

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**EVALUACIÓN DE FOSFATO DIAMÓNICO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO
DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.**

POR:

RIXI NAYELI SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

ANTEPROYECO DE TESIS



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, CA.

JUNIO, 2024

EVALUACIÓN DE FOSFATO DIAMÓNICO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO
DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.

POR:

RIXI NAYELI SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

M Sc. FRANCISCO ENRIQUE SÁNCHEZ ROSALES

Asesor principal

ANTEPROYECTO DE TESIS

PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DE
INVESTIGACIÓN.

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, CA.

JUNIO, 2024

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
III. HIPÓTESIS.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Generalidades de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
4.2. Requerimientos nutricionales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
4.2.1. Principales nutrientes y las formas más comunes de satisfacerlas	5
4.2.2. Fosfato diamónico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en la producción de etanol mediante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
4.3. Fermentación alcohólica	8
4.3.1. Ruta metabólica.....	9
4.3.2. Factores a controlar durante la fermentación	11
V. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1. Descripción y localización del área de la investigación	13
5.2. Materiales y equipos	13
5.3. Metodología experimental	15
5.3.1. Variables independientes	15
5.3.2. Variables dependientes	15
5.3.3. Diseño y análisis estadístico	16
5.3.4. Tratamientos.....	16

5.3.5. Medio de cultivo	17
5.3.6. Preparación del medio de cultivo	17
5.3.7. Activación de levadura	18
5.3.8. Preparación del inóculo	19
5.3.9. Condiciones de operación.....	20
5.3.10. Muestreo.....	20
5.4. Metodología analítica.....	21
5.4.1. Determinación de la concentración de biomasa por peso seco	21
5.4.2. Determinación de etanol.....	22
5.4.3. Determinación de viabilidad celular	23
5.4.4. Medición de pH.....	24
5.4.5. Acidez titulable	25
5.4.6. Medición de grados Brix	25
5.4.7. Cálculo de parámetros cinéticos	25
VI. PRESUPUESTO	29
VII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	30
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	31

I. INTRODUCCION

La fermentación de azúcares por levaduras para producir etanol es uno de los procesos más importantes a nivel mundial. El etanol, o alcohol etílico, no solo es el principal producto de la fermentación en términos de volumen, sino también desde el punto de vista económico (Walker; Walker, 2018). Las levaduras utilizan una amplia gama de fuentes de nutrientes, como glucosa, fructosa, nitrógeno, lípidos y vitaminas, esenciales para su crecimiento y metabolismo durante la fermentación. Entre estos nutrientes, el nitrógeno es especialmente crítico; su adecuada disponibilidad impacta significativamente en la cinética de la fermentación alcohólica, influenciando tanto la velocidad de fermentación, como la formación de biomasa y metabolitos secundarios (Tesnière; et al, 2015 y Sablayrolles; Mouret, 2021).

En condiciones comunes de fermentación alcohólica, las levaduras frecuentemente enfrentan una deficiencia de nitrógeno, lo cual puede comprometer la fermentación y requerir adaptaciones en las funciones celulares para mantener un flujo elevado de azúcares y permitir la supervivencia de la levadura bajo condiciones de estrés prolongado (Tesnière; et al, 2015). Para contrarrestar estos desafíos y evitar fermentaciones estancadas o lentas, es común la adición de fuentes inorgánicas de nitrógeno, como las sales de amonio, antes de la fermentación (Tesniere; et al, 2013 y Arias; et al, 2007).

En este contexto, el objetivo de esta investigación se centrará en analizar específicamente el efecto del fosfato diamónico en la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y su impacto en la producción de etanol, mejorando el proceso fermentativo para obtener mayor productividad volumétrica.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fosfato diamónico como fuente de nitrógeno sobre la cinética de crecimiento *Saccharomyces cerevisiae*, en la producción de etanol.

2.2. Objetivos específicos

Caracterizar las cinéticas de crecimiento celular y producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de fosfato diamónico como fuente de nitrógeno en escala de matraces

Comparar la productividad volumétrica y los rendimientos de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* bajo diferentes concentraciones de fosfato diamónico.

III. HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H_0): Las concentraciones diferentes de fosfato diamónico no afectan el rendimiento de etanol.

Hipótesis alternativa (H_1): La adición de diferentes concentraciones de fosfato diamónico afectan el rendimiento de etanol.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura desempeña un papel vital en la producción de las bebidas alcohólicas, por lo que la selección de cepas de levadura adecuadas es esencial para maximizar el rendimiento de alcohol (Robles, 2021). *Saccharomyces cerevisiae* es eucariota, anaerobia facultativa, ha sido tradicionalmente usada en la producción de bebidas alcohólicas y alimentos, *S. cerevisiae* es la responsable de la producción de las bebidas alcohólicas, debido a su capacidad para fermentar y asimilar glucosa, sacarosa, maltosa y la galactosa (Hernández, & Martínez, 2012). Según Regodón (2007), *S. cerevisiae* es responsable de la fermentación de los mostos, con una resistencia alcohólica hasta 18% (v/v), puede fermentar azúcares tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Castillo, 2013).

La forma de su célula es elipsoidal de aproximadamente 5 mm de diámetro (Dickinson, 2004, Citado por Hernández et al, 2015), tal como lo describe Cáceres y Reyna (2002) la temperatura óptima de *S. cerevisiae* tiene un valor entre los 28 °C y 35 °C. (Fleet y Heard, 1993, citado por Regodón, 2007). *Saccharomyces cerevisiae* parece crecer mejor a pH superiores a 3.5, y de esta misma forma lo menciona Reyes (2023), que hay un mayor crecimiento en un rango de pH ligeramente ácido a neutro, generalmente entre 4.5 y 6.5; de tal manera qué, mantener el pH adecuado es crucial para garantizar un crecimiento óptimo (Reyes, 2023).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura utilizada por excelencia para la obtención de etanol debido a que es un organismo de fácil manipulación y de recuperación, no es exigente en

cuanto a su cultivo, no demanda altos costos, produce bajas concentraciones de subproductos durante la fermentación, es osmotolerante, presenta alta viabilidad celular para el reciclaje y, características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo & Sarmiento, 2007).

4.2. Requerimientos nutricionales de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son esencialmente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos (Velásquez, 2015). De esta misma forma lo menciona Walker (1998), citado por Godínez (2012), que el nitrógeno es el segundo nutriente más importante después del carbono para el crecimiento de la levadura, pues este elemento es esencial para la síntesis de proteínas, aminoácidos, enzimas, nucleótidos y algunas vitaminas

Según lo mencionado por Velásquez (2015), el uso de nutrientes para levaduras durante el proceso de fermentación es necesario para ayudar a las fermentaciones de baja eficiencia a prevenir fermentaciones detenidas y re activar las fermentaciones con elevados °Brix; tal como lo señala Yegres, et al (2003), las sales son necesarias para el desarrollo de las levaduras, y suelen encontrarse en pocas cantidades en los mostos, por lo cual se recomienda la adición de estos compuestos.

