

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE UREA PARA
EL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces Cerevisiae* EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

POR:

ANUAR ALEJANDRO LÓPEZ PEÑA

TESIS



CATACAMAS

OLANCHO

DICIEMBRE, 2025

OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE UREA PARA
EL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces Cerevisiae* EN LA PRODUCCIÓN DE
ETANOL.

POR:

ANUAR ALEJANDRO LÓPEZ PEÑA

Asesor principal

M. Sc. FRANCISCO ENRIQUE SANCHEZ ROSALES

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

CATACAMAS

OLANCHO

DICIEMBRE, 2025

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico primeramente a Dios, por ser mi refugio en la incertidumbre, mi guía en la oscuridad y la fuente de mi perseverancia. Cada paso dado en este proceso fue posible gracias a su presencia constante, permitiendo enfrentar diversas dificultades con valentía y dedicación.

A mi madre, **Evelyn Jeasnette Peña Ramos**, por ser mi mayor motivación en la vida, la única que ha estado para apoyarme en su totalidad, por ser ese ejemplo de un amor incomparable, de esfuerzo y sacrificio. Gracias por siempre estar en esos momentos cuando todo apuntaba hacia lo malo, es por ello, que este trabajo te lo dedico a ti.

Finalmente dedico este logro también a la memoria de mi abuela, Faustina Ramos Ochoa, quien, aunque ya no este con nosotros su recuerdo ha sido una fortaleza para seguir adelante, por eso le dedico este triunfo porque estoy seguro que me acompañó en cada momento.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le doy gracias a Dios por brindarme sabiduría, salud y fuerza para poder sobrepasar cada obstáculo que se presentó a lo largo de este camino. Su guía fue indispensable en cada parte de este trabajo, permitiendo cumplir con todo lo necesario.

A mi madre, Evelyn Jeansette Peña Ramos, y a mi hermana, Nubia Raquel Duarte Peña, por sus palabras de aliento y su amor incondicional en los tiempos difíciles, así mismo, agradezco a Cristi Gabriela Sánchez Valladares, por siempre ser un apoyo para mí en todo este proceso, por su amor y motivación constante.

A mis compañeros y amigos: Carlos Inestroza, Juanangel Vázquez, Jarod Mejía, Eli García, Eduardo Díaz y Daniel Alvarenga, por su motivación y apoyo. A mis asesores, el M. Sc. Francisco Sánchez, la M. Sc. Katy Castellanos y el M. Sc. Wilson Martínez, por su orientación y perseverancia por culminar este trabajo de investigación.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Agricultura, mi alma mater, y a los docentes de la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos por haberme brindado los conocimientos y valores que fortalecieron mi formación profesional. Extiendo también mi gratitud a todas las personas que me acompañaron y apoyaron a lo largo de este camino académico.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de anexos	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General:.....	3
2.2 Objetivos Específicos:.....	3
III. REVISIÓN LITERARIA.....	4
3.1 Eficiencia en Insumos para una Producción Sostenible de Bio-Etanol	4
3.2 Producción de etanol mediante fermentación	4
3.3 La fermentación alcohólica	5
3.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	6
3.4.1 Ventajas de usar de <i>S. cerevisiae</i>	7
3.5 Parámetros de cultivo que afectan la producción de etanol.	7
3.5.1 pH.....	7
3.5.2 Temperatura.....	8
3.5.3 Nutrientes esenciales para el desarrollo <i>S. cerevisiae</i>	9
3.5.4 El jugo de caña como fuente de carbono para la levadura	9
3.6 Urea como fuente de nitrógeno.....	11
3.7 Fermentación en medios complejos.....	12

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1 Lugar de la investigación.....	13
4.2 Materiales y equipos	13
4.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	14
4.3.1 Factores de estudio	14
4.3.2 Variables respuestas.....	14
4.3.4 Medio de cultivo.....	16
4.3.5 Activación de la levadura	16
4.3.6 Preparación del medio de cultivo.....	17
4.3.7 Condiciones de operación.....	17
4.3.8 Muestreo.....	17
4.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	18
4.4.1 Determinación de la concentración de biomasa.....	18
4.4.2 Determinación de etanol.....	18
4.4.3 Determinación de viabilidad celular	19
4.4.4 Medición de pH.....	20
4.4.5 Medición de grados Brix	20
4.5. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS	20
4.5.1 Velocidad Específica de Crecimiento (μ).....	20
4.5.2 Productividad Volumétrica de producto. (QP)	21
4.5.3 Productividad específica de producto. (qP).....	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1 Crecimiento de Biomasa.....	23
5.2 Consumo de solidos solubles	24
5.3 Producción de etanol.....	25
5.4 Comportamiento de la viabilidad celular	26
5.5 Comportamiento del pH.....	28
5.6 Parámetros cinéticos	29
5.7 Optimización de temperatura y concentración de urea	30

5.7.1 Análisis de la velocidad de crecimiento	30
5.7.2 Análisis de % de etanol.....	32
5.7.3 Análisis de biomasa (g/L).....	33
5.7.4 Análisis de superficie de respuesta	34
5.7.5 Validación experimental de las condiciones óptimas	36
VI. CONCLUSIONES	38
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. BIBLIOGRAFIA	40

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Materiales, instrumentos, equipos y reactivos utilizados	13
Tabla 2: Descripción del diseño experimental	15
Tabla 3: Parámetros cinéticos para una fermentación con <i>S. cerevisiae</i>	30
Tabla 4: Análisis de Varianza para μ	31
Tabla 5: Análisis de Varianza para Etanol máx.....	32
Tabla 6: Análisis de Varianza para Biomasa máx.	34
Tabla 7: Valores óptimos de los factores de estudio en relación a biomasa máxima, etanol máximo y velocidad de crecimiento.....	37
Tabla 8: Valores de absorbancia para las diluciones de etanol y curva de calibrado.	61

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Diagrama modificado de flujo general de la producción de bioetanol. (Tse et al., 2021).....	5
Figura 2: Cuantificación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en cámara de Neubauer con el lente 40 X	19
Figura 3: Evaluación del crecimiento de biomasa mediante modelo cinético en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea.	24
Figura 4: Consumo de solidos solubles (°Brix) en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea.....	25
Figura 5: % (v/v) de etanol en función del tiempo en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea.....	26
Figura 6: Determinación de viabilidad celular en porcentaje en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea	28
Figura 7: Evaluación del pH en función del tiempo en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea	29
Figura 8: Diagrama de Pareto y grafica de efectos principales para la velocidad específica de crecimiento.	31
Figura 9: Diagrama de Pareto y grafica de efectos principales para % (v/v) de etanol.	33
Figura 10: Diagrama de Pareto y grafica de efectos principales para biomasa (g/L).	34
Figura 11: Superficie de respuesta estimada para biomasa (g/L), etanol % (v/v) y velocidad de crecimiento (h ⁻¹).	36

Lista de anexos

	Pág.
Anexo 1: Protocolo de Activación de Levadura	50
Anexo 2: Protocolo para la Determinación de Biomasa por Peso Seco y Espectrofotometría	52
Anexo 3: Protocolo para la Evaluación de Viabilidad Celular utilizando Azul de Metileno	56
Anexo 4: Protocolo para Determinación de Etanol	59
Anexo 5: Diferencia de color entre el jugo de caña y el medio de cultivo fermentado.	63
Anexo 6: Muestras listas para los respectivos análisis.	63
Anexo 7: Jugo de caña esterilizado	64
Anexo 8: Biomasa en peso seco para curva de calibrado.	64
Anexo 9: Colocación de matraces para inicio de incubación	65
Anexo 10: Proceso de centrifugación para separar el sobrenadante de la biomasa.	65
Anexo 11: Homogenización del dicromato de potasio.	66
Anexo 12: Materia prima del cultivo.	66

LÓPEZ PEÑA, A A, 2025 OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE UREA PARA EL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces Cerevisiae* EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. Tesis Ing. En Tecnología Alimentaria, Catacamas, Olancho, Honduras. Universidad Nacional de Agricultura. 78 pg.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue optimizar localmente la temperatura y concentración de urea como fuente de nitrógeno sobre la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de jugo de caña y su efecto en la producción de etanol. Se evaluaron seis tratamientos combinando cuatro temperaturas (29, 32, 35 y 38 °C) y tres concentraciones de urea (0.5, 1.5 y 2.5 g/L), utilizando jugo de caña ajustado a 15 °Brix como medio de cultivo con pH inicial de 6.09. Se cuantificaron biomasa y etanol (% v/v) por medio de un espectrofotómetro UV, viabilidad celular con azul de metileno, °Brix, pH y los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica de producto (Q_p) y productividad específica producto (q_p). El tratamiento a 29 °C y 2.5 g/L de urea presentó la mayor biomasa (9.48 g/L), mientras que la máxima producción de etanol fue de 18.12 % (v/v) con 0.5 g/L de urea a 32 °C. La μ alcanzó un valor máximo de 0.23 h⁻¹ y la mayor Q_p fue de 4.72 g/L*h bajo 0.5 g/L de urea a 38 °C, condición que también mostró la productividad específica de producto más alta (1.06 g/g·h). Así mismo, se registró hasta 94 % de viabilidad celular y una disminución de los sólidos solubles en las condiciones con mayor biomasa. Por otra parte, el análisis de optimización identificó que las condiciones más favorables para maximizar la biomasa correspondieron a 29 °C y 2.5 g/L de urea. En contraste, los valores óptimos para maximizar la producción de etanol fueron 32 °C y 0.5 g/L de urea. La optimización mostró que temperaturas bajas con alta concentración de urea favorecen el crecimiento celular, mientras que temperaturas intermedias con baja concentración de urea maximizan el etanol, evidenciando que el ajuste combinado de temperatura y urea es determinante para mejorar la producción fermentativa.

Palabras clave: jugo de caña, cinética de crecimiento, etanol, productividad volumétrica, biomasa.

I. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica representa un proceso bioquímico fundamental en la industria de bebidas y biocombustibles, donde la conversión eficiente de azúcares en etanol depende críticamente de factores ambientales como la temperatura y de condiciones nutricionales como la fuente de nitrógeno en el medio. Se ha informado que la fuente de nitrógeno, es un elemento esencial para el metabolismo y crecimiento de las levaduras. Estudios previos han demostrado que en medios complejos, la sustitución de fuentes nitrogenadas como sulfato de amonio y fosfato de amonio por urea resulta fundamental para garantizar un adecuado desarrollo del proceso fermentativo.(Téllez-Mora et al., 2012).

Particularmente, la urea ha emergido como una de las fuentes de nitrógeno más efectivas para el cultivo de microorganismos. Su uso en medios de cultivo para levaduras no solo provee el nitrógeno necesario para el crecimiento celular, sino que además puede incrementar significativamente la producción de etanol, especialmente en procesos de fermentación alcohólica (Rojo et al., 2023a); (Sasmal et al., 2019). Este compuesto nitrogenado presenta ventajas en términos de disponibilidad y costo, lo que lo hace particularmente atractivo para aplicaciones a escala industrial.

La levadura protagonista de procesos fermentativos es *Saccharomyces cerevisiae*, la cual requiere condiciones ambientales específicas para alcanzar su máximo potencial fermentativo. Según Walker & Stewart, (2016), esta levadura presenta un desarrollo óptimo en rangos de temperatura entre 20 y 30 °C. No obstante, Yusuf et al. (2023) demostraron que, bajo una temperatura de 35 °C y un pH de 4.5 la producción de etanol se maximiza, a pesar de que esta temperatura puede afectar negativamente la viabilidad celular. Estos hallazgos

plantean la necesidad de investigar con mayor profundidad el parámetro de la temperatura, para optimizar simultáneamente el crecimiento celular y el rendimiento en etanol.

La identificación de las condiciones óptimas de cultivo es fundamental para garantizar la eficiencia y estabilidad de los procesos fermentativos. Entre los factores más determinantes se encuentran la temperatura y la disponibilidad de nutrientes nitrogenados, como la urea, los cuales influyen directamente en el crecimiento microbiano, la actividad metabólica y la formación de productos de interés(Rojo et al., 2023a). Establecer rangos adecuados para estos parámetros no solo permite maximizar el rendimiento biotecnológico, sino también asegurar la reproducibilidad del proceso y reducir costos operativos asociados a etapas de ajuste y control (García-Ríos et al., 2024).

La producción eficiente de etanol mediante *Saccharomyces cerevisiae* está directamente relacionada con la optimización de parámetros clave como la temperatura y la concentración de nitrógeno. Este estudio tiene como objetivo optimizar localmente la temperatura y las concentraciones de urea como fuente de nitrógeno, sobre la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol. Mediante este enfoque experimental, se pretende establecer bases científicas para mejorar los procesos fermentativos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

- Optimizar localmente la temperatura y las concentraciones de urea como fuente de nitrógeno, sobre la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol.

2.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de urea como fuente de nitrógeno en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para producción de etanol.
- Determinar la influencia de temperatura sobre los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol.
- Analizar el impacto de la temperatura y concentración de urea en la producción de etanol y en la concentración de biomasa para identificar la condición óptima.

III. REVISIÓN LITERARIA

3.1 Eficiencia en Insumos para una Producción Sostenible de Bio-Etanol

El bioetanol es el alcohol generado por la fermentación microbiana de carbohidratos de plantas o algas, como biomasa lignocelulósica, trigo, caña de azúcar, maíz. Es por ello que, en los últimos años, se ha hecho mucho hincapié en la conversión de biomasa en combustible de etanol, reconocido como el combustible líquido más respetuoso con el medio ambiente como alternativa a los combustibles fósiles. La producción de bioetanol a partir de biomasa ofrece una solución para reducir la dependencia del consumo de petróleo crudo y, al mismo tiempo, mitigar la contaminación ambiental (Abdul Kareem Joyia et al., 2024).

Según Gupta & Verma (2015) el bioetanol se produce aproximadamente en un 60 % a partir de la caña de azúcar y un 40 % a partir de otros cultivos. Así mismo menciona que la importancia del etanol es mayor debido a diversas razones, como el calentamiento global y el cambio climático. La producción de bioetanol ha despertado un interés generalizado a nivel internacional, nacional y regional (Gupta & Verma, 2015).

