

**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**

**TESIS**



**CATACAMAS, OLANCHO**

**HONDURAS, CA.**

**DICIEMBRE, 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

**TESIS**

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO  
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

**INGENIERA EN TECNOLOGÍA ALIMENTARIA.**

**CATACAMAS, OLANCHO**

**HONDURAS, CA.**

**DICIEMBRE, 2024**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la fuerza, la sabiduría y la perseverancia para seguir adelante en este camino. Sin su guía, este logro no hubiera sido posible.

A mi pilar fundamental, mis padres: Ovidio Sánchez y Benilda Rodríguez, por su amor incondicional, su sacrificio y por enseñarme que los sueños se alcanzan con esfuerzo y dedicación. A mis hermanas: Mirna Sánchez, Karen Sánchez, Tania Sánchez y hermano Merlyn Sánchez; por su compañía, apoyo y por ser una fuente constante de inspiración, también a mis dos pequeños sobrinos: Merlyn Ovidio Sánchez y Dafne Yamileth Aguilar. Los amo mucho.

Y a mí misma, por no rendirme, por cada día de esfuerzo, cada momento de duda superado y por creer en mis capacidades para alcanzar este sueño.

## AGRADECIMIENTO

Al concluir esta desafiante etapa de mi vida, quiero expresar mi más sincero agradecimiento en primer lugar a Dios por sostenerme siempre de su mano, y nunca dejarme sola.

- A mis padres, quienes son mi mayor inspiración y ejemplo de vida, gracias por enseñarme a nunca rendirme y a siempre buscar el lado positivo en cada situación.
- A mis hermanas, mi hermano y mis cuñados, les agradezco por estar siempre al pendiente de mí, brindándome su apoyo y amor incondicional.
- A Owen Salgado, por su compañía, motivación y apoyo durante todo este proceso.
- A mi asesor principal, M.Sc. Francisco Sánchez, le expreso mi gratitud por su tiempo, dedicación y compromiso, que permitieron que este trabajo alcanzara los más altos estándares posibles.
- A mis asesores auxiliares, M.Sc. Wilson Martínez y Dra. Nellys Herrera, les agradezco cada sugerencia, las cuales fueron fundamentales para mejorar y perfeccionar este trabajo.
- A la Ing. Loren Macías, gracias por su generosidad al facilitarme instrumentos necesarios para la realización de este proyecto.
- Finalmente, a la Universidad Nacional de Agricultura, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios universitarios.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	vii
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	2
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
3.1. Generalidades de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
3.2. Requerimientos nutricionales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
3.2.1. Principales nutrientes y las formas más comunes de satisfacerlas .....	4
3.2.2. Fosfato diamónico (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (DAP) en la producción de etanol mediante <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
3.3. Fermentación alcohólica .....	7
3.3.1. Ruta metabólica .....	8
3.3.2. Factores a controlar durante la fermentación .....	9
<b>IV. METODOLOGÍA</b> .....	11
4.1. Descripción y localización del área de la investigación .....	11
4.2. Materiales y equipos .....	11
4.3. Metodología experimental .....	13
4.3.1. Variables independientes .....	13

4.3.2.	Variables dependientes .....	13
4.3.3.	Diseño y análisis estadístico .....	14
4.3.4.	Tratamientos.....	14
4.3.5.	Medio de cultivo.....	15
4.3.6.	Activación de levadura .....	16
4.3.7.	Preparación del medio de cultivo .....	16
4.3.8.	Condiciones de operación.....	17
4.3.9.	Muestreo .....	17
4.4.	Metodología analítica .....	18
4.4.1.	Determinación de la concentración de biomasa por el método espectrofotométrico .....	18
4.4.2.	Determinación de etanol.....	19
4.4.3.	Modelo de producción de metabolitos Luedeking-Piret.....	20
4.4.4.	Determinación de viabilidad celular.....	21
4.4.5.	Medición de pH .....	22
4.4.6.	Acidez titulable.....	22
4.4.7.	Medición de grados Brix .....	23
4.4.8.	Cálculo de parámetros cinéticos.....	23
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>38</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>51</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<i>Tabla 1</i> Tratamientos y concentraciones de fosfato diatómico en base a literatura.....	15
<i>Tabla 2</i> Compuestos y concentraciones con los que se realizó el medio de cultivo. ..	15
<i>Tabla 3</i> Parámetros cinéticos calculados con cada una de las condiciones evaluadas.	36
<i>Tabla 4</i> Concentración de volúmenes para la preparación de diferentes concentraciones de etanol .....	60

