

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**EVALUACIÓN DE FOSFATO DE POTÁSICO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO
(*Saccharomyces cerevisiae*) PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.**

POR:

ALLEN FABRICIO VASQUEZ MALDONADO

ANTEPROYECTO DE TESIS



CATACAMAS

OLANCHO

JUNIO, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**EVALUACIÓN DE FOSFATO DE POTÁSICO EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO
(*Saccharomyces cerevisiae*) PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.**

POR:

ALLEN FABRICIO VASQUEZ MALDONADO

FRANCISCO ENRIQUE SANCHEZ ROSALES M. Sc

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

JUNIO, 2024

CONTENIDO

	Pág.
I INTRODUCCIÓN.....	4
II OBJETIVOS	6
Objetivo general	6
Objetivos Específicos	6
III HIPÓTESIS	7
Hipótesis nula (Ho)	7
Hipótesis alternativa (Hi)	7
IV REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
4.1 Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	8
4.2 Fermentación alcohólica	9
4.3 Factores de influencia en la fermentación alcohólica	10
4.4 Requerimientos nutricionales	11
4.4.1 Macronutrientes.....	12
4.4.2 Micronutrientes	12
4.5 Importancia del fósforo en la fermentación	13
4.6 Tipos de fuentes de fosforo en la producción de etanol con <i>S. cerevisiae</i>	13
4.6.1 Fuentes de fósforo inorgánico.....	14
V MATERIALES Y MÉTODO.....	16
5.1 Localización.....	16
5.2 Materiales	16
5.3 Reactivos	16

5.4	Equipos	17
5.5	Instrumentos de laboratorio	17
5.6	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	18
5.6.1	Variable independiente	18
5.6.2	Variable dependiente	18
5.6.3	Diseño y análisis estadístico	18
5.6.4	Tratamientos	19
5.6.5	Medio de cultivo	19
5.6.6	Preparación del inóculo	20
5.6.7	Activación de la levadura	20
5.6.8	Condiciones de operación	20
5.6.9	Preparación del medio del cultivo	21
5.6.10	Muestreo	21
5.7	METODOLOGÍA ANALÍTICA	21
5.7.1	Determinación de la concentración de biomasa por peso seco	21
5.7.2	Determinación de etanol	22
5.7.3	Determinación de viabilidad celular	22
5.7.4	Medición de pH	23
5.7.5	Acidez titulable	23
5.7.6	Medición de grados Brix.....	23
	CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS	24
5.7.7	Velocidad Específica de Crecimiento	24
5.7.8	Productividad Volumétrica (QP)	24
5.7.9	Rendimiento de Biomasa (Yx/S).....	25
5.7.10	Rendimiento de Producto (YP/S)	25

VI PRESUPUESTO.....	26
VII CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	28
VIII BIBLIOGRAFÍA	29

I INTRODUCCIÓN

La producción de biocombustibles, especialmente de etanol, a partir de fuentes renovables como la biomasa lignocelulósica, ha ganado relevancia en la industria biotecnológica debido a su potencial para reducir la dependencia de los combustibles fósiles y disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero. En este contexto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* juega un papel crucial, ya que es uno de los principales microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica gracias a su capacidad para convertir los azúcares en etanol y dióxido de carbono. (GUTIÉRREZ, 2024)

Sin embargo, la optimización de la producción de etanol sigue siendo un desafío, y se ha observado que la eficiencia de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* puede ser influenciada por diversos factores, entre ellos, la disponibilidad de nutrientes esenciales como el fosfato de potásico. Este es un componente clave en los medios de cultivo utilizados en la fermentación alcohólica, ya que es necesario para el crecimiento celular y la producción de biomasa. (Ruiz, 2020) A pesar de su importancia, el efecto específico de este nutriente en la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol no ha sido completamente caracterizado.

En el marco de esta investigación, se pretende profundizar en la relación entre la adición de fosfato de potásico y la eficiencia de crecimiento de la levadura, específicamente de *Saccharomyces cerevisiae*, durante el proceso de fermentación para la producción de etanol. Se busca determinar cómo diferentes concentraciones de fosfato de potásico impactan la cinética de crecimiento de la levadura y, en última instancia, su capacidad para sintetizar etanol. Esta evaluación detallada permitirá comprender mejor la influencia de este

compuesto en el rendimiento del proceso de fermentación y, potencialmente, optimizar las condiciones de producción de etanol.

II OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la cinética de crecimiento con diferentes concentraciones de potasio en *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de etanol.

Objetivos Específicos

Evaluar las diferentes concentraciones de fosfato de potasio que maximicen el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para producción de etanol.

Cuantificar la cantidad de etanol sintetizado por la levadura en función de las diferentes concentraciones de fosfato de potasio.