3.2 Producción de etanol mediante fermentación

La producción de bioetanol se puede lograr utilizando una gama cada vez más amplia de materias primas. Así mismo, con la tecnología mejorada de producción de etanol, se ha vuelto posible producir etanol a partir de una gama más amplia de materiales de recursos de biomasa. En este caso, la concentración de agua y azúcar en los medios de fermentación y el uso de procesos discontinuos o continuos se utilizan para agrupar la tecnología de

fermentación. También se pueden aplicar técnicas adicionales a los medios de fermentación para optimizar aún más los rendimientos de etanol (Tse et al., 2021).

Actualmente, la producción industrial de bioetanol se divide en tres generaciones según el tipo de materia prima utilizada, de primera generación usa materia prima azucaradas o amiláceas, segunda generación utiliza lignocelulósica y tercera generación usa algas. Los procesos involucrados en todas las generaciones de biocombustibles incluyen: pretratamiento, hidrólisis (aunque no se requiere en la fermentación de la caña de azúcar) y conversión de azúcares en bioetanol mediante fermentación (Figura 1). Algunas materias primas requieren condiciones de pretratamiento (es decir, materia prima lignocelulósica y biomasa de algas) para liberar azúcares fermentables en el medio. Sin pretratamiento, el progreso de la fermentación puede ralentizarse debido a la disponibilidad limitada de azúcares fermentables para el metabolismo (Tse et al., 2021).



Figura 1: Diagrama modificado de flujo general de la producción de bioetanol. (Tse et al., 2021)

3.3 La fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso metabólico de conversión de un sustrato orgánico por la acción de enzimas. La definición simplificada de fermentación alcohólica establece que es

la conversión de azúcar por levadura en etanol y dióxido de carbono con la liberación de energía, sin embargo, es un proceso bioquímico muy complejo en el que los azúcares de bajo peso molecular se convierten por la acción de cepas de levadura en alcohol y CO₂ como producto principal de la fermentación alcohólica (Walker & Walker, 2018).

En cuanto a la ruta biosintética de la sacarosa se conoce que la levadura *S. cerevisiae* puede procesar la sacarosa (el azúcar principal del jugo de caña y la melaza) mediante una enzima llamada invertasa, producida por el gen *SUC2*, el cual descompone la sacarosa fuera de la célula. Esta reacción genera glucosa y fructosa, que luego ingresan a la célula a través de proteínas transportadoras especiales. Estas proteínas son producidas por los genes de la familia *HXT* (Basso et al., 2011), la vía para la producción de etanol a partir de glucosa en la levadura (conocida como glucólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas, EMP), produce 2 moles de ATP a partir de un mol de glucosa. Parte del ATP producido por la glucólisis se utiliza posteriormente para producir biomasa celular. En condiciones anaeróbicas, el 93 % de la glucosa utilizada se convierte en etanol y otros productos de bajo peso molecular, mientras que el 7 % restante se convierte principalmente en biomasa celular (Semkiv et al., 2016)

3.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Según lo mencionado por (Niknejad et al., 2015), esta levadura es conocida principalmente por su papel en la fermentación tradicional o industrial del pan, la cerveza o el vino. En relación con la fermentación alcohólica, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza preferentemente el azúcar mediante fermentación anaeróbica para producir etanol y CO₂, incluso cuando hay oxígeno disponible para la respiración aeróbica (Bai et al., 2022). *S. cerevisiae* es relativamente fácil de cultivar en diferentes tipos de medios en condiciones de laboratorio, lo que permite la evaluación de muchos fenotipos y la construcción de diferentes tipos de fábricas celulares. Generalmente, *S. cerevisiae* no necesita un medio complejo para el crecimiento y se puede cultivar en medios líquidos y sólidos. (Zhang et al., 2023).

3.4.1 Ventajas de usar de *S. cerevisiae*

Tal como señala (Massoud et al., 2019) esta levadura como subproducto de la industria de la fermentación en grandes cantidades, se utiliza ampliamente en la producción de bebidas y alimentos. Una de sus principales ventajas son su fácil cultivo a gran escala, su fácil crecimiento mediante métodos no fermentativos, el uso de medios económicos, la fácil manipulación a nivel molecular y la alta producción de biomasa. Por otra parte, el uso de esta levadura para eliminar metales pesados de los alimentos es una biotecnología valiosa, prometedora y rentable. *S. cerevisiae* generalmente se considera seguro para el consumo humano.

3.5 Parámetros de cultivo que afectan la producción de etanol.

Dentro de los diversos factores que influyen en la producción de etanol se encuentran los compuestos volátiles generados durante la fermentación, la cepa de levadura empleada, la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes. Estos parámetros actúan de manera integrada sobre el metabolismo microbiano, modulando tanto la velocidad de fermentación como el rendimiento final del proceso. A continuación, se presenta una descripción detallada de cada uno de estos factores y su influencia en la eficiencia fermentativa.

3.5.1 pH

En relación al pH, se puede mencionar que, aunque la mayoría de las cepas de levadura pueden crecer a valores de pH entre 2,5 y 8,5, son organismos acidófilos, y el rango de pH óptimo puede variar de pH 4,0 a 6,0, dependiendo de la temperatura, la presencia de oxígeno y la cepa de levadura. Es decir, que el valor de pH influye en el crecimiento de la levadura y el rendimiento de la fermentación al alterar la permeabilidad celular y la estructura de la pared celular.(Sun et al., 2021) que las levaduras tienen la ventaja de soportar, medios más ácidos, que otros microorganismos, lo que es aprovechado en los procesos industriales para

mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato(Suárez-Machín et al., 2016)

Según estudios realizados por Rubio M (2008) registran que evaluaron rangos de pH, encontrando que el pH óptimo para la levadura *S. cerevisiae* está entre 3.5 y 5.0, esta tolerancia a pH puede deberse a dos tipos de anti-transportadores de Na^+/H^+ que posee la levadura.(Rubio M et al., 2008)

3.5.2 Temperatura

Otro parámetro crítico en la cinética de crecimiento en *S. cerevisiae* es la temperatura en el medio de cultivo. Según, Liszkowska & Berlowska, (2021) informa que la temperatura óptima de crecimiento para esta levadura está entre 20 y 30 °C. Sin embargo, Serra et al. (2005) estudió temperaturas entre 20 y 40 °C para determinar el rango óptimo de crecimiento de *S. cerevisiae*. Los resultados indicaron que el mayor rendimiento se obtuvo entre 33-34 °C, con una producción de biomasa de aproximadamente 0,25 g/L/h en este intervalo. Temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo.(Suárez-Machín et al., 2016). Considerando este hecho, la temperatura en fermentación alcohólica tiene un impacto significativo en el crecimiento y metabolismo de la levadura.

En su estudio (Ccopa Rivera et al., 2017) expresa que realizó una serie de experimentos de fermentación por lotes utilizando temperaturas de 24, 27, 30, 33 y 36 °C y diferentes concentraciones iniciales de biomasa y sustratos. La productividad de etanol en todas las fermentaciones resultó típicamente en valores altos (siendo 10.4 g/L/h el nivel más alto) debido a la rápida conversión de azúcares en etanol y otros coproductos. Las condiciones de fermentación a 24 °C con una baja concentración de sustrato fueron desfavorables para la conversión a etanol, lo que resultó en una menor productividad (9.8 g/L/h) y rendimiento (84 %). Por el contrario, una temperatura de 33 °C resultó en una mayor productividad y rendimiento.

Sin embargo, (Torija et al., 2003) evaluó fermentaciones de *S. cerevisiae* entre 15-35°C, encontrando que a bajas temperaturas (15-20°C) hubo una fase estacionaria prolongada sin declive celular, pero con inicio lento. En contraste, a 25-30°C se alcanzaron poblaciones máximas de levadura, pero con mayor velocidad inicial. A 35°C, la fermentación omitió la fase de latencia y mostró un rápido crecimiento exponencial, aunque con menor viabilidad (porcentaje de viabilidad) celular. Pese a que la duración total y población máxima fueron similares en todos los casos, las altas temperaturas (35°C) presentaron un consumo más lento de azúcares debido a la mortalidad celular acelerada. En cambio, las bajas temperaturas (15-20°C), a pesar de su inicio más lento, consumieron los azúcares más eficientemente gracias a la estabilidad de la biomasa durante todo el proceso.

3.5.3 Nutrientes esenciales para el desarrollo *S. cerevisiae*

Para optimizar el crecimiento de la levadura, es fundamental determinar los requerimientos nutricionales de la cepa utilizada. Entre los macronutrientes más importantes se encuentran las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Dentro de las fuentes de carbono más comunes se encuentran la sacarosa, glucosa y fructuosa, las cuales proporcionan energía y precursores metabólicos para su crecimiento. No obstante, el alto costo de estos sustratos carbonados puede representar una limitante importante en procesos fermentativos (Mejía-Barajas et al., 2016). Por esta razón, en la actualidad se han investigado diversas fuentes de carbono alternativas y naturales, como la caña de azúcar, el sorgo dulce y la remolacha azucarera (Monteiro et al., 2018). Sin embargo, estas fuentes de medios complejos pueden limitar el desarrollo óptimo de la levadura, por carecer de otros nutrientes importantes. Por ello, es recomendable suplementar el medio de cultivo con fuentes nitrogenadas, ya que estas reducen significativamente el tiempo de fermentación alcohólica (Ojeda et al., 2012).

3.5.4 El jugo de caña como fuente de carbono para la levadura

La caña de azúcar contiene entre un 70 % y 72 % de agua, que incluye un 13 % de sacarosa y un 1,5 % de otros azúcares reductores, como la glucosa y la fructosa, por otra parte, se menciona que también contiene azúcares orgánicos en forma de sólidos solubles, como almidón, proteínas, ceras y gomas, cuya concentración varía entre el 0,85 % y el 1,45 % (Murjani et al., 2023). Es por ello que la caña de azúcar, con su alto contenido de sacarosa y sus eficientes tasas de conversión, se perfila como una importante materia prima para biocombustibles. Durante la fermentación, el jugo de caña de azúcar extraído se mezcla con levadura en grandes tanques de fermentación, donde los azúcares se convierten en etanol y dióxido de carbono. El proceso de fermentación suele durar de 24 a 48 horas, después donde la concentración de etanol en la mezcla alcanza alrededor del 10%-15% (Wenying Hong & Wenzhong Huang, 2024).

En resumen, el gran contenido de sacarosa del jugo de caña proporciona un medio para el crecimiento microbiano. La degradación conduce a la pérdida de sacarosa con la formación de ácido orgánico y etanol causado por microbios. Estos convierten la sacarosa en polisacáridos como las dextrinas. Debido a estos microorganismos, la fermentación ocurre por interacción con carbohidratos que hacen que el jugo sea desfavorable para el consumo humano. (Mukhtar et al., 2022).

El jugo de caña de azúcar ha sido un foco recurrente en la investigación científica por su versatilidad y abundancia, siendo empleado en diversos estudios para explorar su potencial. Por ejemplo, la investigación realizada por de Souza et al., (2015) evaluó la composición mineral de tres variedades de caña de azúcar provenientes de distintas zonas del noreste de Brasil y su influencia en el desempeño fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados mostraron que los medios con mayor concentración de minerales, como magnesio y manganeso, produjeron mayores cantidades de etanol (57,9 g/L y 59,0 g/L, respectivamente)

Sin embargo, Monteiro et al., (2018) comparó diferentes cultivos azucareros como la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el sorgo dulce que son las principales materias primas

utilizadas en la producción industrial de bioetanol en la actualidad. Los resultados mostraron que utilizar la caña de azúcar aumenta la producción de etanol una concentración 25 °Brix la levadura *S. cerevisiae* CAT-1 obtuvo un 5% más de producción de etanol en cuanto a la levadura PE-2. En consecuencia, estos estudios evidencian que el jugo de caña de azúcar, por su versatilidad, es una materia prima sostenible con amplio uso en biotecnología e industrias.

3.6 Urea como fuente de nitrógeno

La urea es considerada una fuente de nitrógeno muy apropiada, debido a su rápida absorción, translocación y asimilación y por su amplio y adecuado espectro de pH en solución, por ende es una fuente de nitrógeno rentable y ampliamente utilizada, que ofrece una alternativa más económica a los alimentos proteicos como la harina de soja debido a su gran degradabilidad ruminal y su menor precio (Ma & Faciola, 2024).

En este sentido, se puede resaltar que *S. cerevisiae* puede utilizar la urea como fuente de nitrógeno degradándola en dos pasos a amoníaco y CO en la producción de etanol. Según estudios realizados por (X. Yang et al., 2021), utilizaron un contenido de nitrógeno (N) de la urea de 0.5 g/L. La presencia de urea incrementó el crecimiento de la levadura, así mismo, el rendimiento de etanol por glucosa fue mayor en el medio de fermentación preparado con urea en un 30% (de 0,88 g/L/h con amonio a 1,14 g/L/h con urea).

Sin embargo, Tareen et al. (2021) investigaron el uso de urea como fuente de nitrógeno para la producción de etanol mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae* SC90. Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de urea (1, 2, 4 y 7 g/L) en la producción de etanol. Los resultados demostraron que las concentraciones de 1 y 2 g/L generaron el mayor rendimiento, alcanzando 70 g/L de etanol. Por el contrario, al incrementar la concentración a 4 g/L de urea, se observó una disminución significativa en la producción (50 g/L). Estos hallazgos indican que concentraciones superiores a 1 g/L de urea no evidencian mejoría en la producción de etanol.

3.7 Fermentación en medios complejos

El uso de jugo de caña como medio complejo para la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* presenta características particulares que pueden influir en la producción de biomasa. Por un lado, el alto contenido de sacarosa y azúcares reductores en el jugo suministra fuentes inmediatas de carbono que favorecen el crecimiento de la levadura (Muller et al., 2023). Por otro lado, la presencia de minerales, nitrógeno inorgánico y otros oligoelementos en medios derivados de caña contribuye a optimizar la fisiología de *S. cerevisiae*, lo que implica una mayor viabilidad y proliferación celular (Elidório et al., 2023). No obstante, condiciones extremas de alta gravedad del medio (alto contenido de azúcar en el jugo de caña) pueden desencadenar estrés osmótico en la levadura, reduciendo la generación de biomasa a favor de rutas metabólicas alternativas como la producción de glicerol (Monteiro et al., 2018).