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Ruta metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (glicolisis) .....	9
<b>Figura 2</b> Inoculación de levaduras a los diferentes matraces .....	17
<b>Figura 3</b> Representación de la cámara de recuento de Neubauer y sus dimensiones .....	21
<b>Figura 4</b> Producción de biomasa ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) en relación con los °Brix durante el tiempo de fermentación. ....	27
<b>Figura 5</b> Porcentaje de etanol según al tiempo de fermentación. ....	28
<b>Figura 6</b> Modelo de Luedeking-Piret utilizado para describir la producción de etanol en el testigo y las condiciones evaluadas. ....	29
<b>Figura 7</b> Comparación del porcentaje de viabilidad celular en función del porcentaje de etanol.31	
<b>Figura 8</b> Influencia del pH en relación al tiempo de fermentación .....	32
<b>Figura 9</b> % de acidez titulable bajo diferentes concentraciones de DAP en relación al tiempo de fermentación. ....	34
<b>Figura 10</b> Levadura Activada.....	52
<b>Figura 11</b> Curva de calibrado de biomasa.....	58
<b>Figura 12</b> Solución oxidativa con diferentes porcentajes de etanol.....	61
<b>Figura 13</b> Curva de calibración para concentraciones bajas de etanol (0.5-4 %).....	62
<b>Figura 14</b> Células viables y no viables en uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer.....	65

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<i>Anexos 1</i> Activación de levadura .....	51
<i>Anexos 2</i> Preparación de solución con tampón (buffer) de citrato a pH 5.70 y 0.1 M. .	52
<i>Anexos 3</i> Determinación de biomasa por espectrofotometría y peso seco.....	55
<i>Anexos 4</i> Protocolo para determinación de etanol .....	58
<i>Anexos 5</i> Preparación de Cloruro de Sodio (NaCl).....	63
<i>Anexos 6</i> Protocolo para determinación de viabilidad celular. ....	64

**Sánchez, Rodríguez, R.N. 2024.** Evaluación de fosfato diamónico en la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol. Tesis, Ing. Tecnología Alimentaria. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras. 65 pág.

## RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fosfato diamónico (DAP), sobre la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, para la producción de etanol. La fermentación alcohólica se realizó de manera aeróbica durante 66 horas. Se evaluaron cuatro tratamientos: testigo, sin adición de DAP y tres concentraciones de DAP: T1 (0.5 g/L), T2 (1 g/L) y T3 (2 g/L). Se cuantificaron °Brix, biomasa, % de etanol, viabilidad celular y parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), productividad volumétrica ( $Q_p$ ) y rendimiento ( $Y_{p/s}$ )). Los cultivos se realizaron por duplicado para cada tratamiento, en un medio definido a escala de matraces. La temperatura fue 30 °C, con pH 5.70 y 15 °Brix iniciales. A medida que se aumentó la concentración de DAP a 2 g/L (T3), se obtuvo un menor valor en los °Brix finales (3.4%). Asimismo, el T3 (2 g/L) alcanzó los mayores valores en biomasa ( $7.5 \text{ g/L}^{-1}$ ). Con el tratamiento T2 (1 g/L) y T3 (2 g/L) se obtuvieron resultados similares en la producción de etanol (11.5 %). El parámetro de  $Y_{p/s}$ , no mostró diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas y el testigo. De igual forma, en los parámetros de la  $\mu$  y  $Q_p$ , no se observaron diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas, mientras que el testigo presentó resultados significativamente diferentes. El incremento de fosfato diamónico, como fuente nitrógeno en el medio de cultivo, mostró tener un efecto significativo en la producción de biomasa.

