

El principio de este kit enzimático es oxidar el etanol a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y el dinucleótido adenín-nicotinamida (NAD^+).



El equilibrio de esta reacción tiende a desplazarse hacia reactivos (Etanol y NAD). Sin embargo está puede ser desplazada completamente hacia la formación del acetaldehído en condiciones alcalinas. Posteriormente el acetaldehído es oxidado cuantitativamente hacia ácido acético en presencia de la enzima aldehído-deshidrogenasa (Al-DH).



El NADH es determinado espectrofotométricamente a una longitud de 340 nm.

Preparación de la muestra:

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min. (eliminación de biomasa) y se les dio un tratamiento térmico en baño María a 80°C durante 15 min. Se realizaron diluciones 1/1000.

Procedimiento

Tabla 14. Orden de la adición de los reactivos para la determinación de etanol.

Pipetear dentro de celdas	Blanco	Muestra
Solución 1	1.5000 ml	1.5000 ml
Agua destilada	0.0500 ml	-
Solución muestra	-	0.0500 ml

*Mezclar, leer absorbancias de las soluciones después de 3 min (A₁).

Empezar la reacción por adición de :

Suspensión 2	0.0250 ml	0.0250 ml
--------------	-----------	-----------

*Mezclar, esperar el final de la reacción (5-10 min) y leer las absorbancias de las soluciones (A₂).

*Agitar con una espátula de plástico o con movimientos suaves después de tapar las celdas.

Es necesario tapar las celdas durante las mediciones (p.e. parafilm).

Solución 1: Buffer de difosfato de potasio, NAD y Aldehído-deshidrogenasa.

Suspensión 2: Alcohol-deshidrogenasa.

El análisis se realizó en celdas de cuarzo de 3 ml con un paso de luz de 1cm. El equipo utilizado (Spectronic Genesys 5, Thermo-spectronic) se calibró con una celda con agua destilada.

Para calcular la concentración de etanol se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = Volumen final (ml)

v = Volumen de la muestra (ml)

MW = Peso molecular del etanol (g/mol)

d = paso de luz (cm)

ϵ = Coeficiente de extinción de NADH A 340 nm ($6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

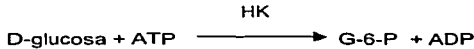
Si la muestra fue diluida durante la preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución.

APENDICE 3

PRINCIPIO ENZIMATICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA

- Determinación de la D-glucosa antes de la inversión:

A pH 7.6, la enzima hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la D-glucosa por adenosin-5'-trifosfato (ATP) con la formación simultanea de adenosin-5'-difosfato (ADP).



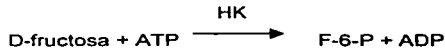
En presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), la D-glucosa-6 fosfato (G-6-P) formada es especialmente oxidada por nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato (NADP) a D-gluconato-6-fosfato con la formación de nicotinamida-adenin dinucleotido fosfato reducido (NADPH)



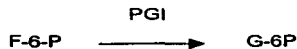
El NADPH formado en esta reacción es estequiométrica a la cantidad de D-glucosa y es medida por absorbancia a 340nm.

- Determinación de D-fructosa:

La hexoquinasa también cataliza la fosforilación de D-fructosa a D-fructosa-6-fosfato (F-6-P) con la ayuda de ATP.



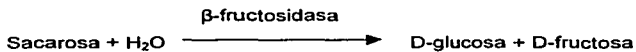
Al termino de esta reacción F-6-P es convertida a G-6-P por la enzima fosfo-glucosa isomerasa (PGI).



G-6-P reacciona con NADP para la formación de D-gluconato-6-fosfato y NADPH. La cantidad de NADPH formada es estequiometrica a la cantidad de D-fructosa.

- **Inversión enzimática:**

A pH de 4,6, la sacarosa es hidrolizada por la enzima β -fructosidasa (invertasa) a D-glucosa y D-fructosa.



La determinación de D-glucosa después de la inversión (D-glucosa total) es llevada acabo de acuerdo al principio arriba mencionado.