En ese sentido, el medio complejo basado en jugo de caña exige un cuidadoso balance de nutrientes y condiciones de inoculación para maximizar tanto la biomasa como el rendimiento fermentativo. La adecuada disponibilidad de nitrógeno mejora el crecimiento y con ello la acumulación de biomasa antes de la etapa fermentativa intensiva (Elidório et al., 2023). Por tanto, la composición del medio de jugo de caña se posiciona como un factor clave para modular la biomasa de *S. cerevisiae* y, en consecuencia, influir en el comportamiento general del proceso fermentativo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Lugar de la investigación

La investigación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Tecnológicas en la Universidad Nacional de Agricultura, municipio de Catacamas, Olancho, Honduras, Barrio el Espino, carretera que conduce hacia Dulce Nombre de Culmí.

4.2 Materiales y equipos

Tabla 1: *Materiales, instrumentos, equipos y reactivos utilizados*

Instrumentos	Equipo	Materiales	Reactivos
Beaker	Autoclave All American	Algodón	Urea
Matraz Erlenmeyer (250 mL)	Refractómetro Milwaukee MA871	Gasas	Dicromato de potasio
Probetas	Balanza digital OHAUS Explorer	Papel aluminio	Ácido sulfúrico
Embudo	Termómetro	Papel toalla	Cloruro de sodio
Punta de micropipetas	Horno de laboratorio	Cinta adhesiva	Hidróxido de sodio 0.1 N
Micropipetas	Incubadora termostática biobase modeloBJPX-200B	Marcador	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pipetas	pH metro OHAUS Sarter2100		Azul de metileno
Pinzas	Microscopio		

Tubos de ensayo	Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific™ Evolution™201/220		
Tubos de centrifuga			
Vaso de precipitado			
Gradillas			
Balones			
Bote de almacenamiento			

4.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.3.1 Factores de estudio

La investigación se centró en dos factores clave: temperatura y concentración de urea. Se evaluaron cuatro niveles de temperatura (29°C, 32°C, 35°C y 38°C) y tres concentraciones de urea (0.5 g/L, 1.5 g/L y 2.5 g/L). Con el objetivo de optimizar y determinar el impacto combinado de estos factores en la producción de etanol, incluyendo la productividad volumétrica y específica (Liszkowska & Berlowska, 2021);(Serra et al., 2005); (X. Yang et al., 2021); (Tareen et al., 2021).

4.3.2 Variables respuestas

- Biomasa
- Etanol
- Velocidad específica de crecimiento
- Grados Brix

- pH
- Productividad volumétrica de producto
- % viabilidad celular
- Productividad específica de producto

4.3.3 Diseño y análisis estadístico

El diseño de investigación se basó en un enfoque cuantitativo y experimental, por los cuales se evaluaron cuatro niveles de temperaturas y tres concentraciones de urea las cuales se clasificaron en niveles bajo, medio y alto.

El experimento inicialmente planteado fue un diseño factorial completo de 4x3 considerando dos factores siendo uno de ellos temperatura (29°C, 32°C, 35°C y 38°C) y concentración de urea (0.5 g/L, 1.5 g/L y 2.5 g/L) lo que resultó en un total de 12 combinaciones, sin embargo, debido a limitaciones de tiempo y recursos se optó por reducir el número de corridas experimentales, aplicando un diseño óptimo D (D-optimaldecim) utilizando el programa estadístico Minitab, resultando en un total de 6 combinaciones, en el cual cada muestra se realizara por duplicado, tal como se muestra en la tabla 1. Posteriormente, se evaluarán los resultados experimentales mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando el software estadístico Statgraphics. Además, se realizará una prueba de comparación múltiple de Tukey para analizar las diferencias entre los tratamientos.

Tabla 2: Descripción del diseño experimental

Tabla descriptiva del diseño de investigación			
No.	Temperatura	Concentración de urea	No. de corrida experimental
1	A	0	C1
2	A	1	C2

3	B	-1	C3
4	C	0	C4
5	D	-1	C5
6	D	1	C6

En este estudio, las variables experimentales se han distribuido de la siguiente manera: el primer factor, correspondiente a la temperatura, se estableció en cuatro niveles: A: 29 °C, B: 32 °C, C: 35 °C y D: 38 °C. El segundo factor, relacionado con la concentración de urea, se definió en tres niveles: siendo el nivel bajo (0.5 g/L, codificado como -1), nivel medio (1.5 g/L, codificado como 0) y nivel alto (2.5 g/L, codificado como 1). El objetivo del análisis es optimizar la variable de respuesta, determinada por la producción de etanol, evaluando el impacto de estos factores en el rendimiento del proceso de fermentación.

4.3.4 Medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo constituido por jugo de caña de azúcar como fuente principal de carbono a una concentración de 15 °Brix, complementado con concentraciones específicas de urea (g/L) como fuente de nitrógeno (según la condición experimental de la tabla 1). Este medio buscó proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento y desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, optimizando su productividad en procesos fermentativos.

4.3.5 Activación de la levadura

Se activó la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* en forma liofilizada de la marca fermipan. Inicialmente, se preparó un inóculo madre de 2.55 gramos de levadura en 170 ml de medio de cultivo calentado a 35 °C, manteniéndose esta temperatura constante durante 15 minutos. Para posteriormente realizar la dilución de 10 mL a cada matraz para obtener una concentración de 1 g L⁻¹, y de esta manera garantizar una misma cantidad de células al inicio en todas las muestras.

4.3.6 Preparación del medio de cultivo

En la etapa inicial de preparación del medio de cultivo, se preparó 2.5 L de una solución de jugo de caña y urea en un beaker de 3 L. Posteriormente se prepararon 17 matraces de 250 ml, cada uno con 140 ml del medio de cultivo. Estos matraces se esterilizaron en una autoclave a una temperatura de 120 °C y 15 psi durante 20 minutos. Después de la esterilización, se dejaron enfriar y se colocaron en una incubadora termostática biobase modelo BJPX-200B durante aproximadamente 2 horas, hasta alcanzar la temperatura del tratamiento correspondiente según lo expresado en la tabla 1. Una vez completado este período, se agregaron 10 ml de la levadura activada, lo que se obtuvo un volumen total de 150 ml. Finalmente, los matraces se volvieron a colocar en la incubadora para iniciar el proceso de fermentación.

4.3.7 Condiciones de operación

Se realizaron cultivos por lote en una incubadora termostática biobase modelo BJPX-200B con agitación orbital de 150 rpm y con la temperatura correspondiente al tratamiento según lo expresado en la tabla 1. Se trabajó con matraces Erlenmeyer de 250 ml, utilizando un volumen final de 150 ml en cada uno. Con un pH inicial promedio de 6.09.

4.3.8 Muestreo

Durante el proceso de fermentación, se llevó a cabo un muestreo para la construcción de cinéticas de cultivo. Se tomaron muestras cada 3 horas, extrayendo dos matraces Erlenmeyer en cada punto de muestreo. Se utilizaron 16 matraces Erlenmeyer de 250 ml, de los cuales se descartaron 2 matraces Erlenmeyer cada 3 horas para realizar los análisis respectivos.

4.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.4.1 Determinación de la concentración de biomasa

Se determinó la biomasa mediante el uso de un espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220, midiendo la absorbancia a 620 nm como indicador de la densidad celular (Amillastre et al., 2012). Las muestras fueron previamente homogeneizadas y diluidas para asegurar la linealidad de la lectura. Se realizó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones conocidas de células para correlacionar absorbancia y concentración de biomasa (Durango Londoño, 2007)

4.4.2 Determinación de etanol

La concentración de etanol se determinó mediante espectrofotometría, utilizando la oxidación del etanol por dicromato de potasio en medio ácido. Se tomaron 3 mL de las muestras fermentadas, se añadieron 300 µL de NaCl (Cloruro de sodio) a una concentración de 1M y se centrifugaron a 7000 rpm por 15 minutos. Tras extraer el sobrenadante y realizar diluciones con agua destilada, se tomaron 300 µL de la solución diluida, que se mezclaron con 300 mL de solución oxidativa. La absorbancia se midió a 590 nm (Seo et al., 2009), y la concentración de etanol se calculó utilizando la ecuación 1 de calibración basada en una curva con soluciones patrón de etanol. El procedimiento de la solución oxidativa se muestra en el anexo 9.3.

$$\textit{Ecuación 1. } Y = m x + b$$

Donde

y = absorbancia

m = pendiente

x = % de etanol

b = intercepción

4.4.3 Determinación de viabilidad celular

Se determinó la viabilidad celular utilizando la cámara de Neubauer, empleando cuatro cuadrantes para el conteo. Las muestras celulares fueron tratadas con azul de metileno y depositadas en la cámara. Se realizó un análisis microscópico a 40x, contando células viables y no viables (el procedimiento y la preparación del reactivo se presenta en el Anexo 3). Las células incoloras fueron las células viables y las células azules (teñidas por el azul de metileno) fueron las no viables (Atanasova et al., 2019). La viabilidad se calculó con la ecuación 2

$$\text{Ecuación 2 } \% \text{Viabilidad celular} = \frac{T - C}{T} * 100$$

Donde:

T=Total de células contadas.

C=Células muertas o teñidas de azul oscuro.

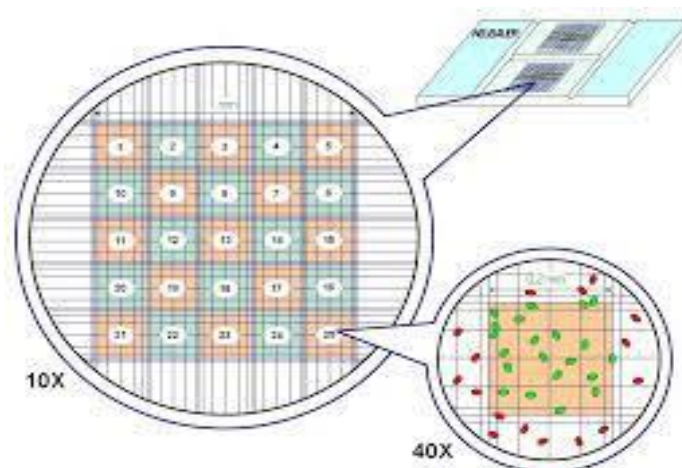


Figura 2: Cuantificación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cámara de Neubauer con el lente 40 X (Atanasova et al., 2019).

4.4.4 Medición de pH

Se procedió a homogeneizar la muestra mediante agitación previa al procedimiento. La determinación se llevó a cabo por duplicado, iniciando con la transferencia de 15 ml de muestra a un vaso de precipitación, seguido de una mezcla cuidadosa. Posteriormente, se introdujo el pH-metro en la muestra, asegurando que no tocarán ni el fondo ni las paredes del recipiente.

4.4.5 Medición de grados Brix

Para determinar los sólidos solubles obtenidos se utilizó un refractómetro portátil. Inicialmente se homogenizó la muestra mediante agitación previa al procedimiento, seguidamente se tomaron 5 mL de cada muestra. Posteriormente, se tomó una gota de la muestra con un gotero o pipeta, la cual se colocó en el refractómetro para su análisis (Thuy et al., 2024).

4.5. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS

4.5.1 Velocidad Específica de Crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) se representa mediante la ecuación diferencial (Ec 3) donde X es la concentración de biomasa y μ es la velocidad específica de crecimiento. Al analizar el cambio en la concentración de biomasa a lo largo del tiempo, se puede estimar la rapidez con la que el microorganismo se reproduce y crece en un medio de cultivo. El modelo logístico integrado (Ec 4). Este modelo permite entender cómo el crecimiento de la biomasa

es rápido en las primeras etapas, pero disminuye gradualmente a medida que se acerca a su límite máximo, debido a la competencia por los recursos disponibles en el medio de cultivo.

$$\frac{dX}{dt} = \mu x \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right)$$

Ecuación 4.
$$x = \frac{x_0 * e^{\mu * t}}{1 - \left(\frac{x}{x_{max}}\right) (1 - e^{\mu * t})}$$

Donde:

X: concentración final de biomasa

t: es el tiempo de la medición

X₀: Concentración inicial de biomasa

e: es la base del logaritmo natural

μ: es la velocidad específica de crecimiento

X_{max}: es la concentración máxima de biomasa alcanzada en la condición evaluada

4.5.2 Productividad Volumétrica de producto. (Q_p)

La productividad volumétrica de producto, denotada como Q_p, se calcula como expresa en la ecuación 5. Esta expresión sirve para valorar la eficiencia con que se produce etanol considerando el tiempo total de lote en un proceso de fermentación, y la generación del producto, de modo que representa la eficacia del proceso dentro de un volumen determinado de medio de cultivo.

Ecuación 5:
$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{t_f - t_0}$$

Donde:

P₀: Producto inicial.

P_f: Producto final

t₀: Tiempo inicial

t_f: Tiempo final

4.5.3 Productividad específica de producto. (q_P)

La productividad específica de producto, denotada como q_P , se calcula mediante lo expresado en la ecuación 6. Esta medida indica cuánto producto se genera por unidad de biomasa en un intervalo de tiempo dado, lo que permite juzgar la eficiencia del microorganismo para producir etanol u otros compuestos a lo largo de la fermentación.

$$\text{Ecuación 6: } q_P = \frac{Q_P}{X}$$

Donde:

Q_P: Productividad volumétrica de producto

X: Concentración de biomasa final

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Crecimiento de Biomasa

En la Figura 3 se reflejan los resultados del crecimiento de biomasa de *S. cerevisiae* para todos los tratamientos en un medio de cultivo complejo de jugo de caña, con diferentes concentraciones de urea, durante un periodo de 24 horas. Los resultados muestran la influencia combinada de la temperatura y la concentración de urea. Se puede observar que el tratamiento con una temperatura de 29 °C y una concentración de urea de 2.5 g L⁻¹ presentó la mayor concentración de biomasa, alcanzando 9.48 g L⁻¹ a las 18 horas. Por el contrario, con una concentración de urea de 1.5 g L⁻¹ a la misma temperatura, la biomasa fue menor, con un máximo de 7.25 g L⁻¹ a las 21 horas. Esto evidencia la influencia significativa de la urea en el crecimiento celular. Estudios como el de (H et al., 2018) también alcanzaron su máximo de biomasa a las 24h, alcanzando 7.91 g/L. Por otra parte, bajo condiciones de temperatura de 32 °C y 0.5 g L⁻¹ de urea presentó el valor menor de biomasa (4.92 g L⁻¹) en un tiempo de 18 horas. En consecuencia, que la mayor concentración de biomasa se alcanzara con 2.5 g L⁻¹ de urea indica que esta fuente nitrogenada es fácilmente asimilable, lo que favorece la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros metabolitos esenciales para el crecimiento microbiano (H et al., 2018)

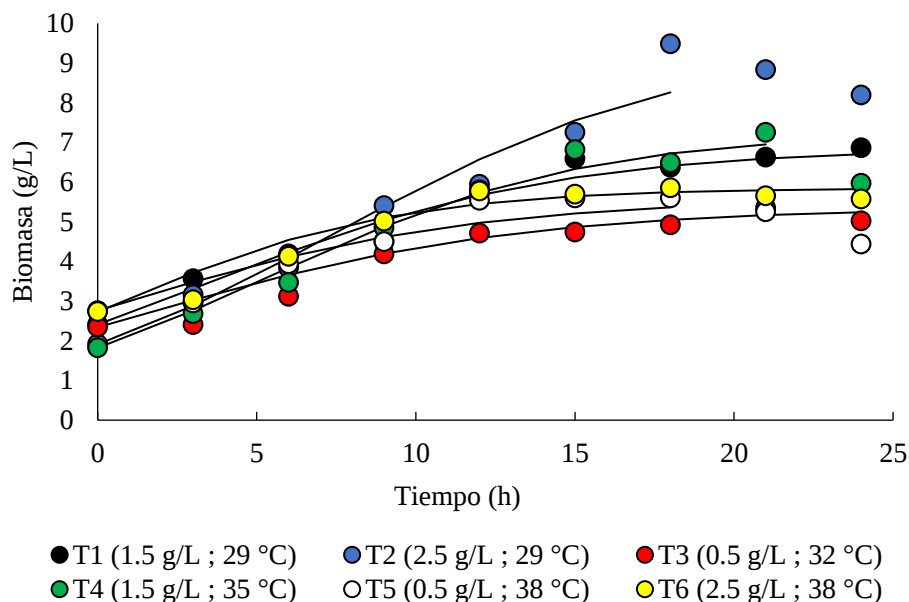


Figura 3: Evaluación del crecimiento de biomasa mediante modelo cinético en *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea.