**Palabras claves:** Rendimiento, productividad volumétrica, fermentación alcohólica, biomasa, medio definido y sacarosa.

## I. INTRODUCCION

La fermentación de azúcares por levaduras para producir etanol es uno de los procesos más importantes a nivel mundial. El etanol es el principal producto de la fermentación tanto en volumen como en relevancia económica (Walker, GM; Walker, R. 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, C.; et al., 2015; Sablayrolles, JM; Mouret, JR., 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, C.; 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, C; et al., 2013; Arias G, M., et al., 2007).

En este contexto, el objetivo de esta investigación se centró 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. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. 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  $\mu$ m 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 que, 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).

### **3.2. 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.

#### **3.2.1. 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).

### **3.2.2. Fosfato diamónico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (DAP) 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

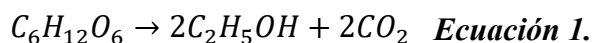
aumentando el volumen de licor obtenido de sólo 13 litros en el mosto puro hasta 25 litros. El tenor en alcohol se elevó a 49% con la adición de fosfato independientemente del contenido inicial de azúcar en el mosto.

### **3.3. 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.

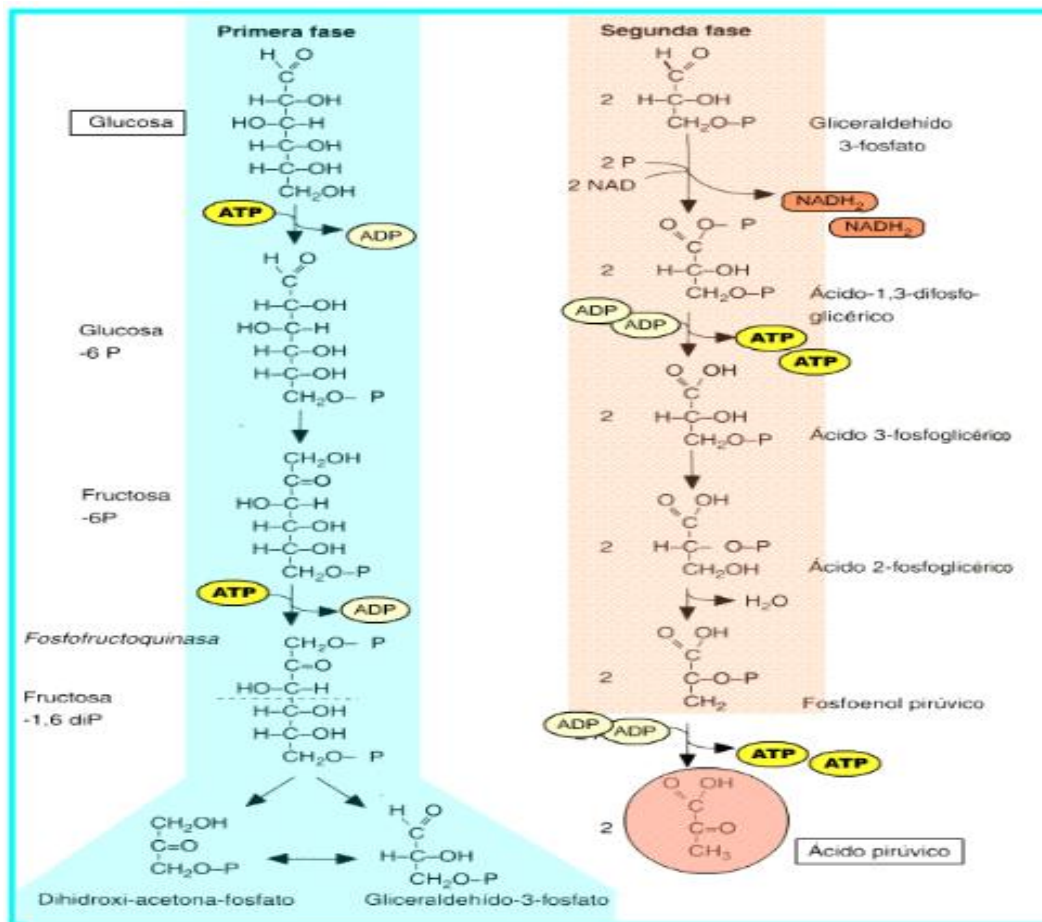
En la ecuación uno se presenta la reacción química que describe la conversión de glucosa en etanol a través del proceso de fermentación. Según esta ecuación, una molécula de glucosa, por vía fermentativa, produce 2 moléculas de etanol y 2 moléculas de dióxido de carbono como productos resultantes.