La sacarosa contenida es calculada por la diferencia de las concentraciones de D-glucosa antes y después de la inversión enzimática.

Preparación de la muestra

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min. (eliminación de biomasa) y se les dió un tratamiento térmico en baño María a 80°C durante 15 min. (paro de reacción enzimática) . Se realizaron diluciones

Procedimiento

Tabla 15. Orden de la adición de reactivos para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa.

Pipetear dentro de celda	Blanco de sacarosa	Muestra de sacarosa	Blanco de D-glucosa y D-fructosa.	Muestra de d-glucosa y D-fructosa.
Solución 1	0.100 ml	0.100 ml	---	---
Solución muestra	---	0.050 ml	---	0.050 ml
Mezclar*, incubar por 15 min. a 20-25°C				
Solución 2	0.500 ml	0.500 ml	0.500 ml	0.500 ml
Agua destilada	0.900 ml	0.850 ml	1.000 ml	0.950 ml
Mezclar, leer absorbancias de las soluciones después aprox. 3 min. (A ₁). Empezar la reacción por adición de:				
Suspensión 3	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
Mezclar, esperar el termino de la reacción (aprox. 10-15 min.) y leer absorbancias de las soluciones (A ₂). Adición de:				
Suspensión 4	---	---	0.010 ml	0.010 ml
Mezclar, leer absorbancias de las soluciones después de 10-15min. (A ₃).				

*Agitar con una espátula de plástico o con movimientos suaves después de tapar las celdas.

Es necesario tapar las celdas durante las mediciones (p.e. parafilm).

Solución 1: Buffer de citratos a pH= 4.6, β-fructosidasa.

Solución 2: Buffer de trietanolamina pH=7.6, NADP, ATP.

Suspensión 3: hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Suspensión 4: fosfoglucosa isomerasa.

El análisis se realizó en celdas de cuarzo de 3 ml con un paso de luz de 1cm. El equipo utilizado (Spectronic Genesys 5, Thermo-spectronic) se calibró con una celda con agua destilada.

Para calcular la concentración de azúcares se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A = [g/l]$$

V = Volumen final (ml)

v = Volumen de la muestra (ml)

MW = Peso molecular del etanol (g/mol)

d = paso de luz (cm)

ϵ = Coeficiente de extinción de NADH A 340 nm ($6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Y ΔA , se determinó a partir de la diferencia de absorbancias en base a lo siguiente:

$$\Delta A_{\text{glucosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

$$\Delta A_{\text{fructosa}} = (A_3 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanco}}$$

$$\Delta A_{\text{sacarosa}} = \Delta A_{\text{Muestra de sacarosa}} - \Delta A_{\text{Muestra de glucosa}}$$

Si la muestra fue diluida durante la preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

9. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Abate C., Dalleri D., Rodríguez E., Garro O. (1996). Ethanol production by a mixture culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 580-83.
- ◆ Anónimo, Comercio exterior. (1982). El maguey y el pulque. Industria Alimentaria 4: 10-29.
- ◆ Bekers, M., Laukevics J., Upite D., Kaminska E., Vigants A., Viesturs U., Pankova L. and Danilevics A.(2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. Process. Biochem., 38: 701-6.
- ◆ Blomberg, L. (2000). Tequila, mezcal y pulque, Capitulo 1. Editorial Diana, México D.F. pág. 17-31 y 37-47.
- ◆ Cravioto-Massieu. (1962). Aspecto metabólico de las levaduras del pulque, Escuela Nacional de Ciencias Químicas, México, D.F., pág. 11-16.
- ◆ Demain, Arnold L. (1985). Biology of industrial microorganisms., Capitulo 9. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. Pág. 261-281.
- ◆ Doelle Horst W. and Greenfield Paul F. (1985). Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 411-15.
- ◆ Doelle Horst W. and Greenfield Paul F. (1985). The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 405-10.
- ◆ Dubois M., Gilles A., Hamilton K., Rebers P. A. and Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-6.
- ◆ García Garibay, Mariano (1993). Producción de alcohol de *Zymomonas mobilis*. Biotecnología alimentaria, Capitulo 19. Editorial Limusa, México D.F., pág. 617-32.
- ◆ Gunasekaran P. and Chandra Raj K. (1997). Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 119-30.