Analizar la influencia del fosfato de potasio sobre la productividad volumétrica y rendimiento de la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

III HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H₀): El incremento en las concentraciones de fosfato de potasio, como fuente de fósforo, no influirá en el rendimiento de etanol durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Hipótesis alternativa (H_i): El incremento en las concentraciones de fosfato de potasio, como fuente de fósforo, al menos una influirá en el rendimiento de etanol durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

IV REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Saccharomyces cerevisiae es una especie de levadura perteneciente al grupo de los ascomicetos, un hongo unicelular con un tamaño promedio de aproximadamente 5-10 micrómetros de diámetro. Esta levadura es facultativa, lo que significa que puede crecer en ambientes con o sin oxígeno, preferiblemente, crecen en ambientes anaeróbicos para realizar la fermentación alcohólica de manera más eficiente. (Taubas, 2023) *S. cerevisiae* es conocida comúnmente como la levadura de industria panadera debido a su capacidad de esponjar la masa y hacerla levantar durante el proceso de fermentación. Además de su importancia en la producción de pan y bebidas alcohólicas, esta levadura es ampliamente utilizada como modelo en estudios científicos debido a su ciclo de vida con una fase sexual, lo que facilita los estudios genéticos detallados.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* desempeña un papel crucial en la producción industrial de etanol debido a sus cualidades deseables y capacidades únicas. Esta especie se destaca por su rápida tasa de crecimiento, su eficiente metabolismo anaeróbico de la glucosa y su capacidad para producir grandes cantidades de etanol. Además, muestra una alta productividad y un rendimiento significativo, lo que la convierte en un organismo ideal para la fermentación alcohólica a nivel industrial. Uno de los aspectos más importantes de *Saccharomyces cerevisiae* es su capacidad para tolerar una amplia gama de factores de estrés ambiental. Esta levadura puede sobrevivir y funcionar adecuadamente en entornos con altas concentraciones de etanol, bajos niveles de pH y escasez de oxígeno. (Flávia da Silva Fernandes, 2022) Esta tolerancia a condiciones adversas es crucial en entornos de producción de etanol, donde las condiciones pueden ser extremas y variables.

Además de su resistencia a condiciones estresantes, *Saccharomyces cerevisiae* exhibe una serie de características deseables que la hacen ideal para la producción de etanol. Estas incluyen una alta capacidad de fermentación, una eficiente conversión de azúcar a etanol, bajos niveles de glicerol y una alta productividad. La levadura también muestra una buena eficiencia de fermentación, altas tasas de crecimiento celular y una rápida velocidad de consumo de sustrato. Estas cualidades hacen que *Saccharomyces cerevisiae* sea una opción popular y efectiva para la producción industrial de etanol (Caridad Suárez-Machín*, 2016).

4.2 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico fundamental que ocurre en ausencia de oxígeno, es decir, de manera anaeróbica. Este proceso es llevado a cabo por microorganismos, principalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, que metabolizan hidratos de carbono, como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, para producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) y metabolitos como el etanol y el dióxido de carbono. En el caso del etanol, este producto es ampliamente utilizado en la industria alimentaria para la producción de bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza, la sidra y otras, debido a sus propiedades organolépticas y preservativas. Además, el etanol también tiene aplicaciones industriales como biocombustible, siendo un componente clave en la producción de biocombustibles de primera generación. (Brice, 2024) Este proceso de fermentación alcohólica no solo es relevante en la industria alimentaria y energética, sino que también ha sido objeto de estudios científicos (Alejandro Marín, 2016), (Cao Thuy, 2024), (Gómez-Luna, 2024) para comprender mejor los mecanismos bioquímicos y genéticos involucrados en este proceso, lo que ha contribuido al desarrollo de tecnologías y procesos más eficientes en la producción de etanol y otros productos derivados de la fermentación.

El metabolismo de producción de etanol (figura 1), fundamental en diversos procesos biológicos, se basa en el ciclo de la glucosa, un proceso esencial en el cual la glucosa se

convierte en energía. Este ciclo se divide en dos etapas principales: la glucólisis, que ocurre en el citoplasma y convierte la glucosa en piruvato, y la respiración celular, que tiene lugar en las mitocondrias y transforma el piruvato en Acetil-CoA, generando ATP y NADH. En condiciones de oxígeno suficiente, el piruvato entra en la respiración celular para producir energía. (Teresa Zamora-Hernández, 2014) Sin embargo, en ausencia de oxígeno suficiente, el piruvato se fermenta para producir ácido láctico o etanol. Este proceso, conocido como fermentación, se lleva a cabo en el citoplasma y produce menos ATP que la respiración celular. La fermentación es un proceso clave en la producción de etanol, ya que permite que las levaduras conviertan la glucosa en etanol y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno.