5.2 Consumo de sólidos solubles

En la Figura 4 se muestra la evolución del contenido de sólidos solubles (°Brix) durante la fermentación alcohólica del jugo de caña a lo largo de 24 horas. Todas las condiciones evaluadas se ajustaron a 15 °Brix para iniciar el proceso de fermentación. Durante las primeras tres horas, los valores de °Brix se mantienen elevados en todos los tratamientos; posteriormente, se observa un descenso más pronunciado en aquellos que contienen 2.5 y 1.5 g L⁻¹ de urea, alcanzando un valor mínimo cercano a 5 °Brix. Estos tratamientos corresponden a los que presentaron los mayores valores de biomasa (Figura 3). En contraste, el tratamiento con 0.5 g L⁻¹ de urea a 32 °C alcanzó un valor final de 7.25 °Brix, reflejando la menor producción de biomasa (Figura 3). Otros estudios, como el de (Resende Oliveira et al., 2018), también lograron un valor final de 5 °Brix en un medio de jugo de caña de azúcar, respaldando la relación positiva entre el consumo de sacarosa. Además, parte del azúcar permanece en el medio de cultivo porque las células de la levadura pueden quedar limitadas en nutrientes esenciales como el nitrógeno asimilable, así mismo, niveles elevados

de azúcares iniciales reducen la eficacia para consumir completamente la sacarosa (Sica et al., 2025)

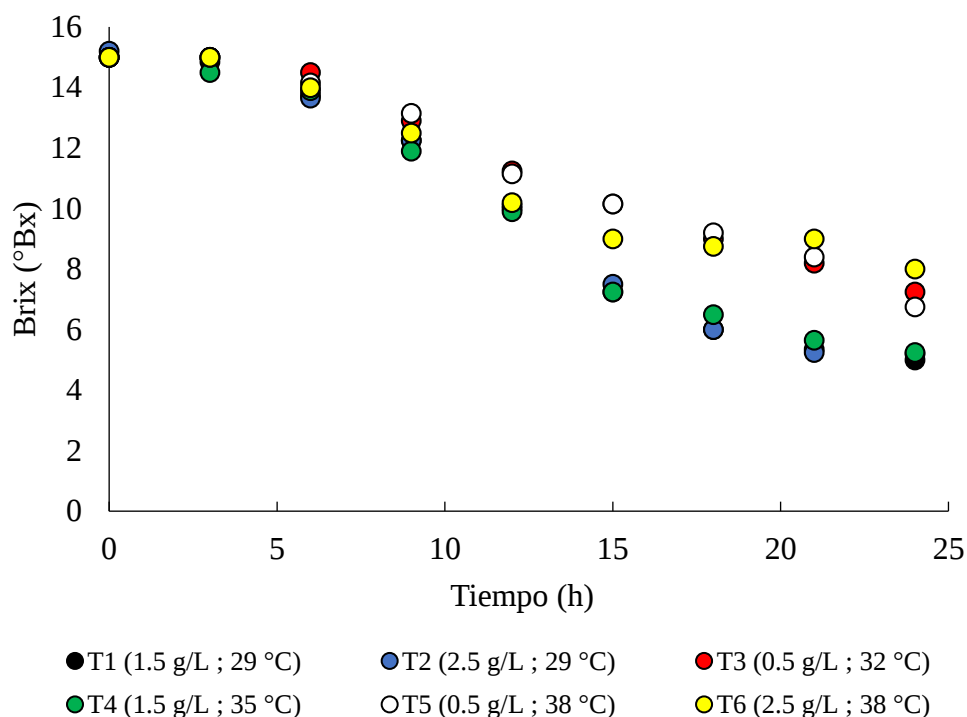


Figura 4: Consumo de solidos solubles (°Brix) en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea

5.3 Producción de etanol

En la Figura 5 se muestra la producción de etanol (%) durante el proceso fermentativo en un medio de jugo de caña suplementado con diferentes concentraciones de urea, a lo largo de un periodo de 24 horas. Se observa que el tratamiento con 0.5 g/L de urea y una temperatura de 32 °C alcanzó un 18.12 % (v/v) de etanol a las 15 horas, siendo el valor más alto en comparación con los demás tratamientos, sin embargo, bajo estas condiciones se registraron las menores concentraciones de biomasa (Figura 3), de hecho, a 15 °Brix el máximo teórico de etanol está alrededor de 8–10 % (v/v) para fermentaciones típicas de jugo de caña en Brasil (Douradinho et al., 2023), Sin embargo, (Tesnière et al., 2013) expresan que la limitación de nitrógeno impulsa la desviación del metabolismo microbiano hacia la producción de etanol

más que al crecimiento celular. Resultados como los de (Monteiro et al., 2018) muestran que en medio de jugo de caña suplementado con urea (0.9 g/L) alcanzaron una producción máxima de etanol de 17.4% (v/v), por lo tanto, se asimila con los resultados de este estudio logrando 18.12% (v/v) de etanol. Esto ocurre porque concentraciones bajas de urea (0.15, 0.25 y 0.5 g/L) limitan la disponibilidad de nitrógeno, lo que reduce la síntesis de proteínas y, en consecuencia, el crecimiento celular. Al no poder destinar carbono a la formación de nueva biomasa, la levadura redirige ese flujo hacia la vía fermentativa, aumentando la producción de etanol (R. Yang, 2017)

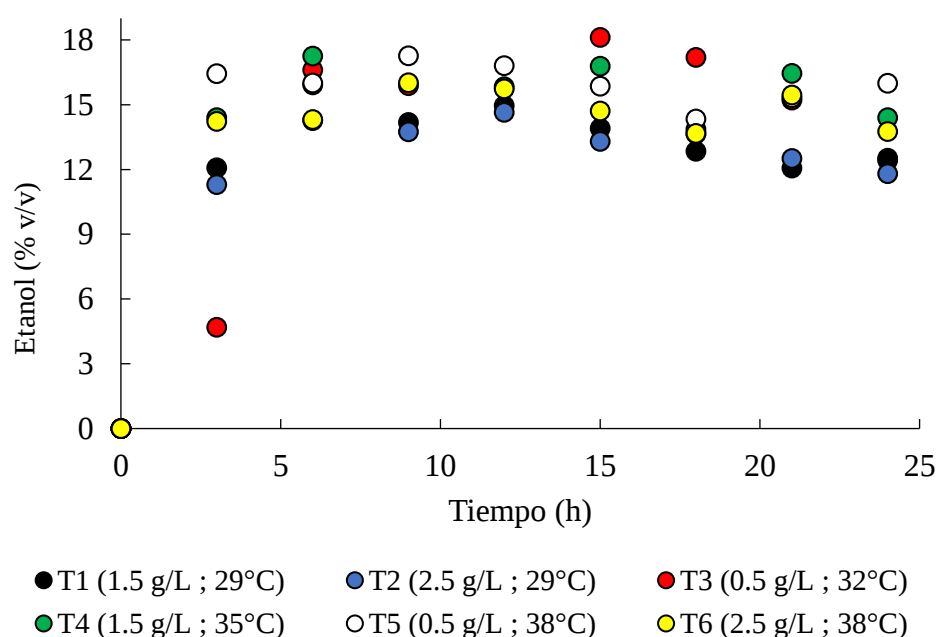


Figura 5: % (v/v) de etanol en función del tiempo en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea

5.4 Comportamiento de la viabilidad celular

En la figura 6 se presenta los resultados de la viabilidad celular en porcentaje durante una fermentación con *S. cerevisiae* y diferentes concentraciones de urea en un medio de jugo de caña con una duración de 24 horas. El tratamiento con 0.5 g/L de urea y una temperatura de 32° C alcanzo un máximo de 94% de células viables a las 15 horas, a este mismo tiempo se

presenta el máximo de etanol producido con un 18.12% (v/v) (figura 5), sin embargo, bajo estas condiciones se muestran las menores concentraciones de biomasa (figura 3). En consecuencia, bajo condiciones de temperatura de 29 °C y 2.5 g/L de urea la viabilidad celular logra alcanzar 72.10% a las 15 horas, en este sentido, Shailaja et al. (2022) explican que la biomasa representa la suma total de células presentes sin importar su estado vital, sin embargo, la viabilidad se enfoca en identificar la cantidad de células vivas y metabólicamente activas. Por lo que Tesnière et al. (2013) sugieren que la alta disponibilidad de nitrógeno incrementa el estrés fisiológico y acelera la pérdida de células viables, esto ocurre porque la levadura incrementa su actividad metabólica, lo que eleva el desgaste celular. Ese sobreesfuerzo provoca daños en proteínas y membranas y limita la capacidad de reparación, en consecuencia, acelera la muerte celular. (Vallejo et al., 2020). De manera similar, en un estudio con jugos azucarados se indicó que la adición de nutrientes (urea, fosfato de potasio, sulfato de magnesio) en la fase de propagación mejora la capacidad fermentativa del cultivo y la viabilidad celular, lo cual repercute en un mejor rendimiento de etanol (van Dijk et al., 2020). Así mismo, (Rojo et al., 2023b) evaluaron distintas fuentes de nitrógeno, como el fosfato de amonio y la urea, en un jugo de uva, y se observó que el nitrógeno mejora tanto el crecimiento celular como la eficiencia de la fermentación. Esto confirma que optimizar el aporte de nitrógeno es esencial para mantener una alta viabilidad de la levadura y lograr un buen rendimiento de etanol.

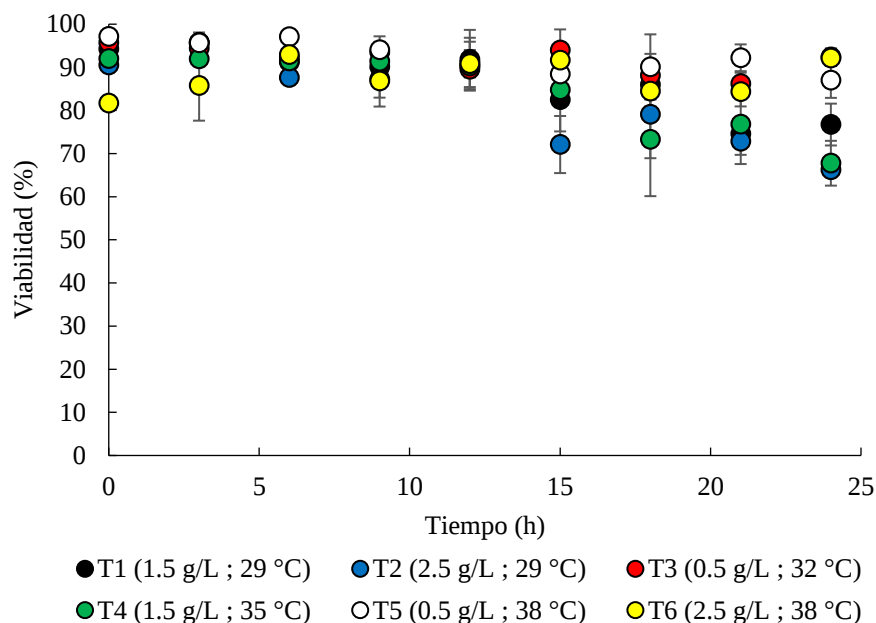


Figura 6: Determinación de viabilidad celular en porcentaje en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea

5.5 Comportamiento del pH

En la Figura 7 se muestra la variación del pH durante 24 horas de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de jugo de caña suplementado con diferentes concentraciones de urea. El tratamiento con una concentración de 2.5 g/L de urea a una temperatura de 38 °C alcanzó un valor promedio de pH de 5.46, mientras que el mismo nivel de urea a 29 °C presentó un promedio de 5.02. Estos resultados evidencian que un incremento en la concentración de urea favorece una mayor estabilidad del pH durante el proceso fermentativo. En contraste, los tratamientos con concentraciones menores de urea mostraron valores promedio de pH inferiores a 5. Estos valores se mantuvieron dentro del rango óptimo de funcionamiento de *S. cerevisiae* (pH 4.0–6.0), lo cual garantiza condiciones favorables para la actividad fermentativa (Wu et al., 2022). De hecho, según la revisión de (Walker & Stewart, 2016) cuando *S. cerevisiae* se emplea en fermentaciones alcohólicas, los nutrientes nitrogenados como la urea tienen un papel clave en la estabilidad del medio y en mantener el pH dentro de rangos funcionales para la levadura. Así mismo, el estudio de (Eliodório et al., 2023) demostraron que en medios modelos de melaza de caña de azúcar, la variación en la

disponibilidad de nitrógeno afecta directamente el rendimiento de etanol y la fisiología de la levadura, lo que respalda que una mayor suplementación con urea permita un mejor mantenimiento del pH.