### 3.3.1. 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  $\text{NADH/NAD}^+$  y  $\text{NADHP/NADP}^+$  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  $\text{NADH}_2$ , 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  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (McKee T. & McKee, 2014).



**Figura 1** Ruta metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (glicolisis)

Fuente: (Gómez, GJ y Nieto, C. 2002).

### 3.3.2. 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)

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1. Descripción y localización del área de la investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de análisis 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

#### 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)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Fosfato diamónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- Fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)
- Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)
- Citrato de sodio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)
- Azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S)
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)

## Equipos

- Refractómetro digital (Marca BOECO)
- Refractómetro analógico (0-95% °Brix)
- Incubadora de agitación termostática (Marca BIOBASE, modelo BJPX-200B).
- Centrifuga (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)
- Horno
- Espectrofotómetro (Thermo SCIENTIFIC)

## **Instrumentos**

- Beaker
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Pinzas
- Perilla
- Pipeta
- Probeta de 250 ml
- Mechero
- Vaso de precipitación
- Tubos de centrifugación
- Tubos de ensayo
- Cámara de Neubauer

### **4.3. Metodología experimental**

#### **4.3.1. 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)

#### **4.3.2. Variables dependientes**

- Concentración de etanol

- Concentración de biomasa

#### **4.3.3. Diseño y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado de un factor con tres niveles. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Los resultados experimentales fueron 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.

#### **4.3.4. Tratamientos**

En la tabla 1, se muestran los tratamientos con las formulaciones experimentales que se implementaron para el desarrollo del trabajo de investigación. En cuanto a la fuente de nitrógeno que se utilizó para poder llevar a cabo esta investigación, se optó por usar fosfato diamónico debido al costo y la disponibilidad del compuesto. Estos valores fueron seleccionados en base a los resultados que mejor rendimiento se ha obtenido en la fermentación alcohólica, en investigaciones realizadas por Godínez, (2012); Robles, (2021) y Yefres; et al, (2003). Cabe mencionar que se utilizó un tratamiento testigo que permitió comparar los resultados con los diferentes tratamientos.

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

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

#### 4.3.5. Medio de cultivo

En la Tabla 2, se presentan las concentraciones de cada componente necesario con el que se realizaron los medios de cultivo. La adición de fosfato diamónico (DAP), varió debido a que este nutriente fue la variable de estudio en la investigación. Cabe mencionar que en el testigo únicamente se adicionó sacarosa.