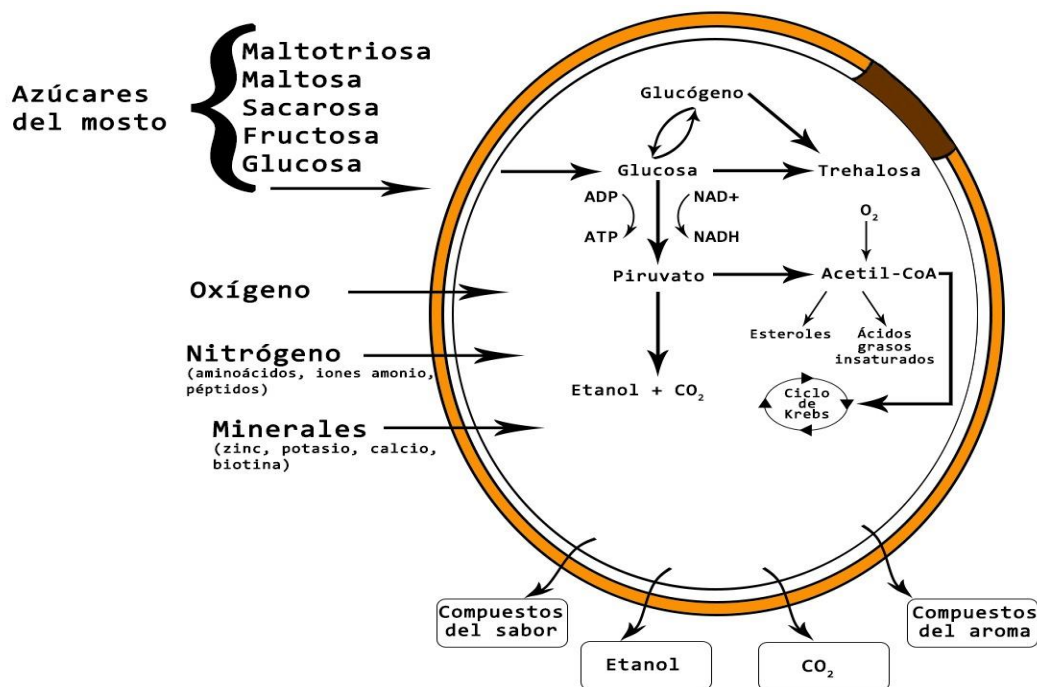


Figura 1. Metabolismo de la Glucosa en la Célula.

4.3 Factores de influencia en la fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico complejo en el que intervienen diversos factores que pueden afectar su eficacia y productividad. Entre los factores clave que influyen en la fermentación alcohólica en *Saccharomyces cerevisiae*, el pH del medio de

fermentación es crítico. El rango óptimo de pH para este proceso se encuentra generalmente entre 4,0 y 5,0, lo que favorece el crecimiento de la levadura, la velocidad de fermentación y la eficiencia en la producción de etanol (Siti Azhara, 2017). El control cuidadoso del pH es crucial, ya que desviaciones significativas pueden reducir la concentración de etanol, disminuir la velocidad de fermentación y afectar el metabolismo y la productividad de la levadura. Por lo tanto, mantener el pH dentro de este rango es fundamental para asegurar un proceso de fermentación eficiente y productivo (Corona, 2016).

La temperatura óptima para la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocida como levadura, suele oscilar entre 25°C y 30°C. Este rango de temperatura es ideal para maximizar la actividad de la levadura y promover procesos de fermentación eficientes. Sin embargo, es importante señalar que la temperatura óptima específica puede variar en función del tipo de proceso de fermentación y del resultado deseado (Cao Thuy, 2024).

La acidez en la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* es un factor crucial en su desarrollo, juega un papel fundamental en su crecimiento y reproducción. Según. (Orozco, 2023). Esta levadura tiende a prosperar en condiciones ligeramente ácidas, se han reportado valores de acidez total en el rango de 0.1 a 0.5 g/L de ácido acético y 0.2 a 0.8 g/L de ácido láctico. (Peña and Arango 2009)

4.4 Requerimientos nutricionales

Los macronutrientes y micronutrientes desempeñan un papel crucial en el proceso de fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura común utilizada en la fermentación industrial, incluida la producción de etanol.

4.4.1 Macronutrientes

Saccharomyces cerevisiae requiere varios nutrientes para llevar a cabo su metabolismo y crecimiento durante la fermentación alcohólica. Entre los macronutrientes necesarios se encuentra la fuente de carbono, que se utiliza para producir energía y biomasa. Habitualmente, se emplean glucosa, sacarosa y otros azúcares en estos procesos. El nitrógeno también es esencial, ya que se necesita para la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. La levadura puede utilizar iones de amonio, aminoácidos y péptidos como fuentes de nitrógeno. El fósforo es otro nutriente importante, ya que participa en la síntesis de ácidos nucleicos, la transferencia de energía y la estructura de las membranas. Además, el azufre es necesario para la síntesis de proteínas y el metabolismo celular, ya que es un componente de los aminoácidos y las vitaminas. (V. L. Belini, 2017)

4.1.2 Micronutrientes

En cuanto a los micronutrientes, el hierro es esencial para el transporte de electrones y la síntesis del hemo, importante para las reacciones redox. El zinc actúa como cofactor de enzimas implicadas en la replicación del ADN, la transcripción del ARN y la síntesis de proteínas. El cobre es necesario para enzimas en el transporte de electrones y mecanismos antioxidantes. Por su parte, el manganeso participa en reacciones enzimáticas, defensa antioxidante y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. El molibdeno es esencial para las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno, y el níquel actúa como cofactor de enzimas específicas como la ureasa. El cobalto es un componente de la vitamina B12, importante para la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo de los aminoácidos. Finalmente, el selenio actúa como antioxidante, protegiendo a las células del estrés oxidativo durante la fermentación. (Alejandro Marín, 2016)

4.5 Importancia del fósforo en la fermentación

El fósforo desempeña un papel crucial en la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es un nutriente esencial para el crecimiento de la levadura y la producción de enzimas. El fósforo es un componente clave del ATP, que es el principal portador de energía en las células y es necesario para diversos procesos celulares, incluida la síntesis de enzimas implicadas en la fermentación. (C. Amadi, 2020) Además, esencialmente, la síntesis de fosfolípidos, componentes críticos de la estructura y función de la membrana celular durante la fermentación. Sin una cantidad adecuada de fósforo, la levadura no puede desarrollarse adecuadamente ni producir las enzimas necesarias para llevar a cabo la fermentación de manera eficiente.