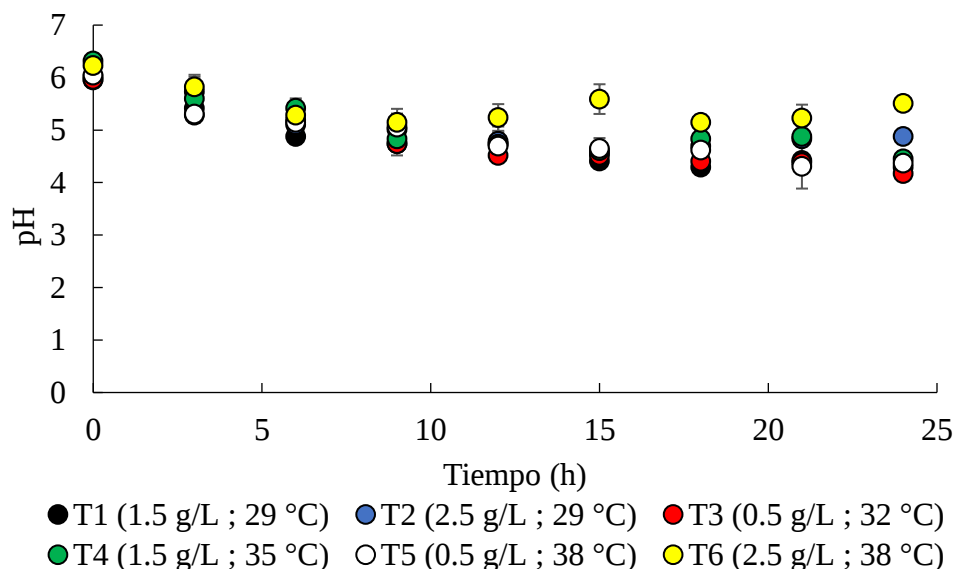


Figura 7: Evaluación del pH en función del tiempo en un medio de jugo de caña con diferentes concentraciones de urea

5.6 Parámetros cinéticos

En la Tabla 2 se presentan los parámetros cinéticos de la fermentación realizada con *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo a base de jugo de caña suplementado con diferentes concentraciones de urea, durante un periodo de 24 horas. En cuanto a la velocidad específica de crecimiento (μ), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, la condición con 2.5 g/L de urea y una temperatura de 38 °C mostró el valor máximo de μ , alcanzando 0.23 h⁻¹. Estos resultados son consistentes con los reportados por (Sriputorn, 2016), quien obtuvo valores similares, registrando una velocidad de crecimiento de hasta 0.25 h⁻¹.

En relación a la productividad volumétrica de producto (Q_p) el tratamiento bajo condiciones de 0.5 g/L de urea y una temperatura de 38 °C obtuvo el valor máximo de 5.26 g/L*h, no

obstante, solo mostró diferencia significativa para T2, evaluado a temperaturas de 29°C y una concentración de urea de 2.5 g/L mostrando un valor de 3.88 g/L*h. Por otra parte, los demás tratamientos no presentaron diferencia significativa entre sí. Resultados similares fueron reportados por (Monteiro et al., 2018), quienes obtuvieron valores entre 4.5 y 4.9 g/L*h en su investigación.

Finalmente, los resultados de la productividad especifican de producto (qp) proyectan que no existe diferencia significativa ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento bajo condiciones 38 °C y 0.5 g/L de urea presentó el valor más alto de qp (1.18 g_{prod}/g_{biomasa}*h). En contraste, T2 registró el valor más bajo (0.35 g_{prod}/g_{biomasa}*h), evidenciando una utilización menos eficiente del sustrato hacia el metabolito de interés.

Tabla 3: Parámetros cinéticos para una fermentación con *S. cerevisiae*.

Tratamiento	μ	Qp	qp
T1	0.18 ± 0.0001^a	4.11 ± 0.1838^{ab}	0.60 ± 0.0495^a
T2	0.18 ± 0.0001^a	3.88 ± 0.1061^b	0.47 ± 0.0071^a
T3	0.17 ± 0.0282^a	4.08 ± 0.0071^{ab}	0.81 ± 0.0003^a
T4	0.20 ± 0.0282^a	4.73 ± 0.3394^{ab}	0.79 ± 0.0141^a
T5	0.17 ± 0.0001^a	5.26 ± 0.3536^a	1.18 ± 0.0424^a
T6	0.23 ± 0.0141^a	4.72 ± 0.2616^{ab}	0.81 ± 0.0283^a

Nota: Medias con letras en común no son significativamente diferentes a partir de pruebas de tukey ($p > 0.05$). T1 (1.5 g/L; 29 °C), T2 (2.5 g/L; 29 °C), T3 (0.5 g/L; 32 °C), T4 (2.5 g/L; 35 °C), T5 (0.5 g/L; 38 °C), T6 (2.5 g/L; 38 °C).

5.7 Optimización de temperatura y concentración de urea

5.7.1 Análisis de la velocidad de crecimiento

En la Tabla 3 se presenta el análisis de varianza y en la Figura 8 el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales para temperatura, concentración de urea y su interacción. El modelo muestra un $R^2 = 32.5397\%$, este valor no se ajusta de una manera confiable, debido a la limitación de esta variable ya que no existe un tratamiento con las mismas condiciones

de estudio. Así mismo, se utilizó un nivel de significancia ($p > 0.05$), ninguno de los efectos resulta significativo por lo que los valores de velocidad de crecimiento no difieren significativamente entre sí en los rangos evaluados. En el diagrama de Pareto (Figura 8(A)) se observa que la urea, así como la combinación las temperaturas, tienen una ligera tendencia a aumentar la velocidad de crecimiento; sin embargo, dicho efecto no alcanza significancia estadística. En relación con la gráfica de efectos principales, se observa que la velocidad de crecimiento se ve favorecida en condiciones de temperatura alta (38 °C) y concentraciones de urea altas (2.5 g/L), aunque no se presenta una diferencia significativa en comparación con los demás factores. Estos resultados se asemejan a los reportados por (Sriputorn, 2016), quienes presentan una composición similar del medio de cultivo, mostrando resultados entre los rangos obtenidos en esta investigación.

Tabla 4: Análisis de Varianza para μ

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0.0002	1	0.0002	0.42	0.5393
B: [] urea	0.000533333	1	0.000533333	1.13	0.3288
AA	0.0006	1	0.0006	1.27	0.3027
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Error total	0.00283333	6	0.000472222		
Total (corr.)	0.0042	11			

$R^2 = 32.5397 \%$

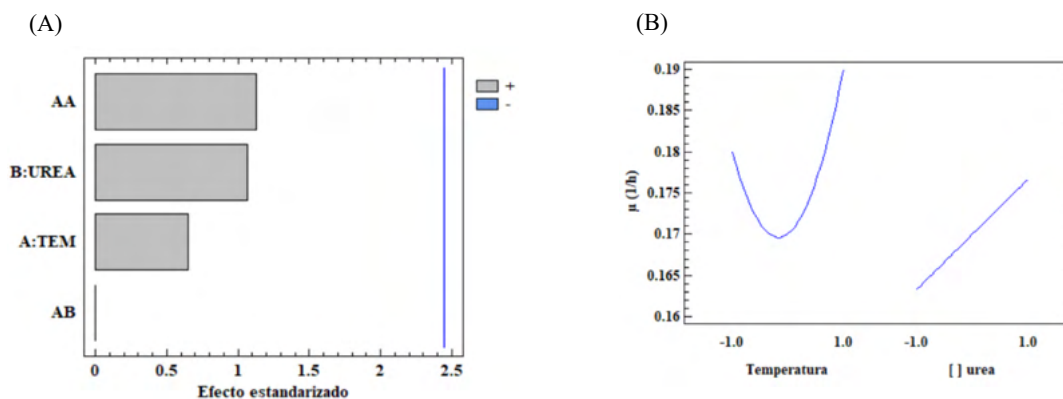


Figura 8: Diagrama de Pareto y grafica de efectos principales para la velocidad específica de crecimiento.

5.7.2 Análisis de % de etanol

En la Tabla 4 se presentan los resultados del análisis de varianza y, en la Figura 9, el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales para la temperatura, la concentración de urea y su interacción. El modelo muestra un $R^2 = 98.5148 \%$, este valor refleja un buen ajuste de las variables estudiadas. Así mismo, se utilizó un nivel de significancia de ($p > 0.05$). El análisis de varianza confirma que existe diferencia significativa entre todos los factores, mostrando valores p menores al nivel de significancia (0.05). Por otra parte, el diagrama de Pareto confirma que las condiciones evaluadas resultan significativas en la producción de etanol (Figura 9(A)). En primera instancia, la combinación del factor temperatura indica que es posible maximizar la producción de etanol; así mismo, este factor, por sí solo, confirma su efecto positivo sobre dicha variable. Por otra parte, el factor urea logra superar el nivel de significancia, demostrando que su incorporación al medio de cultivo favorece una mayor producción; no obstante, la combinación de ambos factores no resulta significativa para esta variable de respuesta. Esto se corrobora con la gráfica de efectos principales (Figura 9(A)), la cual muestra que temperaturas intermedias (35 y 38 °C) y concentraciones bajas de urea (0.5 g/L) tienen una mayor influencia para maximizar la producción de etanol. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que señalan la temperatura como un factor crítico en fermentaciones de etanol. Por ejemplo, en fermentaciones de alto grado de gravedad, una temperatura alrededor de 30-35 °C ha demostrado maximizar el consumo de azúcar y la producción de etanol (Pornpukdeewattana et al., 2014). En relación con la urea, su adición como fuente de nitrógeno ha demostrado ser efectiva para incrementar la productividad de etanol en concentraciones de 0.5 g/L, según lo reportado por (Gómez Cardozo et al., 2023) en su investigación.

Tabla 5: Análisis de Varianza para Etanol máx.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	7.22	1	7.22	68.04	0.0002
B: [] urea	0.986133	1	0.986133	9.29	0.0226

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
AA	13.4101	1	13.4101	126.38	0.0000
AB	0.3698	1	0.3698	3.48	0.1112
Error total	0.636683	6	0.106114		
Total (corr.)	22.6348	11			

$$R^2 = 97.1871 \%$$

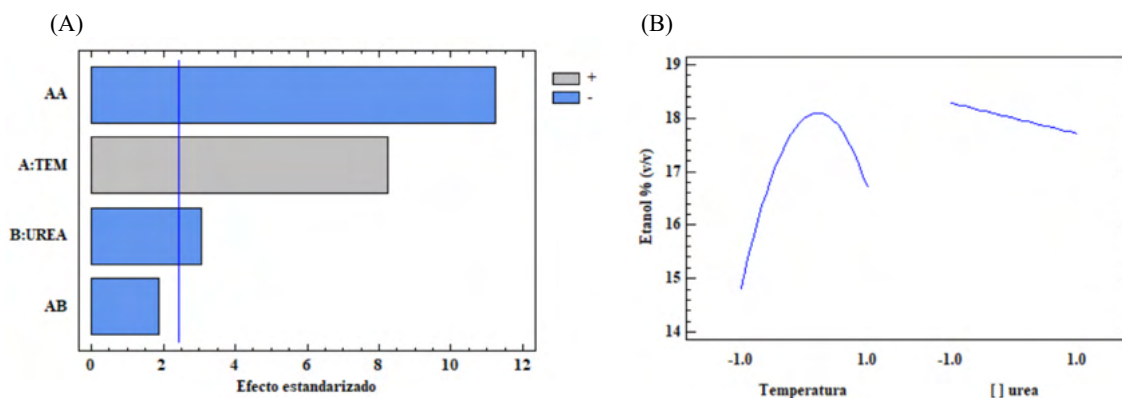


Figura 9: Diagrama de Pareto y grafica de efectos principales para % (v/v) de etanol.

5.7.3 Análisis de biomasa (g/L)

En la Tabla 5 se presentan los resultados del análisis de varianza y, en la Figura 10, el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales para la temperatura, la concentración de urea y su interacción. El modelo muestra un $R^2 = 98.5148 \%$, este valor expresa un ajuste positivo en relación a las variables estudiadas. Así mismo, se utilizó un nivel de significancia de ($p > 0.05$). Para los valores de biomasa máxima, el análisis de varianza indica que los factores son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), lo que evidencia la influencia de estos en el crecimiento de células en el medio. En este sentido, el diagrama de Pareto refuerza estos resultados, mostrando claramente la influencia de los factores sobre el crecimiento de la biomasa; la temperatura es el factor que presenta mayor efecto, seguida de la concentración de urea; en consecuencia, la combinación de ambos factores también resulta significativa para maximizar esta variable. Finalmente, la gráfica de efectos principales muestra que una temperatura inferior (29°C), en conjunto con una concentración alta de urea

(2.5 g/L), coincide con el tratamiento T2, que presentó la mayor producción de biomasa, alcanzando un valor de 9.48 g/L (Figura 4). Estos resultados son coherentes con lo reportado por (Kirrolia et al., 2014), quienes, mediante metodología de superficie de respuesta, identificaron la temperatura y el nitrógeno como variables críticas para maximizar el crecimiento de celular.