**Tabla 2** Compuestos y concentraciones con los que se realizó el medio de cultivo.

Tratamientos	Componentes y concentraciones			
	Sulfato de magnesio	°Brix	Fosfato diamónico (DAP)	Fosfato de potasio (K <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P)
Testigo		15		
T1	0.1 g/L	15	0.5 g/L	0.5 g/L
T2	0.1 g/L	15	1 g/L	0.5 g/L
T3	0.1 g/L	15	2 g/L	0.5 g/L

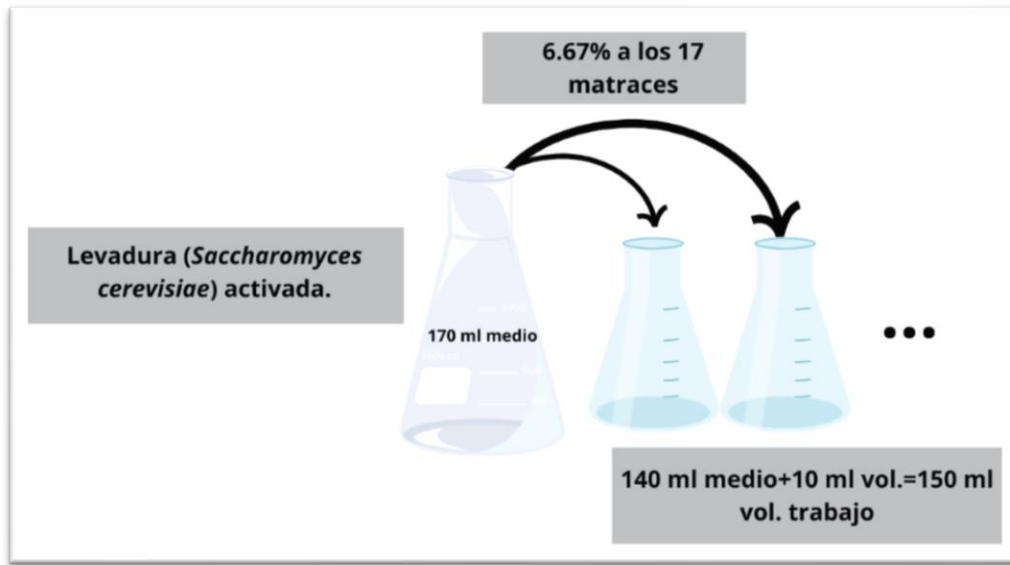
#### **4.3.6. Activación de levadura**

Se activó la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* en forma liofilizada. Inicialmente, se inoculó 2 g/L (5.1 g necesarios para 2,550 mL del medio) de levadura en 170 ml de medio (volumen necesario para inocular 10 mL a 17 matraces), manteniéndose a una temperatura constante de 30 °C durante 15 minutos. En el anexo 1 se detalla el procedimiento.

#### **4.3.7. Preparación del medio de cultivo**

Se preparó la solución con un tampón (buffer) de citrato, con todo el volumen necesario para la realización de cada tratamiento, hasta alcanzar un pH de 5.7(ver anexo 2). Posteriormente, se pesó el fosfato diamónico, el sulfato de magnesio y el azúcar común (sacarosa), según lo indicado en la tabla 2. Luego de ello, se procedió a diluir el azúcar y las sales en solución concentrada, para posteriormente proceder a agregar la solución concentrada (azúcar y sales) con todo el volumen de la solución buffer previamente preparada, alcanzándose los 15 °Brix. Antes de la esterilización se realizaron los análisis correspondientes, como ser: medición de grados Brix y pH.

Finalmente, se midieron 140 ml de la solución preparada y se agregaron a cada matraz (17 matraces), cerrándose con un tapón y cubriéndose con papel aluminio para proceder a esterilizarlos en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos; una vez finalizada la esterilización, se dejaron enfriar y se llevaron a la incubadora termostática por dos horas, para poder controlar la temperatura (30 °C). Tras completar el periodo, se agregaron 10 mL de la levadura activada, lo que corresponde aproximadamente al 6.67 % del volumen total (Figura 2). Finalmente, los matraces se volvieron a colocar en la incubadora para iniciar con el proceso de fermentación.