4.2.1. Principales nutrientes y las formas más comunes de satisfacerlas

Carbono: proviene de los azúcares, útiles para la fermentación de maltosa, sacarosa, galactosa (Cáceres y Reyna. 2002, citado por Heredia y Kwok. 2015). Los compuestos carbonados son utilizados a la vez como fuente de energía y de carbono por *Saccharomyces cerevisiae*. Los principales son D-azúcares como hexosas, glucosa, fructosa y manosa (Buitrago & Tenjo, citado por Guillermo, et al, 2021).

Nitrógeno: Además del carbono, la levadura necesita una fuente de nitrógeno para sintetizar proteínas y otros componentes celulares (Reyes, 2023). El nitrógeno es cuantitativamente el segundo constituyente aportado por el medio de cultivo. Todas las levaduras, asimilan el nitrógeno en forma de ion amonio, el cual puede ser aportado en el medio por el cloruro amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, y sobre todo el sulfato amónico siendo este último el más eficaz, y aportando el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos (Mossel, 2003, citado por Velásquez, 2015).

Fósforo: Es esencial para el crecimiento, regula la síntesis de lípidos y carbohidratos, y mantiene la integridad de la pared celular. El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones ortofosfato (H_2PO_4) (Buitrago & Tenjo, citado por Guillermo et al, 2021). En forma de fosfato, el dihidrógeno de potásico de fosfato suministra la cantidad necesaria para su crecimiento (Cáceres y Reyna. 2002, citado por Heredia & Kwok. 2015).

Azufre: El sulfato de amonio y el tiosulfito son esenciales para suplir los requerimientos de azufre (Cáceres y Reyna. 2002, citado por Heredia & Kwok, 2015). La fuente de azufre más utilizada en los medios de cultivo es el sulfato amónico (Mossel, 2003, citado por Velásquez, 2015).

4.2.2. Fosfato diamónico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en la producción de etanol mediante *Saccharomyces cerevisiae*

El uso de fosfato diamónico (grado alimentario) como fuente de nitrógeno, favorece fermentaciones deseables y relativamente rápidas (< 40 h), en comparación con las fermentaciones tradicionales (espontáneas) de otras regiones mezcaleras con duración de hasta 7 días. En esta investigación se hizo uso de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (fosfato diamónico) como fuente de nitrógeno, ya que este compuesto provee de iones amonio a la célula y la mayoría de las levaduras lo utilizan de manera eficiente; sin embargo, la cantidad usada fue menor que 0.20 g/L en la reactivación de los caldos microbianos, es por esta razón que, se hace énfasis que la agregación de nitrógeno (fosfato diamónico) al inicio de la fermentación es irregular y probablemente insuficiente, pues la concentración conseguida se encuentra por debajo de los 0.5 g/L recomendados (Godínez, 2012).

Investigación realizada por Robles, (2021), según datos experimentales obtenidos en las condiciones óptimas del proceso de fermentación alcohólica del jugo de la Cabuya Azul (*Agave Americana*), empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* el mayor rendimiento de etanol se logró en las siguientes condiciones: concentración de sustrato de 90 g/L, temperatura de 28 °C, pH 3,5 y concentración de nutriente DAP de 2 g/L. La cantidad de etanol obtenida fue de 42,85 g/L, con rendimiento $YP/s = 0,4779$ (93,50 %).

En un estudio realizado por Yefres, et al (2003), se compararon los niveles de consumo de azúcar de las levaduras con mayor capacidad fermentativa. Se estudió el efecto de la adición de azúcar blanca comercial y del fosfato de amonio en la producción de alcohol en el proceso artesanal; la elevación del contenido de azúcar (11 a 18°Brix) y de la adición de fosfato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,2 g/l). En estas condiciones, el tiempo de fermentación del mosto se acortó y la producción de licor aumentó hasta un 92%. Los resultados in situ permitieron confirmar un efecto favorable del azúcar y del fosfato de amonio en la

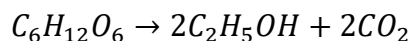
productividad del proceso fermentativo artesanal, acortando el tiempo de fermentación y aumentando el volumen de licor obtenido de sólo 13 litros en el mosto puro hasta 25 litros. El tenor en alcohol se elevó a 49% con la adición de fosfato independientemente del contenido inicial de azúcar en el mosto.

4.3. Fermentación alcohólica

De acuerdo con Vásquez, (2007), la fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado principalmente por levaduras, donde el sustrato mono y di sacáridos en su mayoría, es transformado principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono. Una de las opciones para producir etanol es por fermentación a partir de materias primas ricas en carbohidratos (azúcar, almidón, celulosa, etcétera). La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono.

Según lo mencionado por Mohd, et al. (2017), la velocidad de agitación controla la permeabilidad de los nutrientes del caldo de fermentación al interior de las células y la eliminación del etanol de la célula al caldo de fermentación. Cuanto mayor sea la velocidad de agitación, mayor será la cantidad de etanol producido. Además, aumenta la cantidad de consumo de azúcar y reduce la inhibición del etanol en las células. La velocidad de agitación común para la fermentación por células de levadura es de 150 a 200 rpm. Una velocidad de agitación excesiva no es adecuada para una producción fluida de etanol, ya que limita las actividades metabólicas de las células.

En la ecuación uno se presenta la reacción química que describe la conversión de glucosa en etanol a través del proceso de fermentación. Según esta ecuación, una molécula de glucosa, por vía fermentativa, produce 2 moléculas de etanol y 2 moléculas de dióxido de carbono como productos resultantes.



Ecuación 1. Conversión de glucosa a etanol y dióxido de carbono mediante fermentación.

4.3.1. Ruta metabólica

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por levaduras o bacterias. Donde el sustrato celular; monosacárido y disacárido en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono, con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos $NADH/NAD^+$ y $NADHP/NADP^+$ y enlaces de alta energía de fosfato, ATP. Para que se pueda desarrollar la glucólisis y el metabolismo del piruvato, es necesaria que la molécula de glucosa o fructosa sean transformadas a glucosa-6-fosfato o la fructosa-6-fosfato respectivamente. Será a partir del piruvato que se desarrollarán las reacciones por las que se obtiene el alcohol, como las reacciones son anaeróbicas para el caso de fermentación alcohólica la reducción del piruvato a etanol es posible por la acción de la forma reducida de la coenzima NAD, encargada de realizar la oxidación (Acosta Romero, C. 2012). La fermentación alcohólica va acompañada de la liberación de moléculas energéticas (ATP) – energía materialmente comprometida – puestas a disposición de las levaduras” (Vincent et al, 2006). La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio en el que las levaduras y algunas bacterias, descarboxilan el piruvato obtenido de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (glicolisis) dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del $NADH_2$, como se ilustra en la Figura N°1.