- ◆ Hobbly, T. J. Pamment, N. B. (1994). Differences in response of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* to change in extracellular ethanol concentration. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 155-58.
- ◆ Jobses I. M. L. and Roels J. A. (1985). The inhibition of the maximum specific growth and fermentation rate of *Zymomonas mobilis* by ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 554-63.
- ◆ Jobses, I. M. L., Hiemstra, H. C. H. and Roels, J. A. (1986). Fermentation kinetics of *zymomonas mobilis* near zero growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 502-11.
- ◆ Kenjitanaka, Zakpaa D. Hilary and Ayaaki Ishizaki. (1999). Investigation of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *J. Biosc. Bioeng.* 87: 642-46.
- ◆ Lappe, Patricia; Wachter, Ma. Del carmen (1993). *Microbiología del pulque. Alimentos fermentados indígenas de México, Capitulo 3, Cd. Universitaria, México, D.F. Pág. 76-8.*
- ◆ Lee Wen-Chien and Huang Cheng-Ta (2000). Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grow on the media containing glucose and fructose. *Biochem. Eng. J.* 4: 217-27.
- ◆ Leveau, J. Y., Bouix, M. (2000). *Zymomonas*, *Microbiología industrial, Capitulo 8. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza (España). Pág 529-78.*
- ◆ Loyola Montemayor, Elías (1956) *La industria del pulque. Banco de México, S. A. Departamento de investigaciones industriales, México D.F. pág. 62-7.*
- ◆ Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426.
- ◆ Moreau, robert A., Powell, Michael J., Fett, William F.,Whitaker, Bruce D. (1997). The effect of ethanol and oxygen on the growth of *Zymomonas mobilis* and the levels of hopanoids and other membrane lipids. *Curr. Microbiol.* 35: 124-28.
- ◆ Rogers, P. L., Lee, K. J. and Tribe, D. E. (1979). Kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration. *Biotechnol. Lett.* 5: 345-50.

- ◆ Sánchez Marroquín, A. (1970). Investigaciones realizadas en la Facultad de Química, UNAM, tendientes a la industrialización del agave. Rev. Soc. Quím. México, D. F. 14: 184-88.
- ◆ Sánchez Marroquín, A., Teran J., Piso J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque. Datos químicos de la fermentación del aguamiel con cultivos puros. Rev. Soc. Quím. México, D. F. 1(3) 167-174.
- ◆ Siva Kesava, Rakshit, S. K., Panda, T. (1995). Production of ethanol by *Zymomonas mobilis*: the effect of batch step-feeding of glucose and relevant growth factors. Process. Biochem. 30: 41-7.
- ◆ Sprenger, G. A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol. lett. 145: 301-7.
- ◆ Sreekumar, O., Chand, N., Bassapa, S. (1999). Optimization and interaction of media components in ethanol production using *zymomonas mobilis* by response surface methodology. J. Biosc. Bioeng. 88: 334-38.
- ◆ Swing, J. and Deley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 41: 1-46.
- ◆ Trejo Márquez, Andrea (1995). Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de un polisacárido exocelular por *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*. Tesis Maestría, UNAM, México, D. F. pág. 29 y 30.
- ◆ Trevan M. D., Boffey S., Goulding K. H. and Stanbury P. (1990). Cultivo de microorganismos. Biotecnología: Principios biológicos. Capítulo 7. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza (España). Pág. 77-93.
- ◆ Ulloa Miguel, Herrera Teófilo (1982). Estudio actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México. Inst. Biol., UNAM, D. F., pág 145, 152-4.
- ◆ Vikarii Liisa and Gisler Raija (1986). By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*- strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 240-44.