Por último, juega un papel crucial en la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Además de su papel en la síntesis de ATP, que es vital para la fosforilación de la glucosa durante la glucólisis (una vía central en la fermentación del etanol), es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas necesarios para varias reacciones enzimáticas implicadas en el metabolismo de los azúcares en etanol. (Carolina Peña, 2008) Por lo tanto, garantizar un suministro adecuado de este nutriente es esencial para optimizar tanto la eficacia de la fermentación como la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

4.6 Tipos de fuentes de fosforo en la producción de etanol con *S. cerevisiae*

En la producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden utilizar diversas fuentes de fósforo para favorecer el crecimiento de la levadura y la fermentación. Algunos tipos comunes de fuentes de fósforo incluyen:

4.6.1 Fuentes de fósforo inorgánico

El ácido fosfórico (H_3PO_4) es un ácido fuerte que se disocia en agua para liberar iones fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}). Estos componentes sirven como nutrientes cruciales para las células de levadura, participando en varios procesos metabólicos, incluyendo la síntesis de ATP y la producción de ácido nucleico. El ácido fosfórico se utiliza a menudo para ajustar el pH del medio de fermentación y, al mismo tiempo, proporcionar fósforo para el crecimiento de la levadura y la producción de etanol. (Whasley Ferreira Duarte, 2011)

El fosfato potásico (KH_2PO_4) juega un papel crucial en la producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* al proporcionar nutrientes esenciales, especialmente fósforo y potasio, necesarios para su crecimiento y metabolismo durante la fermentación. En los procesos de producción de etanol, añadir este compuesto al medio de fermentación puede mejorar el crecimiento celular, el mantenimiento y la producción de etanol. Ya que es uno de los nutrientes esencial para varios procesos celulares, como el metabolismo energético y la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. (Whasley Ferreira Duarte, 2011) Estudios recientes han destacado la importancia del suministro del compuesto en forma de fosfato potásico para potenciar el rendimiento de etanol y la actividad de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que conlleva a mejorar la eficacia y el rendimiento de la fermentación. En la investigación llevada a cabo por (Jehan, Hijri, & Khadam, 2023) se empleó una concentración de 3.18 g/L de fosfato de potasio, obteniendo un rendimiento de 62 g/L de etanol. Por otro lado, el estudio realizado por (Serna, Gil, & PeláezJaramillo, 2011) incluyó tratamientos con concentraciones de 1 g/L y 2 g/L, resultando en un incremento de 37.1 g/L de etanol. Esta variación en las concentraciones de fosfato potásico demostró una relación directa con un mayor rendimiento de etanol. Los resultados positivos observados en ambas investigaciones indican una mejora significativa en la eficiencia global de la fermentación, lo que sugiere un aumento en la producción de etanol y una fermentación más efectiva en general.

V MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Localización

La investigación se realizará en el Laboratorio de biotecnología de la Universidad Nacional de Agricultura, donde se cuentan con los equipos necesarios para llevar a cabo los procesos de fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2 Materiales

- Algodón
- Gasas
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Cinta adhesiva
- Marcador

5.3 Reactivos

- Fenolftaleína 1%
- Fosfato de potasio
- Hidróxido de Sodio 0,1 N
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- Sacarosa (azúcar comercial)

- Azul de metileno
- Ácido cítrico
- Citrato de sodio

5.4 Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza digital
- Centrifuga
- Desecador
- Horno de laboratorio
- Incubadora biobase
- pHmetro
- Refrigerador
- Termómetro
- Hidrómetro
- Microscopio

5.5 Instrumentos de laboratorio

- Beaker
- Embudo
- Filtros
- Matraz Erlenmeyer
- Mechero
- Perillas
- Pipetas

- Pinzas
- Probetas
- Tubos de centrifuga
- Tubos de ensayos
- Vaso de precipitación
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hemocitómetro
- Plato calentador agitador

5.6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.6.1 Variable independiente

- Concentración de nutriente (fosfato de potasio)
- pH
- Temperatura
- Tiempo de fermentación

5.6.2 Variable dependiente

- Rendimiento de etanol
- °Brix
- Rendimiento de biomasa (levadura *S. cerevisia*)

5.6.3 Diseño y análisis estadístico

Se aplicará un diseño experimental completamente aleatorizado de un factor con tres niveles, replicando cada tratamiento tres veces. Posteriormente, se evaluarán los resultados experimentales mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el software estadístico InfoStat. Además, se realizará una prueba de comparación múltiple de Tukey para analizar las diferencias entre los tratamientos.

5.6.4 Tratamientos

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

Tratamiento	Concentración de fosfato de potasio
T1	0.5 g/L
T2	1.5 g/L
T3	3.18 g/L

Nota: En la tabla se muestran las formulaciones experimentales que se utilizarán en la investigación las cuales se tomaron en base a una revisión de literatura (Jehan, Hijri, & Khadam, 2023), (Serna, Gil, & PeláezJaramillo, 2011), con un factor de fosfato de potasio que cuenta con tres niveles de concentración. Este diseño permitirá evaluar el efecto del fosfato de potasio en las variables de interés.