Los microorganismos de fermentación alcohólica siguen un proceso de Glucólisis, también llamado vía de Embden Meyerhof Parnas (EMP) para degradar glucosa: la glucosa se divide en dos unidades de tres carbonos (piruvato). Se oxidan numerosos átomos de carbono. La pequeña cantidad de energía generada de las reacciones se almacena de forma temporal en

dos moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) y una de NADH (deshidrogenasa del dinucleótido de nicotinamida y adenina) por cada triosa. El destino metabólico subsiguiente del piruvato depende del organismo que se considere y de sus circunstancias metabólicas. En los organismos anaerobios, el piruvato puede convertirse en productos de desecho como etanol, ácido láctico, ácido acético y moléculas semejantes; en los organismos aerobios, como los animales y los vegetales, oxidan el piruvato para formar CO₂ y H₂O (McKee T. & McKee, 2014).

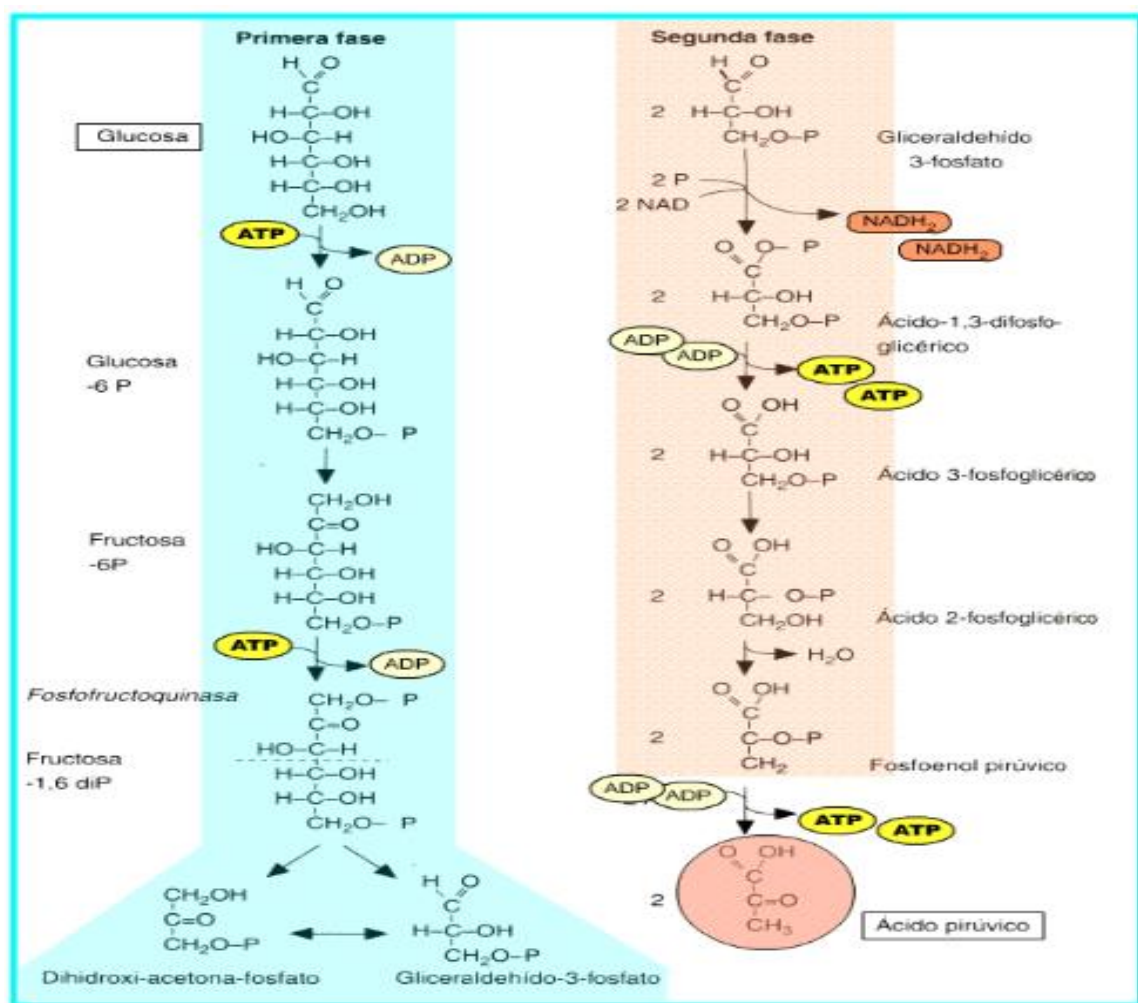


Figura 1. Ruta bioquímica de Embden-Meyerhof-Parnas (glicolisis)

Fuente: (Gómez, GJ y Nieto, C. 2002).

4.3.2. Factores a controlar durante la fermentación

pH. El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Según lo mencionado por Fleet y Heard, y citado por Regodón AR, (2007), *Saccharomyces cerevisiae* tiende a crecer mejor a pH superiores a 3.5. Los requisitos de pH para las fermentaciones alcohólicas con la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* prosperan bien en ambientes de pH de 4.5 y 6.5 (Walker & Stewart. 2016) y según el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalinos a menos que se hayan adaptado al mismo (Decheco, 2016).

Algunas investigaciones realizadas indican que a un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene el mejor crecimiento (Fajardo & Sarmiento 2007). En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. (Ríos et al, 2005)

Concentración de azúcares y nutriente. Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18% (p/v), puesto que a concentraciones de 22% (p/v) las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos. et al., 2005). Según lo mencionado por Mora, (2014), el mosto para fermentación alcohólica debe tener una concentración entre 12 a 22 °brix, pues si la concentración de °brix es muy bajo el grado alcohólico obtenido será pobre, por lo contrario si la concentración de °brix es muy alto la fermentación no se efectúa, pues la presión osmótica que se ejerce sobre las levaduras es grande y no permite que actúen sobre los azúcares.

Temperatura. Algunas células de *Saccharomyces cerevisiae* pueden crecer rápidamente en temperaturas entre 25 °C y 37 °C que son aún toleradas, pero a una temperatura de 41 °C el crecimiento disminuye hasta dejar de crecer por completo a 46 °C (Holubářová et al, 2000, citado por Vital & Larralde, 2016)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción y localización del área de la investigación

La investigación se realizará en el laboratorio de la planta de procesamiento lácteos y el laboratorio de Microbiología en la Universidad Nacional de Agricultura, municipio de Catacamas, Olancho, Honduras, Barrio el Espino, carretera que conduce hacia Dulce Nombre de Culmí.