**Figura 2** Inoculación de levaduras a los diferentes matraces

#### 4.3.8. Condiciones de operación

La fermentación alcohólica se llevó a cabo de forma aeróbica a escala de matraces, realizando cultivos por lote en una incubadora con agitación orbital. La temperatura fue de 30 °C (Holubářová; et al, 2000, citado por Vital y Larralde, 2016), con un pH inicial de 5.7 (Reyes, 2023), y 15 °Brix. La fermentación se llevó a cabo durante 66 horas, con una agitación de 150 rpm (Ruíz, C; et al, 2023), utilizándose matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de trabajo de 150 mL cada uno.

#### 4.3.9. Muestreo

Durante el proceso de fermentación, las muestras se tomaron cada 6 horas, cada medición se realizó a la hora exacta designada, para mantener la precisión en el intervalo de muestreo. Se tuvieron 17 matraces, y durante cada medición, comenzando desde el tiempo cero, hasta

las 66 horas, se sacó un matraz el cual se procesó para realizar las mediciones analíticas correspondientes.

#### **4.4. Metodología analítica**

##### **4.4.1. Determinación de la concentración de biomasa por el método espectrofotométrico**

Para determinar la concentración de biomasa se empleó la metodología utilizada por Arredondo-Vega et al (2007), citada por Albarracín-Torres, A. (2020). Se utilizó un espectrofotómetro, que mide en unidades de absorbancia. Paralelamente, se realizaron mediciones de peso seco para establecer una relación lineal y obtener una curva de calibración (ver anexo 3).

Las muestras de biomasa se diluyeron con factores de dilución diferentes, dependiendo las horas transcurridas de fermentación. Cada medición se realizó por duplicado en tubos de ensayo que contenían 4 ml de la dilución. Las muestras en los tubos se homogenizaron y la absorbancia se midió a 600 nm, usando como blanco agua destilada,

La determinación de concentración de biomasa se determinó mediante la ecuación 2, que hace referencia a la ecuación de la curva de calibrado, para obtener la concentración de biomasa, se despeja para la variable X.

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde:

y: Absorbancia

m: pendiente

x: Concentración de biomasa (g/L)

b: Intercepto

#### 4.4.2. Determinación de etanol

La determinación de etanol, se llevó a cabo por el método de colorimetría con dicromato de potasio (Bennett 1971, citado por Gonzáles 2013). Para la determinación de etanol fue necesario la preparación de una solución oxidante (dicromato de potasio y ácido sulfúrico) y la medición de diferentes porcentajes de etanol, midiéndose en el espectrofotómetro la absorbancia de cada muestra y con los datos obtenidos, se trazó una curva de calibración (ver anexo 4).

Las muestras se midieron por duplicado, en tubos de ensayo se adicionaron 3 ml de la solución de dicromato de potasio y luego se agregaron 300  $\mu$ L de las muestras de etanol, sobrenadante previamente removido con una solución de Cloruro de sodio al 0.1 M (ver anexo 5). Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3600 rpm durante 5 minutos, y se taparon herméticamente con papel parafilm, dejándose reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 590 nm en el espectrofotómetro, utilizando la reacción de la solución oxidativa como blanco. Con las absorbancias dadas, se pudo determinar la concentración de etanol en cada una de las muestras analizadas.

La determinación de concentración de etanol se determinó mediante la ecuación 3, que hace referencia a la curva de calibrado de etanol; por lo cual, para determinar la concentración de etanol, se despeja para la variable X.