5.6.5 Medio de cultivo

Tabla 2. Tratamientos de acuerdo a cada medio de cultivo.

Tratamiento	Azúcar (°Brix)	Fosfato de potasio (g/L)	Fuente de nutrientes
T1	20	0.5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.6 g/L MgSO ₄ *7H ₂ O 0.1 g/L
T2	20	1.5	
T3	20	3.18	

Nota: La tabla muestra diferentes tratamientos con los grados brix específico, fosfato de potasio (Jehan, Hijri, & Khadam, 2023) (Serna, Gil, & PeláezJaramillo, 2011) y levadura, junto con el volumen de agua utilizado y sus fuentes de nutriente (C. Amadi, 2020).

5.6.6 Preparación del inóculo y medio de cultivo

En la etapa inicial de preparación del inóculo, se pesarán los tratamientos según la tabla 2 del medio de cultivo. Se preparará una solución en beakers con 3240 mL de agua destilada. Posteriormente, se procederá a ajustar el pH a 5.5 con un tampón (buffer) de citrato y se utilizará un valor de 20°Brix. Téllez-Mora, (2012) A continuación, se llevarán a cabo pruebas fisicoquímicas, las cuales incluyen la medición del pH, el porcentaje de ácidos titulables y el grado Brix. Se trasvasará el medio de cultivo de los beakers a los matraces Erlenmeyer, teniendo un total de 18 matraces con 180 ml del medio de cultivo, cada uno con sus respectivos tapones. Estos matraces se esterilizarán en un autoclave a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos.

5.6.7 Activación de la levadura

Se activará la levadura de panificación *Saccharomyces Cerevisiae* en forma liofilizada, se sigue un proceso específico. Inicialmente, se inoculará 6.48 g/L de levadura en 360 ml de medio de cultivo calentado a 35 °C, manteniéndose esta temperatura constante durante 24 horas a 150 rpm en la incubadora con agitación.

5.6.8 Condiciones de operación

Se realizarán cultivos por lote en una incubadora con agitación orbital. La temperatura será de 30 °C (Alyaa Abdulhussein Khadam, 2023), durante 40 horas, con una agitación de 200 rpm. Se trabajará con matraces Erlenmeyer de 250 ml, utilizando un volumen de 200 ml en cada uno, el cual tendrá un pH de 5.5 (Alejandro Marín, 2016).

5.6.9 Preparación del medio del cultivo

Para la preparación de los reactivos, se procederá a pesar el fosfato de potasio, la sacarosa (azúcar comercial) y las fuentes de nutrientes según lo indicado en la Tabla 2. Posteriormente, se medirán 180 mL de agua destilada en cada matraz Erlenmeyer, recomendándose el uso de un plato calentador agitador para una mejor homogeneización de la sacarosa. Luego de los análisis correspondientes, los matraces Erlenmeyer se llevarán a un autoclave a 120°C durante 20 minutos y se dejarán enfriar antes de agregar la levadura hidratada.

5.6.10 Muestreo

Durante el proceso de fermentación, se llevará a cabo un plan de muestreo para monitorear la evolución de la reacción. Siguiendo las pautas establecidas, se realizará la toma de muestras cada 5 horas, extrayendo 5 ml de medio de cultivo en cada muestreo. Se utilizarán 18 matraces, Erlenmeyers de los cuales se descartarán 2 matraces Erlenmeyers cada 5 horas por 40 horas para realizar los análisis pertinentes.

5.7 METODOLOGÍA ANALÍTICA

5.7.1 Determinación de la concentración de biomasa por peso seco

La determinación de la concentración de biomasa por peso seco se llevará a cabo siguiendo un procedimiento detallado según (Arana, 2010). Se extraerá 1mL de suspensión celular de cada matraz Erlenmeyer y se trasladó a un tubo Eppendorff de 1,5mL. Esta muestra se someterá a centrifugación a 12000 rpm a 4°C durante 6 minutos, descartando el sobrenadante posteriormente y resuspendiendo el pellet en agua destilada para repetir el proceso de centrifugación en las mismas condiciones. Este paso de resuspensión se repetirá

dos veces. Una vez completadas las centrifugaciones, se eliminación del sobrenadante y el pellet húmedo se secó en un horno usando capacillos a 80°C por 24 horas o hasta alcanzar un peso constante. La biomasa se obtendrá con la siguiente ecuación: *Biomasa g/mL* =

$$\frac{(Masa\ tubo + Muestra\ seca) - Masa\ inicial\ del\ tubo}{Volumen\ inicial}$$

5.7.2 Determinación de etanol

La determinación del contenido de etanol se realizará mediante el método de refractometría. Se prepararán cinco soluciones patrón de concentración: 1%, 3%, 5%, 10% y 15% v/v de etanol al 95%. A continuación, se medirá el índice de refracción para cada muestra con un refractómetro y se trazará una curva de calibración (Concentración de etanol vs Índice de refracción) para obtener la ecuación de calibración. Posteriormente, se tomarán muestras de cada matraz y se les medirá el índice de refracción. Utilizando la ecuación de calibración $Y = mx + b$, se calculará la concentración de etanol presente en los matraces. (Patiño, 2020). Donde y = índice de refracción, m= pendiente, x= % de etanol y b= intercepción.