5.2. Materiales y equipos

Materiales

- Agua destilada
- Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Algodón
- Gasas
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Cinta adhesiva

Reactivos

- Azúcar comercial
- Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Fosfato diamónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)
- Fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$)
- Ácido cítrico
- Citrato de sodio
- Azul de metileno

Equipos

- Refractómetro digital (Marca BOECO)
- Refractómetro analógico (0-95% °Brix)
- Incubadora de agitación termostática (Marca BIOBASE, modelo BJPX-200B).
- Centrifuga sobremesa (Marca BECKMAN).
- Balanza analítica (Marca OHAUS, modelo: VP64CN).
- Balanza digital (Marca OHAUS PIONEER)
- Microscopio (Marca LABOMED)
- Termómetro digital (modelo WT-1)
- pHmetro (modelo:ST-2100)
- Autoclave (American 25X-1)
- Estufa (marca Oster)
- Horno
- Placa calefactora

Instrumentos

- Beaker
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Pinzas
- Perilla
- Pipeta
- Probeta de 250 ml
- Mechero
- Vaso de precipitación
- Tubos de centrifugación
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubo de ensayo

5.3. Metodología experimental

5.3.1. Variables independientes

- Concentración de fosfato diamónico inicial
- Concentración de levadura inicial (*Saccharomyces cerevisiae*) (variable fija)
- Concentración de sacarosa inicial (variable fija)
- pH inicial
- Temperatura (variable fija)

5.3.2. Variables dependientes

- Rendimiento de etanol

- Rendimiento de biomasa

5.3.3. Diseño y análisis estadístico

Se utilizará un diseño experimental completamente aleatorizado de un factor con tres niveles. Cada tratamiento se realizará por duplicado. Los resultados experimentales serán evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA), con una significancia de 0.05, utilizando el programa estadístico InfoStat y una prueba de comparación múltiple de Tukey.

5.3.4. Tratamientos

Tabla 1. Tratamientos y concentraciones de fosfato diamónico en base a literatura

Tratamientos	Concentración de fosfato diamónico (DAP)
T1	0.5 g/L
T2	1 g/L
T3	2 g/L

En la tabla 1, se muestran los tratamientos con las formulaciones experimentales que se implementarán para el desarrollo del trabajo de investigación, En cuanto a la fuente de nitrógeno a utilizar para que se lleve a cabo esta investigación, se opta por usar fosfato diamónico debido al costo y la disponibilidad del compuesto. Los valores anteriormente descritos (tabla 1), han sido seleccionados en base a los resultados que mejor rendimiento se han obtenido en la fermentación alcohólica, en investigaciones realizadas por Godínez, (2012); Robles, (2021) y Yefres; et al, (2003). Cabe mencionar que se utilizará un

tratamiento testigo que permitirá poder comparar los resultados con los diferentes tratamientos.

5.3.5. Medio de cultivo

Tabla 2. Compuestos y concentraciones que compondrán el medio de cultivo a utilizar.

Tratamientos	Componentes y concentraciones		
	Sulfato de magnesio	°Brix	Fosfato diamónico (DAP)
1	0.1 g/L	15	0.5 g/L
2	0.1 g/L	15	1 g/L
3	0.1 g/L	15	2 g/L

En la Tabla 2, se presentan las concentraciones de cada componente necesario para realizar los medios de cultivo. Cabe mencionar qué, la adición de fosfato diamónico (DAP), varía debido a que este nutriente es la variable de estudio en esta investigación.

5.3.6. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo, se pesará el fosfato diamónico, el sulfato de magnesio y el azúcar común (sacarosa) según lo indicado en la tabla 2; luego de ello se procederá a diluir el azúcar y las sales en solución concentrada, haciendo uso de una placa calefactora para que haya una mejor dilución de cada componente; y después de ello, se procederá a agregar la solución concentrada a cada matraz que estará contenido con 200 mL de agua destilada. Se alcanzarán 15 °Brix, y se ajustará el pH a 5.5 (Reyes, 2023), con un tampón (buffer) de citrato. Antes de la esterilización se realizarán los análisis

correspondientes, como ser: medición de grados Brix, % de acidez titulable y pH. Finalmente, cada matraz se cerrará con un tapón y se cubrirá con papel aluminio para proceder a esterilizarlos en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos; una vez finalizada la esterilización, se dejarán enfriar y se monitoreará la temperatura hasta tener la adecuada para agregar la levadura hidratada.

Para preparar un tampón de citrato con pH 5.5 y concentración 0.1M, se seguirán los siguientes pasos:

1. El tampón de citrato se preparará a partir de ácido cítrico y citrato de sodio, siendo el par adecuado para un pH de 5.5.
2. Se empleará el pK_a2 del ácido cítrico (aproximadamente 4.7) para la preparación del tampón.
3. Para obtener 50 mL de una solución de tampón de citrato 0.1M a pH 5.5, se calcularán las concentraciones molares requeridas de ácido cítrico y citrato de sodio.
4. Utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$ se determinarán las cantidades necesarias de cada reactivo para obtener una relación de 0.63 entre citrato y ácido cítrico.
5. Por lo tanto, se necesitarán 0.0385 moles de ácido cítrico (7.406 g) y 0.0615 moles de citrato de sodio (11.655 g) para disolver en 50 mL de agua y obtener la solución tampón de citrato deseada a pH 5.5 y 0.1M.

5.3.7. Activación de levadura

Para rehidratar o activar la levadura liofilizada *Saccharomyces cerevisiae* (Fermipan), se inoculará 3.24 g/mL de levadura en 360 mL del medio de cultivo (cantidad necesaria para inocular el 10% a 18 matraces con 180 ml del medio), Se calentará el medio de cultivo a 30

°C, manteniéndose a temperatura constante (Roca; et al, (2022) y Jenkins; et al, (2011)). La activación se realizará en dos Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo la mitad del volumen y cantidad de levadura antes mencionada. Los matraces se taparán, dejándolos reposar durante 15 minutos para que la levadura pueda absorberse en el medio. Transcurrido ese tiempo, el matraz se transferirá a una incubadora termostática (BIOBASE, modelo BJPX-200B) a una velocidad de agitación de 150 rpm (Ruíz; et al, 2023), con un tiempo de incubación de 24 horas. Este paso es crucial para que las levaduras se activen y estén listas para la aplicación en los procesos fermentativos, teniendo así un óptimo rendimiento y mayor viabilidad celular.

5.3.8. Preparación del inóculo

1. Se preparará un inóculo con una concentración inicial de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL.
2. Se utilizarán Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml del medio de cultivo.
3. A cada Erlenmeyer se le agregará 10 % del inóculo de levadura ya activada (figura 2)

Cada matraz será transferido a una incubadora termostática (BIOBASE, modelo BJPX-200B) con una velocidad de agitación de 150 rpm (Ruíz; et al, 2023), a una temperatura de constante de 30 °C, durante un período de 32 horas de fermentación.