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde:

y: Absorbancia  
m: pendiente  
x: % de etanol  
b: Intercepto

#### 4.4.3. Modelo de producción de metabolitos Luedeking-Piret

Existen diversos tipos de metabolitos y estos son producidos normalmente por microorganismos, estos metabolitos de interés de acuerdo a la forma en la que se producen, se pueden clasificar en metabolitos primarios, secundarios y terciarios. Para modelar la producción de etanol (metabolito primario), se aplicó el Modelo de Luedeking-Piret, que relaciona la velocidad de producción del metabolito con el crecimiento celular (Gómez Bravo, J. L. et al 2023). Este modelo se expresa mediante la ecuación 4, que hace referencia al modelo de Luedeking-Piret simplificado en línea recta.

$$qp = \frac{\Delta p}{\Delta t} \left( \frac{1}{x_0} \right) = \alpha \cdot \mu + \beta \text{ Ecuación 4.}$$

Para poder determinar el Modelo de Luedeking-Piret, y ver si lo que se produjo en la fermentación alcohólica es un metabolito primario, se considera lo siguiente:

1. Calcular la velocidad específica de crecimiento, mediante la ecuación 5, (únicamente para el Modelo de Luedeking-Piret).
2. Calcular la velocidad específica de producción del metabolito con la ecuación 6.
3. Se grafica qp vs  $\mu$
4. Se obtiene la línea de tendencia de qp vs  $\mu$

La pendiente de la recta es  $\alpha$  y la ordenada al origen es  $\beta$

Se trata de un metabolito primario cuando la constante  $\alpha$  es positiva y la constante  $\beta$  es pequeña (cercana a cero) comparada a  $\alpha$ ; ya que se produce muy poco metabolito si no

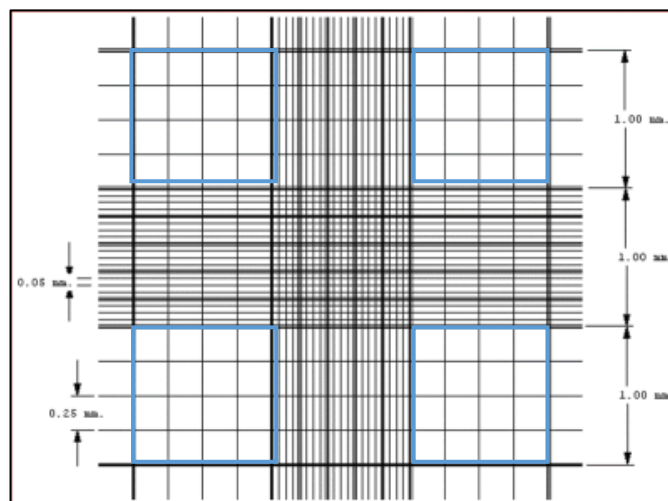
hay crecimiento y también porque el coeficiente de correlación  $r^2$  debe ser cercano a la unidad, indicando una línea recta.

$$\mu = \frac{\text{Ln} \left( \frac{x_f}{x_0} \right)}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 5.}$$

$$qp = \frac{p_f - p_0}{\Delta t \cdot x_0} \quad \text{Ecuación 6.}$$

#### 4.4.4. Determinación de viabilidad celular

Se determinó la viabilidad celular utilizando la cámara de Neubauer mejorada, empleando cuatro cuadrantes de los extremos para el conteo (resaltados con azul), tal como se muestra en la figura 3. Las muestras celulares fueron tratadas con azul de metileno y depositadas en la cámara. Se realizó un análisis microscópico con el lente a 40X, contando células viables (no se tiñen) y no viables (se tiñen). En el Anexo 6, se encuentra más detallado el procedimiento.



**Figura 3** Representación de la cámara de recuento de Neubauer y sus dimensiones

Este método permitió evaluar la viabilidad celular de las levaduras durante la fermentación. El porcentaje de viabilidad celular (% V) fue determinado mediante la ecuación 7:

$$\%V = \frac{T-C}{T} \times 100 \quad \text{Ecuación 7.}$$

**Dónde:**

T: Total de células contadas

C: Células muertas o teñidas de azul oscuro

#### **4.4.5. Medición de pH**

Para la medición del pH se tomaron 30 ml de muestra de cada matraz, esta cantidad se transfirió a un beaker y luego de ello, se introdujeron los electrodos del potenciómetro en la muestra, asegurándose que los electrodos no tuvieran contacto con el fondo ni las paredes del recipiente.