5.7.3 Determinación de viabilidad celular

Se llevará a cabo la determinación de la viabilidad de las células de levadura mediante un proceso. Se diluirá la suspensión de levadura con solución de azul de metileno hasta alcanzar aproximadamente 100 células visibles en un campo microscópico. Posteriormente, se depositará una pequeña gota de la suspensión en un portaobjetos para su observación microscópica detallada con un aumento de 400 tras 10 minutos de contacto con la tintura. Se procederá a contar un total de 400 células, registrando el estado de cada una, ya sea muerta, rota, reseca, en plasma o germinada. Las células germinadas se contarán según la relación con la célula madre. Aquellas células teñidas de azul claro serán consideradas como células vivas. Este procedimiento minucioso permitirá obtener datos

precisos sobre la viabilidad de las células de levadura, el cual se realizará mediante la ecuación $\frac{T-C}{T} * 100$. Donde T=Total de células contadas y C=Células muertas o teñidas de azul oscuro.

5.7.4 Medición de pH

Se procederá a homogeneizar la muestra mediante agitación previa al procedimiento. La determinación se llevará a cabo por triplicado, iniciando con la transferencia de 30 ml de muestra a un vaso de precipitación, seguido de una mezcla cuidadosa. Posteriormente, se introducirán los electrodos del potenciómetro en la muestra, asegurando que no toquen ni el fondo ni las paredes del recipiente.

5.7.5 Acidez titulable

Se empleará el método potenciométrico conforme a la norma NTE INEN-ISO 750:2013. Para ello, se tomarán 10 ml de la fermentación de cada muestra, a los cuales se les añadirá una gota de fenolftaleína al 1% con una pipeta. Luego, se procederá a la adición de NaOH hasta que se observe un cambio de color en la muestra. La acidez titulable se expresará en porcentaje de ácido acético y se calculará mediante la ecuación especificada en el procedimiento.

$$Acidez\ titulable = \% Acido\ acetico = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * M_{eq}}{V_{muestra}}$$

5.7.6 Medición de grados Brix

Para determinar la biomasa obtenida según el método AOAC (2007), se utilizará un refractómetro portátil. Inicialmente, las muestras de la fermentación se llevarán a una temperatura de 20 °C en un baño de agua controlado. Posteriormente, se tomará una gota de la muestra con un gotero o pipeta, la cual se colocará en el refractómetro para su análisis. Este proceso permitirá evaluar con precisión la concentración de concentración de sólidos solubles totales presente en las muestras, siguiendo un enfoque estandarizado y confiable como el establecido por el AOAC.

CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS

5.7.7 Velocidad Específica de Crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) se representa mediante la ecuación diferencial $\frac{dX}{dt} = \mu X$, 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. El modelo integrado de esta ecuación es $X_{(t)} = X_o * e^{\mu t}$, donde $X_{(t)}$ es la concentración de biomasa en un tiempo t , X_o es la concentración inicial de biomasa, e es la base del logaritmo natural y t es el tiempo. 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.

5.7.8 Productividad Volumétrica (Q_p)

La productividad volumétrica, denotada como Q_p , se calcula como $Q_p = \frac{P}{V \cdot t}$, donde P (concentración de etanol) es la cantidad de producto formado, V es el volumen del medio de cultivo y t es el tiempo. Esta medida refleja la eficiencia con la que se produce biomasa o producto en relación con el volumen de medio y el tiempo de cultivo, siendo fundamental para evaluar la eficacia de los procesos fermentativos.

5.7.9 Rendimiento de Biomasa ($Y_{x/s}$)

El rendimiento de biomasa se expresa mediante la fórmula $Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$, donde ΔX es el cambio en la concentración de biomasa y ΔS es el cambio en la concentración de nutriente. Este parámetro indica la eficiencia con la que el microorganismo convierte el sustrato en biomasa, permitiendo cuantificar la cantidad de biomasa generada a partir del sustrato consumido durante la fermentación.

5.7.10 Rendimiento de Producto ($Y_{p/s}$)

Por otro lado, el rendimiento de producto se calcula como $Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$, siendo ΔP el cambio en la concentración de producto y ΔS el cambio en la concentración de sustrato. Este índice revela la eficacia con la que el microorganismo transforma el sustrato en producto final durante el proceso de fermentación, proporcionando información crucial sobre la conversión del sustrato en el producto deseado.