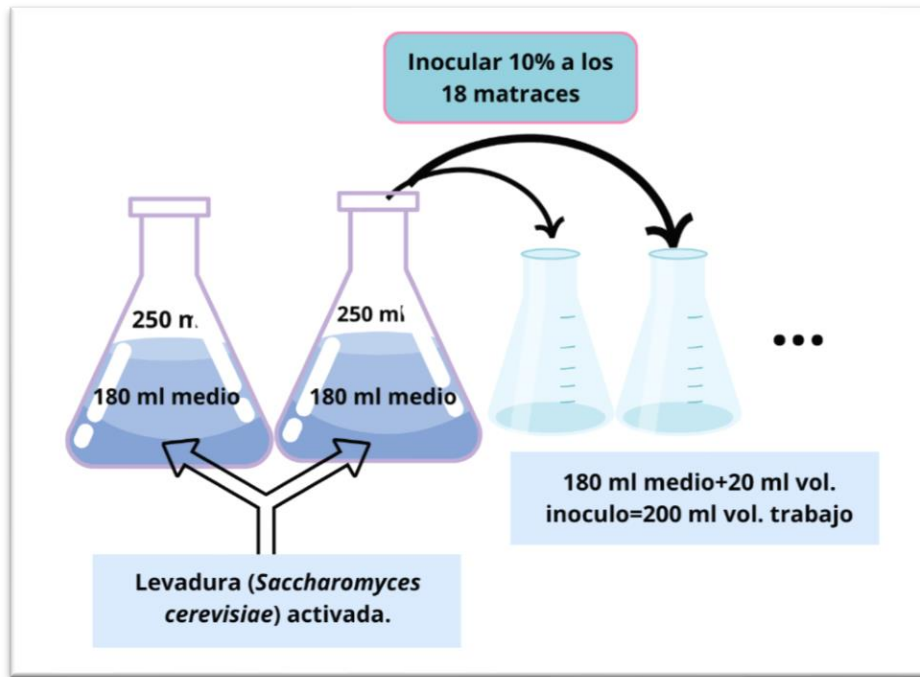


Figura 2. Inoculación de levadura a los diferentes matraces

5.3.9. Condiciones de operación

La fermentación alcohólica se llevará a cabo de forma anaeróbica a escala de matraces, realizando cultivos por lote en una incubadora con agitación orbital. La temperatura será de 30 °C (Holubářová; et al, 2000, citado por Vital y Larralde, 2016), con un pH inicial de 5.5 (Reyes, 2023), y 15 ° Brix. La fermentación se llevará a cabo durante 32 horas, con una agitación de 150 rpm (Ruíz, C; et al, 2023), utilizándose matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de trabajo de 200 mL cada uno.

5.3.10. Muestreo

Durante el proceso de fermentación, las muestras se tomarán cada 4 horas, siguiendo lo establecido por Téllez, et al, (2012), cada muestra se realizará a la hora exacta designada,

para mantener la precisión en el intervalo de muestreo. Se tendrán 18 matraces, y durante cada medición, comenzando desde el tiempo cero, hasta las 32 horas, se sacarán 2 matraces, los cuales serán procesados para realizar las mediciones analíticas correspondientes.

5.4. Metodología analítica

5.4.1. Determinación de la concentración de biomasa por peso seco

Siguiendo la metodología descrita por de Peña y Arango (2008), se tomará 1 mL de suspensión celular de cada matraz, en un tubo eppendorff de 1,5 mL, posteriormente se someterá a centrifugación a 12,000 rpm a 4°C, en una centrifuga sobremesa (Marca BECKMAN), luego se descartará el sobrenadante y se procederá a resuspender el pellet en agua destilada para repetir el proceso de centrifugación a las mismas condiciones. La resuspensión del pellet se repetirá dos veces. Finalmente, se eliminará el sobrenadante y se verterá el pellet húmedo en una charola de aluminio (esterilizada y previamente tarada), llevándolo a secado en un horno a 80 °C por 24 horas (figura 3).

La determinación del peso seco será determinada mediante la ecuación 2:

$$Peso\ seco = \left(g \frac{mS}{mL} \right) = \frac{(peso\ tubo + Muestra\ seca) - (Peso\ inicial\ tubo)}{Volumen\ de\ muestra}$$

Ecuación 2. Determinación de peso seco

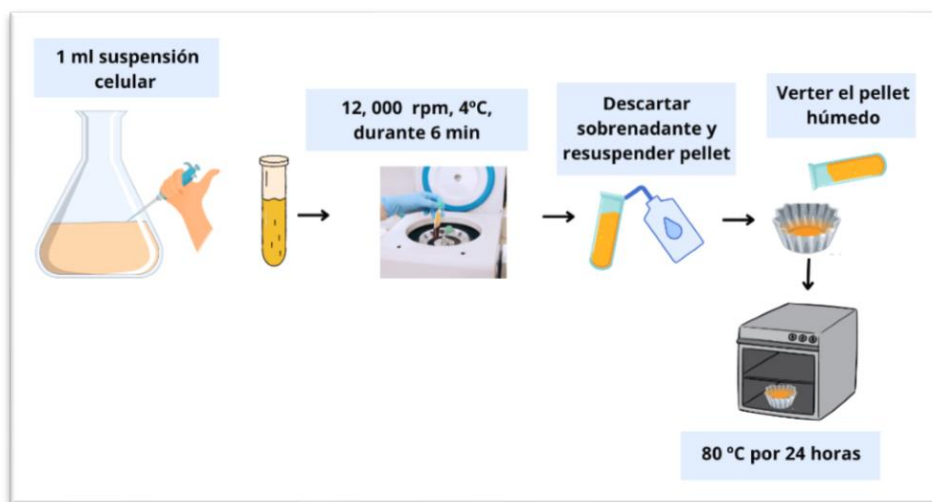


Figura 3. Proceso para determinación de peso seco

5.4.2. Determinación de etanol

La determinación de etanol, se llevará a cabo por el método de refractometría, siguiendo la metodología empleada por Santos y Zabala, (2016) y Patiño y Zabala (2020); este método es muy utilizado para medir la concentración del etanol presente en muestras problema, debido a que es una prueba de laboratorio rápida y sencilla. Para realizar este método, se prepararán cinco soluciones patrones de concentración: 1, 3, 5, 10 y 15 % v/v de etanol al 95%. Luego se medirá el índice de refracción (Ecuación 3) para cada una de las muestras con un refractómetro (Marca BOECO), y con los datos obtenidos, se trazará una curva de calibración (Concentración de etanol vs Índice de refracción), consiguiendo la ecuación de calibración, la cual será necesaria despejar la variable x , y así poder determinar la cantidad de etanol contenido en cada uno de los matraces.