Tabla 6: *Análisis de Varianza para Biomasa máx.*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	11.305	1	11.305	195.57	0.0000
B: [] urea	7.8732	1	7.8732	136.20	0.0000
AA	1.2105	1	1.2105	20.94	0.0038
AB	2.61061	1	2.61061	45.16	0.0005
Error total	0.346838	6	0.0578063		
Total (corr.)	23.3537	11			

$R^2 = 98.5148 \%$

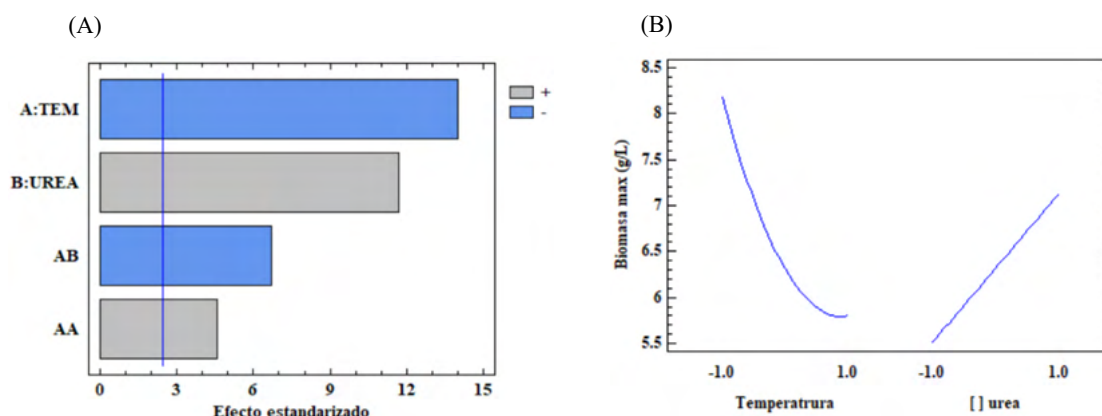


Figura 10: *Diagrama de Pareto y grafica de efectos principales para biomasa (g/L).*

5.7.4 Análisis de superficie de respuesta

La Figura 10 muestra los resultados de la superficie de respuesta para biomasa máxima (A), etanol máximo (B) y velocidad de crecimiento (C). En la gráfica de superficie de respuesta para biomasa máxima (A) se aprecian claramente las condiciones más favorables para el crecimiento celular, evidenciando que, con valores máximos de urea (2.5 g/L) y una temperatura inferior (29 °C), se maximiza la concentración celular (9.48 g/L), resultando la mejor condición para esta variable. Por otra parte, la gráfica de superficie de respuesta para etanol (B) indica que los factores más favorables para maximizar esta variable corresponden a un nivel intermedio de temperatura (32 °C) en combinación con una concentración baja de urea (0.5 g/L), alcanzando un valor de 18.12 % (v/v). Finalmente, la gráfica de superficie de respuesta para la velocidad de crecimiento (C) muestra valores sin diferencias significativas; sin embargo, se observa un ligero incremento bajo condiciones de temperatura alta (38 °C) combinada con una concentración alta de urea (2.5 g/L). Esta condición corresponde al tratamiento T3, que reflejó la velocidad de crecimiento máxima (0.23 ± 0.0141) (Tabla 2). Resultados similares se han reportado en estudios de optimización mediante metodología de superficie de respuesta, donde la temperatura y la fuente nitrogenada se identifican como variables críticas para maximizar la biomasa y los productos fermentativos (Bajwa et al., 2019).

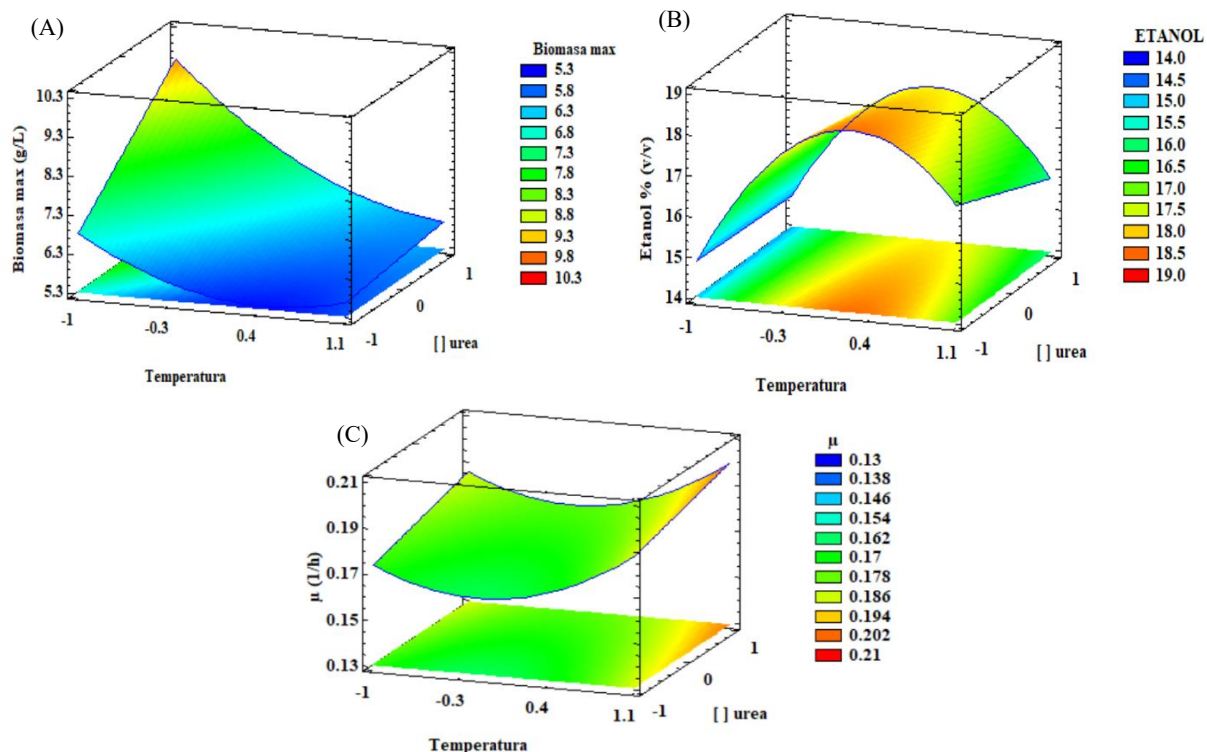


Figura 11: Superficie de respuesta estimada para biomasa (g/L), etanol % (v/v) y velocidad de crecimiento (h^{-1}).

5.7.5 Validación experimental de las condiciones óptimas

Se determinó el efecto de cuatro niveles de temperatura y tres concentraciones de urea para determinar su influencia en la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y maximizar la producción de etanol. Así mismo, se determinó un modelo de regresión múltiple entre los dos factores y los niveles de cada uno de ellos, lo que permitió determinar el valor óptimo de cada modelo. Las ecuaciones siete, ocho y nueve representan el modelo de regresión múltiple para cada variable.

Ecuación 7
$$\text{Biomasa}_{\text{Max}} \text{ (g/L)} = 6.3175 - 1.18875 \cdot \text{Temp} + 0.81 \cdot [\text{] urea} + 0.67375 \cdot \text{Temp}^2 - 0.57125 \cdot \text{Temp} \cdot [\text{] urea}$$

$$\text{Ecuación 8 } \text{Etanol}_{\text{max}} (\%) = 17.995 + 0.95 \cdot \text{Temp} - 0.286667 \cdot [\text{] urea} - 2.2425 \cdot \text{Temp}^2 - 0.215 \cdot \text{Temp} \cdot [\text{] urea}$$

$$\text{Ecuación 9 } \mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = 0.17 + 0.005 \cdot \text{Temp} + 0.00666667 \cdot [\text{] urea} + 0.015 \cdot \text{Temp}^2 + 0.0 \cdot \text{Temp} \cdot [\text{] urea}$$

Tabla 7: Valores óptimos de los factores de estudio en relación a biomasa máxima, etanol máximo y velocidad de crecimiento

Factor	Variable de respuesta		
	Biomasa máx.	Etanol máx.	Velocidad de crecimiento
Temperatura (°C)	29	32	38
[] urea (g/L)	2.5	0.5	2.5

La Tabla 6 presenta la validación experimental de las condiciones óptimas de temperatura y concentración de urea para cada variable de respuesta. Se observa que, para maximizar la biomasa, la mejor combinación corresponde a una temperatura de 29 °C y una concentración de urea de 2.5 g/L, tal como se muestra en la Figura 10 (superficie A), donde estas condiciones proporcionaron a la mayor concentración celular. Por otra parte, el etanol máximo se obtiene a una temperatura intermedia de 32 °C y una concentración baja de urea (0.5 g/L), lo que confirma que la ruta fermentativa se favorece bajo un nivel moderado de estrés nutricional (Monteiro et al., 2018), tal como se evidenció en la superficie de respuesta para etanol (B). En cambio, la velocidad de crecimiento presenta su valor máximo a 38 °C y 2.5 g/L de urea, coincidiendo con el tratamiento T3, aunque sin diferencias estadísticamente señaladas respecto a otras combinaciones (Tabla 2). Este comportamiento pone de manifiesto que las condiciones óptimas no son únicas, sino que dependen de la variable objetivo. Mientras que temperaturas relativamente bajas y alta disponibilidad de nitrógeno favorecen la obtención de mayor biomasa, temperaturas intermedias con limitación de urea promueven la producción de etanol, y temperaturas más elevadas con mayor nitrógeno incrementan ligeramente la velocidad de crecimiento. En este sentido, el modelo de optimización proporciona criterios claros para seleccionar las condiciones de operación en función de la respuesta de interés.

VI. CONCLUSIONES

El estudio mostró que la concentración de urea influye de manera directa en el crecimiento celular. Mayores concentraciones de urea favorece el desarrollo de más biomasa, lo que demuestra que la urea es una fuente de nitrógeno altamente asimilable para *S. cerevisiae*. Sin embargo, concentraciones menores estimularon menos el crecimiento, evidenciando que el aporte nitrogenado es determinante para la actividad metabólica y la proliferación celular.

Por otra parte, la temperatura reflejó un efecto significativo sobre los parámetros cinéticos y la eficiencia de la fermentación. La producción máxima de etanol se vió favorecida bajo temperaturas intermedias (32 °C). En cuanto a la velocidad específica de crecimiento (μ) no hubo influencia por los cambios de temperaturas. Por otra parte, tanto la productividad volumétrica de producto (Q_p) y productividad específica de producto (q_p) reflejaron valores altos con temperaturas por encima de 35 °C con distintos niveles de urea. Estos resultados indican que a temperaturas más altas favorecen la actividad metabólica y que también puede existir un efecto de la combinación de la variación de la concentración de urea.

Finalmente, se identificaron las condiciones óptimas tanto para la producción de etanol como para la concentración de biomasa. En cuanto a la producción de etanol, se determinó que una temperatura de 32 °C combinada con una concentración de urea de 0.5 g/L constituye la condición más óptima. Por otro lado, para maximizar la concentración de biomasa, las condiciones ideales corresponden a una temperatura de 29 °C y una concentración de urea de 2.5 g/L. Esto confirma que el metabolismo de la levadura se orienta hacia la fermentación alcohólica con temperaturas altas y bajo nitrógeno, o hacia la síntesis de biomasa con temperaturas bajas y alto nitrógeno.

VII. RECOMENDACIONES

Se sugiere llevar a cabo nuevamente estas pruebas en un biorreactor, para verificar si las condiciones óptimas de temperatura y urea que se determinaron a escala de laboratorio son igualmente efectivas en una mayor escala.

También se recomienda evaluar diferentes fuentes de nitrógeno aparte de la urea, en medios de cultivo de jugo de caña, para determinar si se pueden lograr resultados superiores en el desarrollo de la levadura y así también en la producción de etanol.

Se propone el estudio diferentes variedades de *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones óptimas encontradas, con el objetivo de identificar las que se adapten de manera más efectiva al jugo de caña y de esta manera obtener niveles más altos de etanol.

Por último, se sugiere implementar estos criterios en la instalación de bioprocesos de la Universidad Nacional de Agricultura, modificando los parámetros de acuerdo a las necesidades específicas de la planta, para optimizar la efectividad del proceso de fermentación y la generación de bioetanol.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abdul Kareem Joyia, M., Ahmad, M., Chen, Y.-F., Mustaqeem, M., Ali, A., Abbas, A., & Ashraf Gondal, M. (2024). Trends and advances in sustainable bioethanol production technologies from first to fourth generation: A critical review. *Energy Conversion and Management*, 321, 119037.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.119037>
- Amillastre, E., Aceves Lara, C. A., Uribelarrea, J. L., Alfenore, S., & Guillouet, S. (2012). Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*.
[file:///C:/Users/anuar/Downloads/amillastre2012%20\(modelo%20dinamico%20T%C2%B0,%20OD\).pdf](file:///C:/Users/anuar/Downloads/amillastre2012%20(modelo%20dinamico%20T%C2%B0,%20OD).pdf)
- Atanasova, M., Yordanova, G., Nenkova, R., Ivanov, Y., Godjevargova, T., & Dinev, D. (2019). Brewing yeast viability measured using a novel fluorescent dye and image cytometer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2019.1593053>
- Bai, F.-Y., Han, D.-Y., Duan, S.-F., & Wang, Q.-M. (2022). The Ecology and Evolution of the Baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 13(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/genes13020230>

- Bajwa, K., Bishnoi, N. R., Kirrolia, A., Gupta, S., & Tamil Selvan, S. (2019). Response surface methodology as a statistical tool for optimization of physio-biochemical cellular components of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* for biodiesel production. *Applied Water Science*, 9(5), 128. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0969-x>
- Basso, T. O., de Kok, S., Dario, M., do Espirito-Santo, J. C. A., Müller, G., Schlögl, P. S., Silva, C. P., Tonso, A., Daran, J.-M., Gombert, A. K., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Stambuk, B. U. (2011). Topología de ingeniería y cinética del metabolismo de la sacarosa en *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar el rendimiento de etanol. *Metabolic Engineering*, 13(6), 694-703. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.005>
- Ccopa Rivera, E., Yamakawa, C. K., Saad, M. B. W., Atala, D. I. P., Ambrosio, W. B., Bonomi, A., Nolasco Junior, J., & Rossell, C. E. V. (2017). Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 119, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.002>
- de Souza, R. B., de Menezes, J. A. S., de Souza, R. de F. R., Dutra, E. D., & de Moraes Jr, M. A. (2015). Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 209-222. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1258-7>
- Douradinho, R., Sica, P., Tonoli, F., Mattos, E., Oliveira, M., Pinto, A., Mota, L., Faria, T., Costa, V. F., Leite, G., Arthur, V., Coelho, S., & Baptista, A. (2023). Osmotic Stress Alleviation in *Saccharomyces cerevisiae* for High Ethanol Fermentations with Different Wort Substrates. *Stresses*, 3(4), 813-826. <https://doi.org/10.3390/stresses3040055>

Durango Londoño, L. P. (2007). *Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo Saccharomyces spp. A nivel de laboratorio.*

<http://hdl.handle.net/10784/399>

Eliodório, K. P., Cunha, G. C. de G. e, Lino, F. S. de O., Sommer, M. O. A., Gombert, A.

K., Giudici, R., & Basso, T. O. (2023). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* during growth on industrial sugar cane molasses can be reproduced in a tailor-made defined synthetic medium. *Scientific Reports*, 13(1), 10567.

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-37618-8>

García-Ríos, E., Pardo, J., Su, Y., & Guillamón, J. M. (2024). Different Nitrogen

Consumption Patterns in Low Temperature Fermentations in the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, 13(16), 2522.