VI PRESUPUESTO

Material	Cantidad	Unidad	Precio Unitario (Lempiras)	Precio Total (Lempiras)
Algodón	1 caja	caja	100	100
Gasas	1 caja	caja	150	150
Papel aluminio	3 rollos	rollo	50	150
Papel toalla	2 rollos	rollo	25	50
Cinta adhesiva	1 rollo	rollo	30	30
Marcador	2 unidades	unidad	20	40
Fenolftaleína 1%	1 frasco	frasco	250	250
Fosfato de potasio	1 libra	libra	750	750
Hidróxido de Sodio 0,1 N	1 frasco	frasco	300	300
Levadura <i>S. cerevisiae</i>	1 sobre	sobre	100	100
Sacarosa (azúcar)	2 libras	libra	50	100
Azul de metileno	1 frasco	frasco	200	200
Ácido cítrico	1 libra	libra	570	570
Citrato de sodio	1 libra	libra	560	560
Autoclave	1 unidad	unidad	25,000	25,000
Balanza analítica	1 unidad	unidad	10,000	10,000
Balanza digital	1 unidad	unidad	2,000	2,000
Centrifuga	1 unidad	unidad	8,000	8,000
Desecador	1 unidad	unidad	5,000	5,000
Horno de laboratorio	1 unidad	unidad	7,000	7,000
Incubadora biobase	1 unidad	unidad	40,424	40,424
pHmetro	1 unidad	unidad	4,000	4,000
Refrigerador	1 unidad	unidad	8,000	8,000
Termómetro	1 unidad	unidad	200	200
Hidrómetro	1 unidad	unidad	300	300
Microscopio	1 unidad	unidad	5,000	5,000
Beaker 1000 mL	4 unidades	unidad	150	600
Embudo	2 unidades	unidad	50	100
Filtros (caja)	1 caja	caja	200	200
Matraz Erlenmeyer 250 mL	180 unidades	unidad	30	5,400

Mechero	1 unidad	unidad	300	300
Perillas	1 caja	caja	100	100
Pipetas	1 juego	juego	500	500
Pinzas	1 unidad	unidad	150	150
Probeta	2 unidades	unidad	200	400
Tubos de centrifuga	6 unidades	unidad	50	300
Total				126324

VII CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades para realizar	Junio				Julio				Agosto				Septiembre			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
Etap a I. Fermentación.																
Etap a II. Análisis fisicoquímicos.																
Etap a III. Análisis e interpretación de resultados.																
Redacción del informe.																
Defensa del trabajo de investigación																

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro Marín, Y. L. 2016. PRODUCTION OF ETHANOL BY *Saccharomyces cerevisiae* AND *Zymomonas mobilis*. (en línea) *Laboratorio de biotecnología. Universidad Autónoma del Carmen, Facultad de Química.*, 551-563.consultado el 5 de feb 2024 disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/302/30246698001.pdf>
- Alyaa Abdulhussein Khadam, J. A. 2023. Determination the Optimum Conditions for β -glucan Production Extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. (en línea) *Mustansiriyah Journal of Science*, 32-43. Consultado el 5 de feb 2024 disponible en: <https://mj.s.uomustansiriyah.edu.iq/index.php/MJS/article/view/1298>
- Arana, I. O. 2010. como abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Enumeración de microorganismos. (en línea) . *Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología*. Consultado el 5 de feb de 2024 disponible en: <https://acortar.link/60dOey>.
- C. Amadi, J. E. 2020. Process optimization for simultaneous production of cellulase,(en línea) xylanase and. *journal homepage*:consultado el 6 de feb 2024 disponible en: www.cell.com/heliyon.
- Cao Thuy, V. P. 2024. Effect of Fermentation Conditions (en línea) Dilution Ratio, Medium pH,. *Journal of Food Processing and Preservation*. Consultado el 6 de feb 2024 disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jfpp/2024/8841207/>.

Caridad Suárez-Machín*, N. A.-C.-R. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol (en línea) *Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*., 20-28. Consultado el 6 de feb de 2024 disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

Carolina Peña, R. A. 2008. EVALUATION OF ETHANOL PRODUCTION USING RECOMBINANT STRAINS OF (en línea) *Saccharomyces cerevisiae* FROM SUGAR CANE MOLASSES . *Investigaciones Biológicas-CIB, investigador Unidad Biotecnología Vegetal*, 154-161. Consultado el 6 de feb de 2024 disponible en: <https://acortar.link/ip5OzF>

Corona, C. P. 2016. Metabolic responses to stress .(en línea) by yeasts of industrial importance *Investigación y Ciencia*, 86-91. consultado el 6 de feb de 2024 disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/674/67446178012/html/>.

Flávia da Silva Fernandes, É. S. 2022. *Current Ethanol Production Requirements for the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. (en línea) consultado el 8 de feb 2024 diponible en:<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2022/7878830/>.

Gómez-Luna, L. O.-D.-C. 2021. Efecto del pH sobre el crecimiento y viabilidad celular de una cepa local de *Chlorella vulgaris* Beijerinck. (en línea) *Tecnología Química*. Consultado el 8 de feb de 2024 disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852021000200252&lng=es&tlng=es.

GUTIÉRREZ, J. D. 2024. EFECTO DEL FURFURAL Y EL ÁCIDO ACÉTICO EN LA FERMENTACIÓN Y BIOENERGÉTICA DE *Scheffersomyces stipitis* Y *Saccharomyces cerevisiae*.(en línea) consultado el 8 de feb de 2024, disponible en:

<https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/10400>

J. S., Hijri, M., & Khadam, A. A. 2023. Determination the Optimum Conditions for β -glucan Production Extracted from *Saccharomyces cerevisiae*.(en linea) *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 2521-3520. Disponible en <https://mjs.uomustansiriyah.edu.iq/index.php/MJS/article/view/1298>

Longtine, M. S. 2018 *Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae* (en linea) . England.consultado el 15 Mar del 2024 disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9717241/>

Mengana-Trujillo, A. M.-C.-D.-R. 2022. Selección de una técnica analítica para la determinación de la concentración de etanol. (en linea) *Tecnología Química.*, 03-520. Consultado el 15 de Mar de 2024 , disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852022000300503&lng=pt&tlng=.