$$y = mx + b$$

Ecuación 3. Ecuación del índice de refracción

Donde:

y: Índice de refracción

m: pendiente

x: % de etanol

b: Intercepto

5.4.3. Determinación de viabilidad celular

Para poder determinar la viabilidad celular se empleará lo descrito por Lange; et al, (1993), citado por Varilla, (2018). El análisis de células viables será realizado por medio de un microscopio, después de haber realizado una tinción con azul de metileno (Lange, et al., 1993). La muestra de 1 ml, relación 1:1, se mezclará volumen a volumen con el azul de metileno (la muestra se llevará a 10 ml de volumen total con agua destilada, para no exceder un máximo de 100 células), se dejará en contacto durante 10 min y posteriormente se verterá 1 ml de la muestra en un portaobjetos y se le colocará el cubreobjetos para poder realizar el conteo en el microscopio, tal como se observa en la figura 4. Las células que se encuentren viables no presentarán coloración; mientras que, las no viables, tomarán un color azul. Esta coloración puede deberse a dos motivos:

1. En las levaduras muertas el azul de metileno penetra en la célula, puesto que la membrana se vuelve permeable, mientras que en las levaduras vivas la permeabilidad de la membrana se mantiene evitando la penetración del azul de metileno.
2. En las levaduras vivas el azul de metileno penetra la célula y éste es reducido por una deshidrogenasa volviendo incoloro, mientras que en las levaduras muertas esto no sucede.

Este método permitirá evaluar la viabilidad celular de las levaduras durante la fermentación. El porcentaje de viabilidad celular (% V) será determinado mediante la ecuación 4:

$$\%V = \frac{Nv}{Nt} \times 100$$

Ecuación 4. Viabilidad celular

Dónde:

Nv: número de células vivas.

Nt: número de células totales.

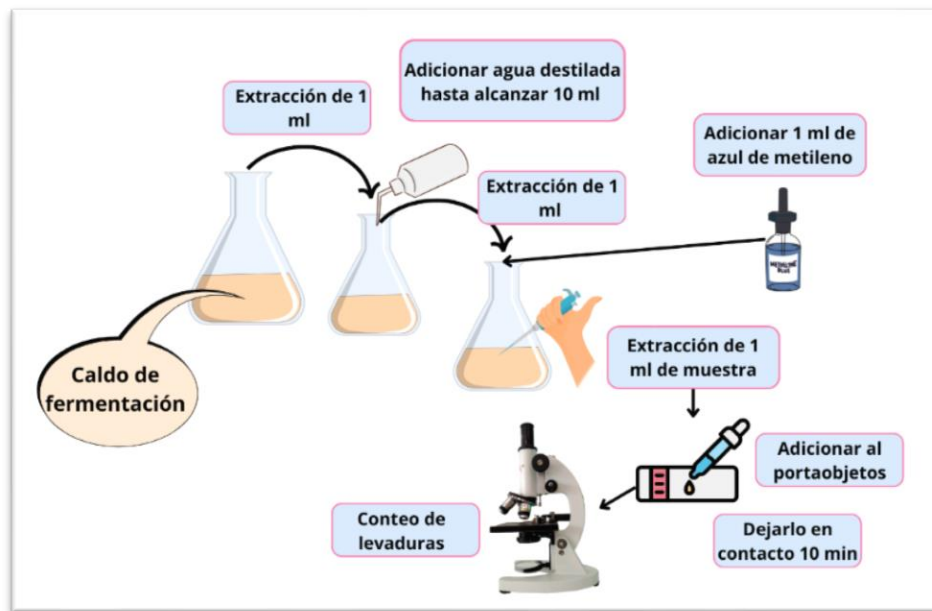


Figura 4. Proceso para la realización de viabilidad celular

5.4.4. Medición de pH

La medición del pH se realizará por triplicado en toda la fermentación, durante cada toma de muestra; esta medición se realizará utilizando 30 ml de muestra de cada matraz, esta cantidad se transferirá a un vaso de precipitación; y luego de ello, se introducirán los electrodos del potenciómetro en la muestra, asegurándose que no toquen el fondo ni las paredes del recipiente.

5.4.5. Acidez titulable

La acidez titulable, se determinará en cada uno de los matraces por triplicado, para hacer dicha medición se tomarán 10 mL de cada matraz, mediante titulación con NaOH 0.1N hasta el punto de viraje indicado por fenolftaleína al 1%, según el método descrito por Horwitz (2000). Haciendo uso de la ecuación 5, se determinará la acidez titulable, la cual estará expresada en porcentaje de ácido acético.

$$\text{Acidez titulable} = \% \text{ Ácido acético} = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * M_{eq}}{V_{muestra}}$$

Ecuación 5. Acidez titulable

5.4.6. Medición de grados Brix

Los °Brix se determinarán con un refractómetro digital de rango 0-95 °Brix, marca BOECO, para ello se colocará la muestra en el foco del prisma, mirando para el ocular, dirigiéndose hacia la luz hasta visualizar una línea definida en el espacio de observación, procediéndose a leer el índice de refracción en la escala superior; también se medirán en un refractómetro analógico, para lo cual, se colocará la muestra en el prisma(medidor de muestra), y se le dará leer, para poder anotar el índice de refracción mostrado. Se tomarán 1 ml de cada matraz, para poder llevar a cabo cada medición, las cuales se realizarán por triplicado.

5.4.7. Cálculo de parámetros cinéticos

A continuación, se muestran cada uno de los cálculos de parámetros cinéticos que se emplearán con los datos que se obtengan del trabajo de investigación:

5.4.7.1. Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) se representa mediante la ecuación diferencial (Ecuación 6). Donde X es la concentración de biomasa y t es el tiempo. 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.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Ecuación 6. Velocidad específica de crecimiento mediante ecuación diferencial

El modelo integrado de esta ecuación es:

$$X_{(t)} = X_o * e^{\mu t}$$

Ecuación 7. Modelo integrado de velocidad específica de crecimiento

Donde:

$X_{(t)}$ = concentración de biomasa en un tiempo (g/L. h⁻¹)

X_o = Concentración inicial de biomasa

e = base del logaritmo natural

Este modelo permite comprender la evolución de la concentración de biomasa bajo la influencia de la velocidad de crecimiento específica (μ), facilitando la estimación de la tasa de reproducción y crecimiento de los microorganismos en un entorno de cultivo determinado.

5.4.7.2. Rendimiento de biomasa

Para calcular el rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$ (g de biomasa /g de nutriente), se tomará como referencia la ecuación 8, descrita por Varilla, (2018):

$$Y_{x/s} = - \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

Ecuación 8. Rendimiento de biomasa

Dónde:

X_f = Concentración final de biomasa (gL^{-1}).

X_i = Concentración inicial de biomasa (gL^{-1}).