<https://doi.org/10.3390/foods13162522>

Gómez Cardozo, J. R., Beigbeder, J.-B., Dantas, J. M. de M., & Lavoie, J.-M. (2023).

High-Gravity Fermentation for Bioethanol Production from Industrial Spent Black Cherry Brine Supplemented with Whey. *Fermentation*, 9(2), 170.

<https://doi.org/10.3390/fermentation9020170>

Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550-567.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>

H, S., P, T. H., L, D. P., L, D. N., Tt, T. H., & K, B. (2018). Effect of Time, C/N Ratio and

Molasses Concentration on *Saccharomyces cerevisiae* Biomass Production. *Journal of Veterinary and Animal Research*, 1(1), 1-7. [https://doi.org/10.18875/2639-](https://doi.org/10.18875/2639-7315.1.104)

[7315.1.104](https://doi.org/10.18875/2639-7315.1.104)

- Kirrolia, A., Bishnoi, N. R., & Singh, R. (2014). Response surface methodology as a decision-making tool for optimization of culture conditions of green microalgae *Chlorella* spp. For biodiesel production. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1133-1147. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0752-4>
- Liszkowska, W., & Berłowska, J. (2021). Yeast Fermentation at Low Temperatures: Adaptation to Changing Environmental Conditions and Formation of Volatile Compounds. *Molecules*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules26041035>
- Ma, S.-W., & Faciola, A. P. (2024). Impacts of Slow-Release Urea in Ruminant Diets: A Review. *Fermentation*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/fermentation10100527>
- Massoud, R., Hadiani, M. R., Hamzehlou, P., & Khosravi-Darani, K. (2019). Biorremediación de metales pesados en la industria alimentaria: Aplicación de *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 37, 56-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.003>
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojas, C., & Saavedra-Molina, A. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Información tecnológica*, 27(4), 03-16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000400002>
- Monteiro, B., Ferraz, P., Barroca, M., da Cruz, S. H., Collins, T., & Lucas, C. (2018). Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1239-0>
- Mukhtar, K., Nabi, B. G., Arshad, R. N., Roobab, U., Yaseen, B., Ranjha, M. M. A. N., Aadil, R. M., & Ibrahim, S. A. (2022). Impacto potencial del ultrasonido, campo

- eléctrico pulsado, procesamiento a alta presión y microfludización sobre la conservación de los tratamientos térmicos en jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 90, 106194.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106194>
- Muller, G., de Godoy, V. R., Dário, M. G., Duval, E. H., Alves-Jr, S. L., Búcker, A., Rosa, C. A., Dunn, B., Sherlock, G., & Stambuk, B. U. (2023). Improved Sugarcane-Based Fermentation Processes by an Industrial Fuel-Ethanol Yeast Strain. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(8), 803. <https://doi.org/10.3390/jof9080803>
- Murjani, B. O., Suryavanshi, A. A., Dhembare, S. B., Patil, I. P., Patil, P. T., Sonawane, H. P., & Pandit, A. B. (2023). Approaches and Technologies for Preservation of Sugarcane juice: A Review. *Journal of Food Engineering and Technology*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.32732/jfet.2023.12.2.35>
- Niknejad, F., Nabili, M., Daie Ghazvini, R., & Moazeni, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles: Advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Current Medical Mycology*, 1(3), 17-24.
<https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.1.3.17>
- Ojeda, Á., Reyes, M., & Rodríguez, W. (2012). Efecto de la liberación controlada de nitrógeno sobre la fermentación y la degradabilidad in situ de *Cynodon dactylon*. *Revista MVZ Córdoba*, 17(3), 3133-3139.
- Pornpukdeewattana, S., Chalearmkit, P., & Iamsamang, P. (2014). *Optimization of Fermentation Temperature for Very High Gravity Ethanol Production using Industrial Strain of Saccharomyces cerevisiae SC90*.
https://thaiscience.info/journals/Article/TSTJ/10958948.pdf?utm_source

- Resende Oliveira, É., Caliari, M., Soares Soares Júnior, M., Ribeiro Oliveira, A., Cristina Marques Duarte, R., & Valério de Barros Vilas Boas, E. (2018). Assessment of chemical and sensory quality of sugarcane alcoholic fermented beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 72-81. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2792-4>
- Rojo, M. C., Talia, P. M., Lerena, M. C., Ponsone, M. L., Gonzalez, M. L., Becerra, L. M., Mercado, L. A., Martín-Arranz, V., Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., & Combina, M. (2023a). Evaluation of different nitrogen sources on growth and fermentation performance for enhancing ethanol production by wine yeasts. *Heliyon*, 9(12), e22608. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22608>
- Rojo, M. C., Talia, P. M., Lerena, M. C., Ponsone, M. L., Gonzalez, M. L., Becerra, L. M., Mercado, L. A., Martín-Arranz, V., Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., & Combina, M. (2023b). Evaluation of different nitrogen sources on growth and fermentation performance for enhancing ethanol production by wine yeasts. *Heliyon*, 9(12), e22608. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22608>
- Rubio M, A., Hernández E, M., Aguirre R, A., & Poutou P, R. (2008). IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR IN VITRO DE PROPIEDADES PROBIÓTICAS EN CEPAS DE *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 13(1), 1157-1169.
- Sasmal, S., Roy Chowdhury, S., Podder, D., & Haldar, D. (2019). Urea-Appended Amino Acid To Vitalize Yeast Growth, Enhance Fermentation, and Promote Ethanol Production. *ACS Omega*, 4(8), 13172-13179. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01260>
- Semkiv, M. V., Dmytruk, K. V., Abbas, C. A., & Sibirny, A. A. (2016). Activation of futile cycles as an approach to increase ethanol yield during glucose fermentation in

Saccharomyces cerevisiae. *Bioengineered*.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21655979.2016.1148223>

Seo, H.-B., Kim, H.-J., Lee, O.-K., Ha, J.-H., Lee, H.-Y., & Jung, K.-H. (2009).

Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 285-292. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0497-4>

Serra, A., Strehaiano, P., & Taillandier, P. (2005). *Influence of temperature and pH on*

Saccharomyces bayanus var. *Uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters.

[file:///C:/Users/anuar/Downloads/Serra%202005%20punto%20de%20partida%20\(OD%20metodo\).pdf](file:///C:/Users/anuar/Downloads/Serra%202005%20punto%20de%20partida%20(OD%20metodo).pdf)

Shailaja, A., Bruce, T. F., Gerard, P., Powell, R. R., Pettigrew, C. A., & Kerrigan, J. L.

(2022). Comparison of cell viability assessment and visualization of *Aspergillus niger* biofilm with two fluorescent probe staining methods. *Biofilm*, 4, 100090. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2022.100090>

Sica, P., Tonoli, F., Silverio, M. S., Douradinho, R., Mota, L. A., Prado, L., Leite, G. M. G.

L., Carvalho, R. S., Pinto, A. U., & Baptista, A. S. (2025). Pre-adaptation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains to very high gravity can improve fermentation parameters and reduce osmotic stress. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(6), 9123-9137. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05746-4>

Sripotorn, B. (2016). Increase in Ethanol Production Efficiency from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chiang Mai J. Sci.*

<https://www.thaiscience.info/Journals/Article/CMJS/10985590.pdf>

- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba*, 50. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>
- Sun, J., Zhang, L., & Loh, K.-C. (2021). Review and perspectives of enhanced volatile fatty acids production from acidogenic fermentation of lignocellulosic biomass wastes. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00420-3>
- Tareen, A. K., Danbamrongtrakool, N., Sultan, I. N., Laemsak, N., Sirisansaneeyakul, S., Vanichsriratana, W., & Parakulsuksatid, P. (2021). Utilization of urea as a nitrogen source for ethanol production from oil palm trunk using simultaneous saccharification and fermentation. *Agriculture and Natural Resources*, 55(3), Article 3.
- Téllez-Mora, P., Peraza-Luna, F. A., Feria-Velasco, A., & Andrade-González, I. (2012). *Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr)*. 11. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1665-27382012000100014&script=sci_arttext
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., & Blondin, B. (2013). Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must. *PLOS ONE*, 8(4), e61645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>
- Thuy, C. X., Pham, V. T., Nguyen, T. T. N. H., Nguyen, T. T. N., Ton, N. T. A., Tuu, T. T., & Vu, N. D. (2024). Effect of Fermentation Conditions (Dilution Ratio, Medium pH,

- Total Soluble Solids, and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Ratio) on the Ability to Ferment Cider from Tamarillo (*Solanum betaceum*) Fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2024(1), 8841207.
<https://doi.org/10.1155/2024/8841207>
- Torija, J., Roze's, N., Poblet, M., Guillamo'n, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47-53.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7)
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation*, 7(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Vallejo, B., Matallana, E., & Aranda, A. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* nutrient signaling pathways show an unexpected early activation pattern during winemaking. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01381-6>
- van Dijk, M., Mierke, F., Nygård, Y., & Olsson, L. (2020). Nutrient-supplemented propagation of *Saccharomyces cerevisiae* improves its lignocellulose fermentation ability. *AMB Express*, 10(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01070-y>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Chapter Three—Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. En G. M. Gadd & S. Sariaslani (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 105, pp. 87-129). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>

- Wenying Hong, & Wenzhong Huang. (2024). Application of Sugarcane in Ethanol Fuel Production: Theoretical Basis and Commercial Potential. *Journal of Energy Bioscience*, 15. <https://bioscipublisher.com/index.php/jeb/article/view/3845/2940>
- Wu, Y., Li, B., Miao, B., Xie, C., & Tang, Y.-Q. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* employs complex regulation strategies to tolerate low pH stress during ethanol production. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01974-3>
- Yang, R. (2017). Production of Ethanol from Sudanese Sugar Cane Molasses and Evaluation of Its Quality. *Journal of Food Processing & Technology*, 03(07). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000163>
- Yang, X., Yang, Y., Huang, J., Man, D., & Guo, M. (2021). Comparisons of urea or ammonium on growth and fermentative metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 98. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03056-9>
- Yusuf, U., Usman, U. G., Abubakar, A. Y., & Mansir, G. (2023). Effect of pH and Temperature on Bioethanol Production: Evidences from the Fermentation of Sugarcane Molasses using *Saccharomyces cerevisiae*. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*, 8, 9-16. <https://doi.org/10.4314/dujopas.v8i4b.2>
- Zhang, H., Zhang, P., Wu, T., & Ruan, H. (2023). Bioethanol Production Based on *Saccharomyces cerevisiae*: Opportunities and Challenges. *Fermentation*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080709>

IX. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de Activación de Levadura

Reactivos:

- Levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada.
- Medio de cultivo

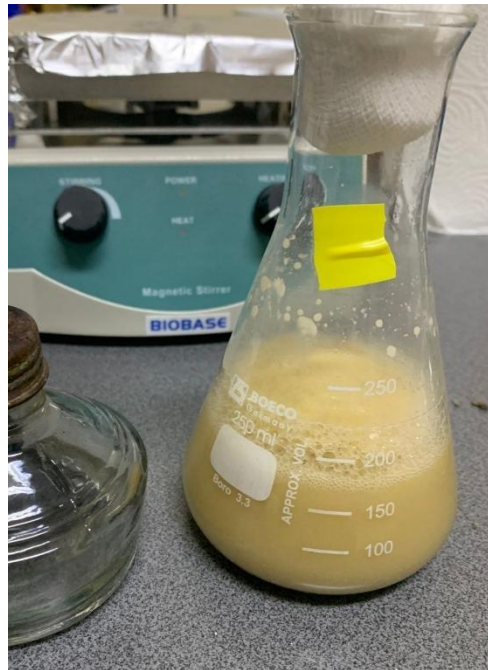
Tabla descriptiva del diseño de investigación		
No.	Jugo de caña (° Brix)	Concentración de urea (g/L)
1	15	1.5
2	15	2.5
3	15	0.5
4	15	1.5
5	15	0.5
6	15	2.5

Equipos y materiales:

- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Balanza analítica.
- Baño de agua con control de temperatura.
- Termómetro.
- Pipetas y puntas estériles.
- Papel de aluminio.

Procedimiento:

- Calentar 170 mL de medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml hasta alcanzar una temperatura de 35 °C.
- Pese 2.55 gramos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada para 2550 ml de medio, lo que equivale a 1 g L⁻¹, utilizando una balanza analítica en condiciones estériles.
- Añada la levadura al matraz con el medio de cultivo.
- Cubra el matraz con papel de aluminio para evitar contaminación.
- Mantenga el matraz a 35 °C durante 15 minutos para activar la levadura.
- Una vez activada, la levadura está lista para su uso en experimentos. Después de los 15 minutos, puede añadir la levadura activada en los procedimientos experimentales correspondientes.



Anexo 2: Protocolo para la Determinación de Biomasa por Peso Seco y Espectrofotometría

Reactivos

- NaCl al 0,1 M
- Agua destilada

Equipos

- Centrífuga
- Secador de horno a 80°C
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica

Materiales

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Crisoles o capachos de aluminio
- Tubos de centrifugación 5 mL de vidrio
- Pipetas automáticas y puntas estériles
- Papel de filtro
- Papel de aluminio

Procedimiento

Curva de Calibrado de Biomasa:

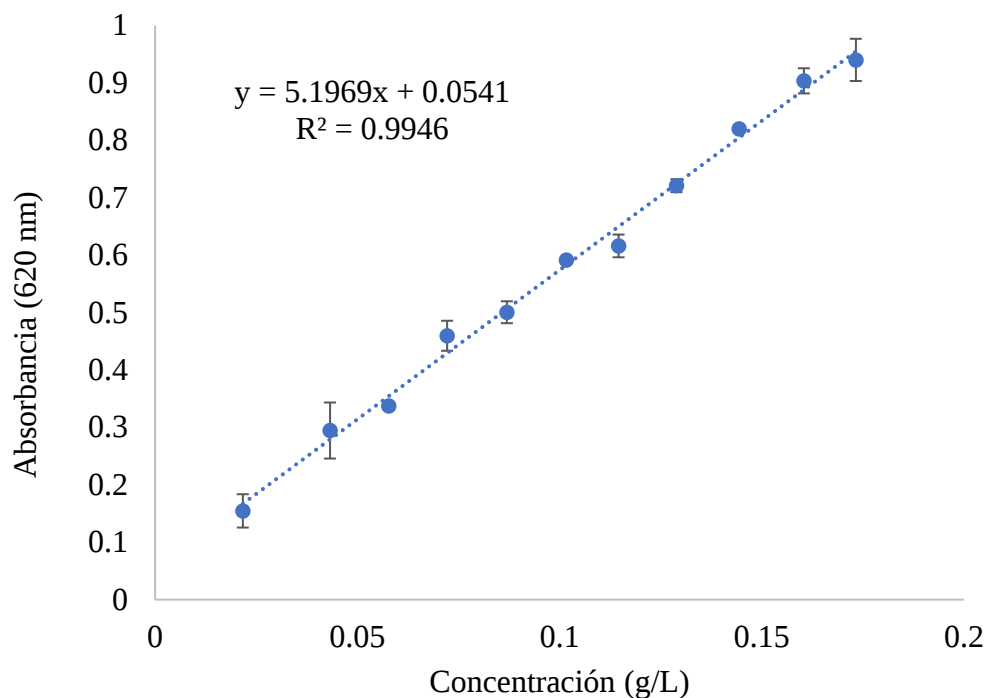
- Realizar un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 150 rpm y 30°C, asegurando obtener células en la etapa de crecimiento (aproximadamente 15 a 24 horas).
- Tomar 15 mL del caldo de cultivo por duplicado, agregar 600 µL de NaCl al 0.1 M.
- Centrifugar las muestras a 7,000 rpm durante 15 minutos.
- Resuspender la biomasa dos veces en 15 mL de agua destilada y centrifugar nuevamente a 7,000 rpm durante 15 minutos.