Minerva, J. M. 2022. Método a bajo costo para la cuantificación del grado alcohólico.(en linea) *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*.consultado el 15 de Mar del 2024 disponible en:https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i1.1693

Orozco, Y. A. 2023. *Evaluación fisicoquímica y cinética de producción de biomasa de dos tipos de* . Ecuador: Ambato.(en linea) consultado el 15 de Mar del 2024 diponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/37923>

P. Krishna Reddy, M. V. 2021. Optimum parameters for production of ethanol from synthetic molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Consultado el 25 de mar de 2024 disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785320351907>

Ruiz, G. C. 2020. Trk1 affects proper functioning of several physiological processes in *Candida glabrata*. (en línea) *BIOCIENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS*, 1-138. Consultado el 25 de Mar del 2024 disponible en: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf.

Serna, C. P., Gil, C. C., & PeláezJaramillo, C. A. 2011. EVALUATION OF ETHANOL PRODUCTION FROM TWO RECOMBINANT AND A COMMERCIAL STRAINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FUNGI: ASCOMYCOTA) IN SUGAR-CANE MOLASSES AND REJECTED-BANANA JUICE FROM URABÁ, COLOMBIA. (en línea) 183-192. consultado el 30 mar de 2024 http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-35842011000200004&script=sci_arttext.

Sikorski, R. S. 2016. *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*.(en línea) Genetics. consultado el 30 mar de 2024 disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2659436/>

Siti Azhara, R. A. 2017. *Yeasts in sustainable bioethanol production: A review*. (en línea) journal homepage: consultado el 30 mar de 2024 disponible en: www.elsevier.com/locate/bbre

Spellman, P. T. 2015. *Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization*.(en línea) *Molecular biology of the cell*, consultado 10 de abril de 2024 disponible en: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.9.12.3273>.

Taubas, C. C. 2023. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* de la cerveza a la biología de sistemas .(en línea) *Bitacoradigital*, 1-9.consultado el 10 de abril del 2024 disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/24262>

Téllez-Mora, P. P.-L.-V.-G. 2012. Optimization of fermentation process for tequila production using response surface methodology (RSM). (en línea) *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 163-176. consultado el 15 de abril del 2024 disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1665-27382012000100014&lng=en

Teresa Zamora-Hernández, A. P.-F.-T.-F.-C. 2014. Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. (en línea) *Educ. quím*, 122-127. consultado el 15 de abril del 2024 disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X14705348>

V. L. Belini, G. C. 2017. YEAST FERMENTATION OF SUGARCANE FOR .(en línea) *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 11. consultado el 20 de abril del 2024 disponible en: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/qHvsjgL5YnczCjH7V6WxqyR/>

Waldir Escalante, M. R. 2014. EFECTO DE LA AIREACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁILES POR CULTIVO MIXTO DE *Brettanomyces intermedius* Y *Saccharomyces cerevisiae* DURANTE LA FERMENTACIÓN DE SIDRA. P (en línea) *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 5-14. consultado el 25 de abril del 2024 disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2014000100001

Whasley Ferreira Duarte, M. V. 2011. Effect of Co-Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* on the Quality of the Distilled Sugar Cane Beverage Cachaca.(en línea) *Journal of Food Science*.

consultado el 25 de abril del 2024 disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02412.x>

ANEXO

Protocolo para Preparar Tampón de Citrato pH 5.5 y Concentración 0.1M

Materiales:

- Ácido cítrico
- Citrato de sodio
- Balanza analítica
- Matraz aforado de 50 mL
- Agua destilada
- Probeta o pipeta graduada
- Espátula o varilla de vidrio
- pHmetro

Procedimiento:

1. Cálculo de Moles de Ácido Cítrico ($C_6H_8O_7$):

- Dado que se necesitan 0.0385 moles de ácido cítrico
- Peso molecular del ácido cítrico = 192.13 g/mol
- Moles de ácido cítrico = 0.0385 moles
- Peso en gramos de ácido cítrico = 0.0385 moles * 192.13 g/mol = 7.406 g
- Medir y transferir 7.406 g de ácido cítrico al matraz aforado.

2. Cálculo de Moles de Citrato de Sodio ($C_6H_5Na_3O_7$)

- Dado que se necesitan 0.0615 moles de citrato de sodio:
- Peso molecular del citrato de sodio = 258.07 g/mol
- Moles de citrato de sodio = 0.0615 moles
- Peso en gramos de citrato de sodio = 0.0615 moles * 258.07 g/mol = 11.655 g
- Medir y agregar 11.655 g de citrato de sodio al matraz aforado.

3. Preparación de la Solución:

- Llenar el matraz aforado hasta la marca de los 50 mL con agua destilada.
- Agitar suavemente para mezclar los componentes.

4. Ajuste de pH Utilizando la Fórmula Henderson-Hasselbalch:

- La fórmula es: $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$
- En este caso, para un tampón de citrato, $[A^-]$ sería el citrato y $[HA]$ sería el ácido cítrico.
- Con pKa del ácido cítrico aproximadamente 4.7, se determinará la relación de 0.63 entre citrato y ácido cítrico para pH 5.5.