S_i = Concentración inicial de nutriente (gL^{-1}).

S_f = Concentración final de nutriente (gL^{-1}).

5.4.7.3. Rendimiento de producto

Según lo descrito por Varilla, A. (2018), la ecuación 9, determina el rendimiento de producto $Y_{p/s}$ (g de producto / g de sustrato):

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_i)}{-(S_i - S_f)}$$

Ecuación 9. Rendimiento de producto

Dónde:

P_f : Concentración final de producto (gL^{-1}).

P_i : Concentración inicial de producto (gL^{-1}).

5.4.7.4. Productividad volumétrica

La productividad volumétrica se determinará por medio de la ecuación 10, ecuación de productividad volumétrica (Q) (g de producto (etanol) / Litro * hora), empleada por Varilla, (2018).

$$Q = \frac{P_f}{t_f}$$

Ecuación 10. Productividad volumétrica

Dónde:

Q : Productividad volumétrica

t_f : Tiempo de fermentación donde se alcanza la máxima concentración de producto (h)

P_f : concentración de producto máxima alcanzada en el tiempo t_f (g/L)

VI. PRESUPUESTO

Presupuesto					
Materiales	unidad	Cantidad	Precio unidad		Precio total
Azúcar	Lb	3	L	24.00	L 72.00
Agua	Botellón	1	L	45.00	L 45.00
Papel aluminio	Unidad	2	L	60.00	L 120.00
Papel toalla	Unidad	4	L	40.00	L 160.00
Masking tape	Unidad	1	L	50.00	L 50.00
Levadura	Lb	1	L	70.00	L 70.00
Algodón	Bolsa grande	3	L	60.00	L 180.00
Redecilla	Unidad	3	L	5.00	L 15.00
Guantes	Caja	1	L	120.00	L 120.00
Marcador	Unidad	3	L	30.00	L 90.00
Agua destilada	Galón	1	L	140.00	L 140.00
Alcohol	Litro	1	L	150.00	L 150.00
Azúl de metileno	Unidad 50 ml	1	L	500.00	L 500.00
Sulfato diamónico	Unidad	1	L	450.00	L 450.00
Gasas	Caja	3	L	100.00	L 300.00
Total Aprox.					L 2,462.00

VII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

[illegible]

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Acosta Romero, C. 2012. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis MSC. Ingeniería Química. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 144 p. Disponible en <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/12251/300060.2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Arias Gil, M; Garde Cerdán, T; Ancín Azpilicueta, C. 2007. Influencia de la adición de amonio y diferentes concentraciones de aminoácidos sobre el metabolismo del nitrógeno en la fermentación espontánea del mosto. Química de Alimentos. 103(4):1312-1318. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606008260>

Colin, R. & Bjørn, K. 2006. Biotecnología Básica. 2º ed. Zaragoza-España. 214. p.

Chekanovab, K; Schastnayaa, E; Solovchenkoa, A; Lobakovaa, E. 2017. Effects of CO2 enrichment on primary photochemistry, growth and astaxanthin accumulation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 171, 58-66. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.028>

Cao Xuan Thuy; Van Thinh Pham; Trinh Thi Nhu Hang Nguyen; Thi Tuyet Ngan Nguyen; Nu Thuy An Ton; Tran Thi Tuu; Ngoc Duc Vu. 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. Disponible en <https://www.hindawi.com/journals/jfpp/2024/8841207/>

Decheco-Egúsquiza, AC. 2016. Aprovechamiento de residuos de *Ananas comosus* (piña) para la producción de etanol por vía fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Informe Final de Investigación. París, Francia. UNIVERSIDAD LE CORDON BLEU. 100 p. Disponible en <https://repositorio.ulcb.edu.pe/bitstream/handle/ULCB/35/INFORME%20FINAL%20%202016%20-%20DE%20CHECO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fajardo Castillo, EE; Sarmiento Forero; SC. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado para obtención del título de Microbiólogo Industrial. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. 120 p. Disponible en https://www.academia.edu/8012167/EVALUACI%C3%93N_DE_MELAZA_DE_CA%C3%91A_COMO_SUSTRATO_PARA_LA_PRODUCCI%C3%93N_DE_Saccharomyces_cerevisiae

Franco-Andrade, ML. 2019. Diseño de un biorreactor para la producción de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) de panificación, utilizando como sustrato melaza para la empresa panificadora Lefski-Pan. Tesis. Ing. Químico. Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 128 p. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10619/1/96T00526.pdf>

Godínez Hernández, CI. 2012. “Caracterización y eficiencia de la fermentación en la elaboración del mezcal potosino” Tesis Mtro. En Ciencias Ambientales. San Luis de Potosí,

México. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 99 p. Disponible en <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/3670/MCA1CYE01201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gómez Guerreiro, J; Nieto-Aravena, C. 2002. Compendio de bioquímica ilustrada. Lima. Universidad Nacional Agraria de la Molina. 252 p.

Guia-Feliche, GA. 2019. Producción de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) en un medio de cultivo formulado a base de melaza de caña de azúcar. Tesis. Lic. Biología. Caracas, Venezuela. 76 p. Disponible en <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/20472/1/Tesis%20Gabriel%20Guia%20Feliche%20CD.pdf>

Guillermo-Quinde, JI; Macías-Matamoro, AF. 2021. "Optimización del proceso de fermentación en la fabricación de tequila en la empresa "trancahuaico" oña-provincia del azuay". Tesis previa a la obtención del título de bioquímico farmacéutico. Cuenca-Ecuador. Universidad de cuenca. 115 p. Disponible en <https://1library.co/document/z3e0ddeq-optimizacion-proceso-fermentacion-fabricacion-tequila-empresa-trancahuaico-provincia.html>

Hernández Jimenez, SJ; Domínguez Toro, EL; Gonzaga Gutierrez, L. 2015. Influencia de campos magnéticos en el crecimiento de *E. coli* y *S. cerevisiae* y la capacidad de solubilizar fósforo en *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* de uso industrial. Revista de Ciencias 19 (1):109-121. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-19352015000100008&script=sci_abstract&tlng=es

Hernández Duarte, SY; Martínez Torres, CE. 2012. Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (piña) evaluando dos de sus principales variables (pH

y grados Brix) usando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 109 p. Disponible en <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-nacional-de-agricultura-y-agronomia/termodinamica-de-alimentos/tesis-trabajo-final-gracias/83324360>

Horwitz, W. 2000. Métodos oficiales de análisis de AOAC International. 17ª ed. Gaithersburg: 507. Asociación de químicos analíticos oficiales. Disponible en <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>

Heredia Peñafiel, KE; Kwok Tacan, EC. 2015. Aislamiento e identificación de las taxa de levaduras presentes en el fruto de taxo (*Passiflora mollissima*), con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica. Tesis previa a la obtención de Ing. Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito, Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana. 108 p. Disponible en <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9052/1/UPS-QT06733.pdf>

Mariscal Moreno, JP. 2011. Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Tesis MS. Ingeniería Química. Manizales, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 99 p. Disponible en <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8232/8108502.2011.pdf?sequence=1>

Mercado Esquivia, MB; Castaño Peláez, HI; Atehortúa Garcés, L; Acosta Cárdenas, A; Mejía Gómez, CE. 2014. Producción de etanol a partir de yuca en condiciones de alta concentración de sólidos (VHG). Revista Colombiana de Biotecnología. 16(1): 163-170. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/776/77631180019.pdf>

McKee, T; McKee, J. 2014. Las bases moleculares de la vida. Bioquímica. Mc Graw-Hill Education. Quinta Edición.