- Depositar el pellet de biomasa en capas de aluminio o crisoles previamente secados a 80°C hasta peso constante y pesado.
- Determine la concentración celular por diferencia de peso del capacho o crisol antes y después de secar la muestra a 80°C hasta peso constante, considerando el volumen de 15 mL.

Medición espectrofotométrica:

1. Tomar 5 mL del caldo de cultivo del matraz y realizar diluciones entre 42 y 333 veces, asegurándose de que la absorbancia esté entre 0.1 y 0.9.
2. Medir la absorbancia de estas diluciones a 620 nm, utilizando agua destilada como blanco.

Absorbancia (620 nm)	Absorbancia (620 nm)	Promedio	DE
0.966	0.914	0.940	0.04
0.919	0.888	0.904	0.02
0.818	0.822	0.820	0.00
0.729	0.713	0.721	0.01
0.630	0.602	0.616	0.02
0.588	0.595	0.592	0.005
0.514	0.487	0.501	0.02
0.478	0.441	0.460	0.03
0.342	0.333	0.338	0.01
0.329	0.260	0.295	0.05
0.175	0.134	0.155	0.03



Análisis de datos:

- Graficar los valores de absorbancia obtenidos a 620 nm contra la biomasa determinada por peso seco (en g L⁻¹).
- Utilizar la ecuación de la recta obtenida de la gráfica de calibración para determinar la biomasa en futuras muestras.

Ejemplo para Determinación de Biomasa

Datos:

- Ecuación de la recta de calibración: $y = 5.1969x + 0.0541$
- Factor de Dilución (FD): 42
- Absorbancia medida a 620 nm (y): 0.452 (este es un valor de ejemplo)

Paso 1: Calcular la biomasa (x) usando la ecuación de la recta

Primero, despejamos la ecuación para encontrar la concentración de biomasa x:

$$y = 5.1969x + 0.0541$$

$$x = (y - 0.0541) / 5.1969$$

Sustituyendo el valor de la absorbancia $y = 0.452$:

$$x = (0.452 - 0.0541) / 5.1969$$

$$x = 0.397 / 5.1969 = 0.0765 \text{ g L}^{-1}$$

Paso 2: Ajustar la concentración de biomasa al factor de dilución (FD)

Debido a que la muestra fue diluida 42 veces ($FD = 42$), la concentración real de biomasa en la muestra original se obtiene multiplicando por el FD:

$$\text{Biomasa} = 0.0765 \text{ g L}^{-1} \times 42 = \mathbf{3.21 \text{ g L}^{-1}}$$

Anexo 3: Protocolo para la Evaluación de Viabilidad Celular utilizando Azul de Metileno

Reactivos

- Azul de metileno
- Agua destilada.
- Medio de cultivo celular.

Material

- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Pipetas automáticas de 1000 µL y 500 µL.
- Cámara de Neubauer.
- Cubreobjetos.
- Vaso de precipitados de 50 mL.
- Papel de filtro.

Equipos

- Microscopio óptico.
- Guantes de laboratorio.

Procedimiento

Para la preparación del azul de metileno, diluirlo a una concentración 1:1 mezclando 1 mL de solución de azul de metileno con 1 mL de agua destilada estéril en un vaso de precipitados de 50 mL. Agitar suavemente para asegurar la homogeneidad de la solución.

Recolección del Medio de Cultivo: Tomar 1 mL del medio de cultivo celular utilizando una pipeta automática de 1000 µL. Transferirlo a un tubo de ensayo de 5 mL.

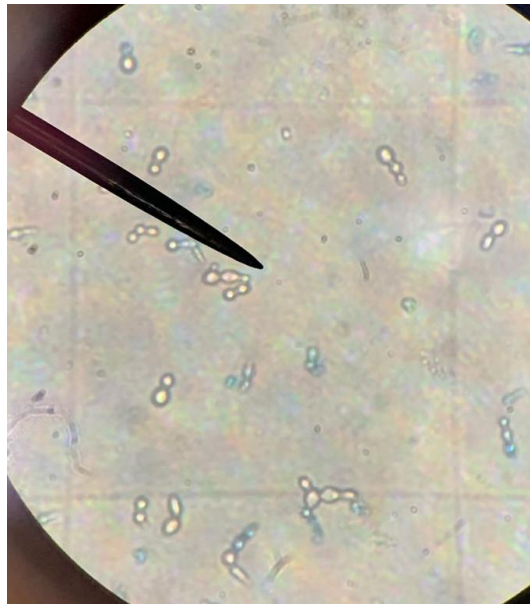
Adición de Azul de Metileno: Añadir 1000 µL de la solución de azul de metileno previamente preparada al tubo de ensayo que contiene el medio de cultivo celular. Agitar suavemente durante aproximadamente 15 segundos para asegurar la correcta incorporación del colorante.

Preparación de la Cámara de Neubauer:

- Limpiar la cámara de Neubauer y el cubreobjetos con papel de filtro humedecido con agua destilada para eliminar cualquier contaminante.
- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer de manera que quede firmemente ajustado sin burbujas de aire.

Carga de la Muestra:

- Pipetear 10 μL de la mezcla de medio de cultivo y azul de metileno desde el tubo de ensayo y depositarlos cuidadosamente en el borde de la cámara de Neubauer.
- La mezcla se distribuirá por capilaridad en los cuadrantes de la cámara.
- Dejar reposar por 2 minutos.



- Colocar la cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico y usar el lente de 40 X.
- Contar las células teñidas en cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer. Las células viables no se teñirán con azul de metileno, mientras que las células no viables aparecerán teñidas de azul.
- Realizar el conteo en los cuatro cuadrantes y calcular el promedio para determinar la concentración celular y el porcentaje de viabilidad.

Preparación de azul de metileno

Reactivos

- Azul de metileno
- Agua destilada

Materiales

- Papel aluminio
- Beaker (1000 mL)
- Probeta (1000 mL)
- Guantes
- Recipiente de vidrio

Equipo

- Agitador
- Balanza analítica

Procedimiento

- Pesar 0.1 gramos de azul de metileno
- Medir 1 litro de agua destilada con ayuda de una probeta de 1000 mL.
- Verter el agua destilada en un Beaker de 1000 mL.
- Colocar el Beaker en un agitador y agitar a poca velocidad.
- Añadir el azul de metileno poco a poco.
- Agitar hasta homogeneizar totalmente.
- Almacenar en un recipiente de vidrio y cubrirlo completamente con papel aluminio.

Anexo 4: Protocolo para Determinación de Etanol

Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol (68%)
- Dicromato de potasio
- Ácido sulfúrico al 95%-98%

Materiales

- Envase de vidrio (500 ml)
- Probeta (100 ml)
- Tubos de ensayo
- Papel aluminio

Equipos

- Espectrofotómetro
- Centrífuga

Procedimiento

1. Preparación de Soluciones:

- Solución de dicromato de potasio al 0.1 M:
 - Pese 7.35 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).
 - Disuelva el dicromato de potasio en agua destilada en un volumen de 50 ml.
 - Trasvasar la solución a un matraz de 250 mL.
- Solución de ácido sulfúrico al 5 M:
 - Mida 28.2 ml de ácido sulfúrico concentrado al 95%-98% (H_2SO_4).
 - Mida 71.8 mL de agua destilada y añada el ácido sulfúrico para obtener un volumen final de 100 ml.

2. Preparación de la Mezcla de Dicromato y Ácido Sulfúrico:

- Agregue lentamente la solución de ácido sulfúrico al 5 M al recipiente que contiene la solución de dicromato de potasio al 0.1 M.
- Aforar con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 250 mL
- Agite vigorosamente para homogeneizar la mezcla.

3. Preparación de Patrones de Etanol:

- Se preparan 7 patrones de etanol a partir de disoluciones de 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5% y 4% de etanol en volumen con agua destilada.
- Los volúmenes correspondientes de etanol al 68% y agua destilada para un volumen final de 6 ml se indican en la siguiente tabla:

Tabla 7: Cantidad de etanol para realizar las diluciones.

% Etanol	Fd	V Muestra	Agua Destilada	V Total
4	6	1	5	6
3.5	6	1	5	6
3	6	1	5	6
2.5	6	1	5	6
2	6	1	5	6
1.5	6	1	5	6
1	6	1	5	6

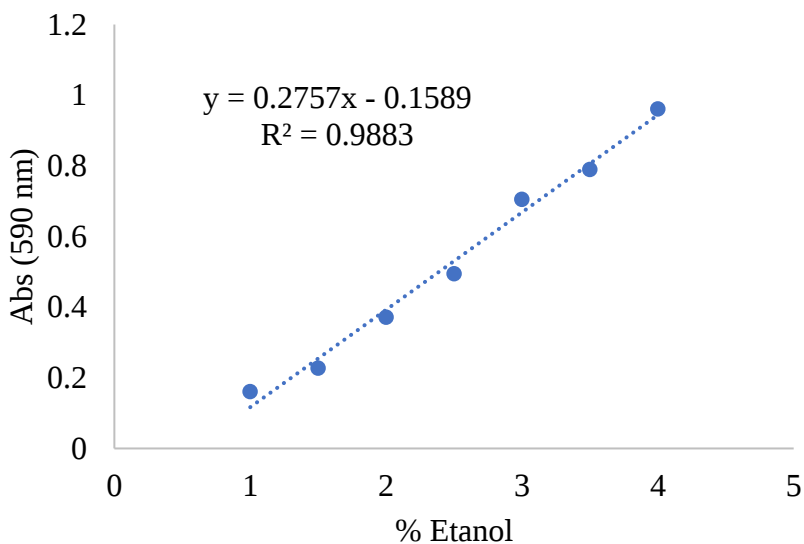
4. Curva de Calibración:

- Tome 3 ml de la solución oxidativa de dicromato de potasio y añádalos a los diferentes tubos de ensayo.
- Agregue 300 μ L de cada una de las diluciones de etanol a los tubos correspondientes.
- Centrifugue los tubos a 3600 rpm durante 5 minutos.
- Tape herméticamente los tubos de ensayo.
- Deje reposar los tubos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

- Mida la absorbancia a 590 nm, utilizando como blanco la solución de la reacción oxidativa con agua destilada.
- Extrapole el valor obtenido de la absorbancia en la curva de calibrado de etanol.

Tabla 8: Valores de absorbancia para las diluciones de etanol y curva de calibrado.

% Etanol	OD	OD	Promedio	Desv.
4	0.985	0.938	0.962	0.03
3.5	0.77	0.81	0.790	0.03
3	0.692	0.719	0.706	0.02
2.5	0.498	0.492	0.495	0.00
2	0.382	0.362	0.372	0.01
1.5	0.253	0.202	0.228	0.04
1	0.171	0.151	0.161	0.01



5. Ejemplo de Cálculo:

- Datos:
 - Absorbancia = 0.495
 - Factor de dilución (FD) = 6

- Intercepto de la ecuación: 0.1589
- Pendiente de la ecuación: 0.2757
- Cálculo de la concentración de etanol:

$$x = \frac{0.495 - 0.159}{0.276} * 6$$

$$x = 7.30 \% v/v$$

- Este ejemplo expresa que la concentración de etanol es de 7.30 %.



Anexo 5: Diferencia de color entre el jugo de caña y el medio de cultivo fermentado.



Anexo 6: Muestras listas para los respectivos análisis.



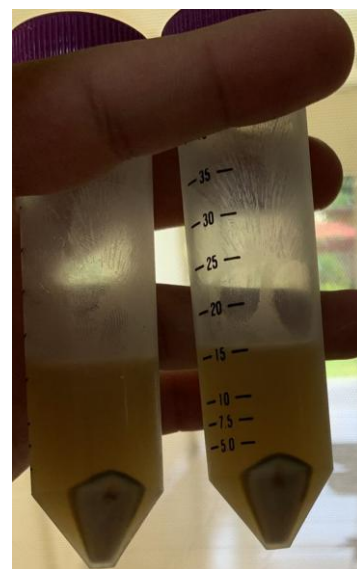
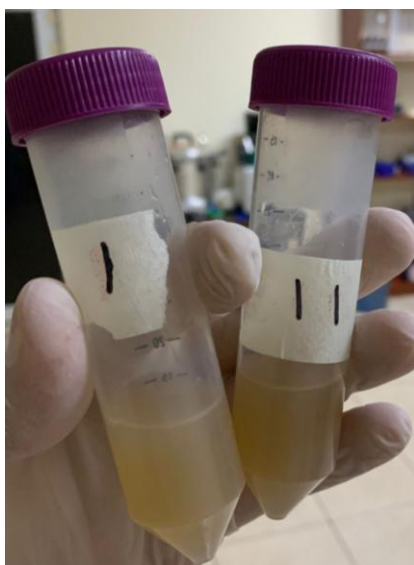
Anexo 7: Jugo de caña esterilizado



Anexo 8: Biomasa en peso seco para curva de calibrado.



Anexo 9: Colocación de matraces para inicio de incubación



Anexo 10: Proceso de centrifugación para separar el sobrenadante de la biomasa.



Anexo 11: Homogenización del dicromato de potasio.



Anexo 12: Materia prima del cultivo.