Mora Dután, YE. 2014. Modelación cinética de la fermentación alcohólica del zumo de Pomarrosa. Tesis. Ing. Química. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador, 150 p. Disponible en <https://core.ac.uk/download/pdf/71901879.pdf>

Mohd Azhara, SH; Abdullaa,b, R; Azmah Jamboa, S; Marbawia, H; Azlan Gansaua, J; Mohd Faika, AA Y Rodríguez, KF. 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. Informes de Bioquímica y Biofísica. 10, 52-61. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580816302424>

Peña, C y Arango, R. 2008. Evaluation of ethanol production using recombinant strains of *saccharomyces cerevisiae* from sugar cane molasses.

Patiño Ortiz, JA. 2020. Refractometría en bebidas alcohólicas. Santiago de Cali, Colombia. Universidad Icesi, pág. 1-11. Disponible en <https://www.studocu.com/co/document/universidad-icesi/analisis-instrumental/refractometria-de-bebidas-alcoholicas/7593487>

Robles, R. 2021. Condiciones óptimas del proceso de fermentación alcohólica del jugo de la Cabuya Azul (*Agave Americana*), empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis MS. Ingeniería Química. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 219 p. Disponible en https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/16795/Robles_cr.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Reyes, J. 2023. Cultivo de levadura: técnicas y consejos para obtener resultados óptimos. Vida Sustentable. Disponible en <https://vida-sustentable.com/como-se-cultiva-la-levadura/>

Regodón Mateos, JA. (2007). Obtención y Caracterización de Cepas Autóctonas de Levaduras para la Elaboración Estandarizada de Vinos de Calidad. Universidad de Extremadura. 352 p.

Roca Mesa, H; Delgado Yuste, E; Mas, A; Torija, MJ; Beltrán, J. 2022. Importance of micronutrients and organic nitrogen in fermentations with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, 381(109915):109915. Disponible en

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160522003877?via%3Dihub>

Ríos del Risco, CA., Fajardo, M; Pérez, JC. 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.

Ruiz de Villa, C; Poblet, M; Bordons, A; Reguant, C; & Rozès, N. 2023. Comparative study of inoculation strategies of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on the performance of alcoholic and malolactic fermentations in an optimized synthetic grape must. Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, 404 (110367):110367. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160523002830>

Ramirez Sánchez, O; Molina Córdoba, M. (2005). EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA *Sacharomyces cerevisiae* UTILIZANDO AGUA DE COCO COMO SUSTRATO. Ingeniería. Revista de la Universidad de Costa Rica, 15(1-2):91-102. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/441/44170516007.pdf>

Sablayrolles, JM; Mouret, JR. 2021. Capítulo 12-Gestión del nitrógeno durante la fermentación. *White Wine Technology*. 143-154. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128234976000272>

Santos Aguilar; Zabala García, DA. 2016. Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la Empresa de Alimentos SAS S.A.S. Tesis. Ing. Químico. Bogotá, Colombia. Fundación Universidad de América. 152 p. Disponible en <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/546/1/6102511-2016-2-IQ.pdf>

Sánchez, M; Anabel. 2011. Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Universidad tecnológica de la mixteca. p. 16-17.

Tesnière, C; Brice, C. & Blondin, B. 2015. Respuestas de *Saccharomyces cerevisiae* a la falta de nitrógeno en la fermentación alcohólica del vino. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 7025–7034. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6810-z>

Téllez Mora, P; Peraza Luna, FA; 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). *Revista mexicana de ingeniería química*, 11 (1):163–176. Disponible en https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000100014

Tesniere, C; Delobel, P; Pradal, M. y Blondin, B. 2013. Impacto del desequilibrio de nutrientes en las fermentaciones alcohólicas del vino: el exceso de nitrógeno mejora la muerte celular de las levaduras en mostos con limitación de lípidos. *PLoS One*, 8(4): e61645. Disponible en <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061645>

Walker, GM; Walker RSK. 2018. Capítulo tres: mejora de las fermentaciones alcohólicas con levadura. Avances en Microbiología Aplicada 105, 87-129. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065216418300194#preview-section-cited-by>

Walker, GM; Stewart, GG. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de Bebidas Fermentadas. Bebidas. 2(30): 1-12. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/310762331_Saccharomyces_cerevisiae_in_the_Production_of_Fermented_Beverages

Yegres, F; Fernández-Zeppenfeldt G; Padin GG; Rovero L; Richard-Yegres N. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* in the manufacturing of cocuy liquor. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 23(1): 1315-2556. Disponible en https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100012&lang=en

Velásquez, YA. 2015. “Evaluación del potencial fermentativo de *saccharomyces cerevisiae* etanol red utilizando nutrientes marca digra en la planta destiladora la Fe S.A de C.V.” Tesis Ing. Bioquímico. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, 71. P. Disponible en <https://repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/934/51125.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Vital López, P; Larralde Corona, CP. 2016. Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. Investigación y ciencia. 24(67): 86-91. Disponible en [https://www.redalyc.org/journal/674/67446178012/html/#:~:text=Algunas%20c%C3%A9lulas%20de%20Saccharomyces%20cerevisiae,las%20prote%C3%ADnas%20HSP104%20\(HSP%2C%20prote%C3%ADna](https://www.redalyc.org/journal/674/67446178012/html/#:~:text=Algunas%20c%C3%A9lulas%20de%20Saccharomyces%20cerevisiae,las%20prote%C3%ADnas%20HSP104%20(HSP%2C%20prote%C3%ADna)

Vázquez, HJ y Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 8(4):249–259. Disponible en

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004

Vicent Vela, MC; Zaragoza Carbonell, JL. 2006. *Química Industrial Orgánica*. España. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.

Varilla Mazaba, A. 2018. Estudio comparativo de la capacidad fermentativa entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red en la producción de etanol. Tesis. Maestro. Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Veracruz, México. Instituto Tecnológico de Veracruz, 100 p. Disponible en <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/bitstream/TecNM/2498/1/2018%20Armando%20Varilla%20Mazaba.pdf>