#### **4.4.6. Acidez titulable**

Para la medición de acidez titulable, se tomaron 15 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 8, se determinó la acidez titulable, la cual está expresada en porcentaje de ácido acético.

$$\text{Acidez titulable} = \% \text{ Ácido acético} = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * M_{eq}}{V_{muestra}} \quad \text{Ecuación 8.}$$

#### 4.4.7. Medición de grados Brix

Los °Brix se determinaron haciendo uso de un refractómetro digital, se colocó aproximadamente 200 µL de la muestra en el prisma (medidor de muestra), y se le dio leer, para poder anotar el índice de refracción mostrado, esta medición se realizó por triplicado.

#### 4.4.8. Cálculo de parámetros cinéticos

A continuación, se muestra cada uno de los cálculos de parámetros cinéticos que se emplearon con los datos que se obtuvieron del trabajo de investigación:

##### 4.4.8.1. Velocidad específica de crecimiento

En el crecimiento microbiano el modelo logístico describe los cambios en la cantidad de células que se da desde la concentración inicial de biomasa hasta la concentración máxima del mismo. El modelo describe la relación de la biomasa ( $X$ ) con la concentración inicial de células ( $X_0$ ), la concentración máxima de células ( $X_{max}$ ) y la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) en momentos específicos ( $t$ ).

La ecuación del modelo logístico integrada (Ecuación 9) se utilizó para modelar el proceso de fermentación y determinar la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) ajustando los datos experimentales correspondientes a las condiciones de operación estudiadas. Este ajuste se realizó empleando el solver en Excel.

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu * t)}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - \exp(\mu * t))} \quad \text{Ecuación 9.}$$

##### 4.4.8.2. Rendimiento de biomasa

Para calcular el rendimiento de biomasa  $Y_{x/s}$  (g de biomasa /g de nutriente), se tomó como referencia la ecuación 10, descrita por Varilla, (2018):

Este parámetro indica la eficiencia con la que el microorganismo convierte el nutriente en biomasa, permitiendo cuantificar la cantidad de biomasa generada a partir del nutriente consumido durante la fermentación.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Ecuación 10.}$$

Dónde:

$X_f$ = Concentración final de biomasa ( $\text{gL}^{-1}$ ). Considerada a las 66 horas.

$X_i$ = Concentración inicial de biomasa ( $\text{gL}^{-1}$ ). Considerada a partir del tiempo cero.

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

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

#### 4.4.8.3. Rendimiento de producto

Según lo descrito por Varilla, A. (2018), la ecuación 11, determina el rendimiento de producto  $Y_{p/s}$  (g de producto / g de nutriente):

Este índice revela la eficacia con la que el microorganismo transforma el nutriente en producto final durante el proceso de fermentación, proporcionando información crucial sobre la conversión del nutriente en el producto deseado.

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Ecuación 11.}$$

Dónde:

$P_f$ : Concentración final de producto ( $\text{gL}^{-1}$ ). Considerada a las 66 horas.

$P_i$ : Concentración inicial de producto ( $\text{gL}^{-1}$ ). Considerada a partir del tiempo cero.

#### 4.4.8.4. Productividad volumétrica

La productividad volumétrica se determinó por medio de la ecuación 12, ecuación de productividad volumétrica ( $Q_p$ ) (g de producto (etanol) / Litro \* hora). 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.

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{\left(t + \frac{1}{\mu} \ln \frac{x}{x_0}\right)} \quad \text{Ecuación 12.}$$

Dónde:

$Q_p$ : Productividad volumétrica del producto

$t_f$ : 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). Considerada a las 66 horas.

$P_0$ : concentración inicial del producto. Considerada en el tiempo cero.

$X$ : Concentración final de biomasa. Considerada a las 66 horas.

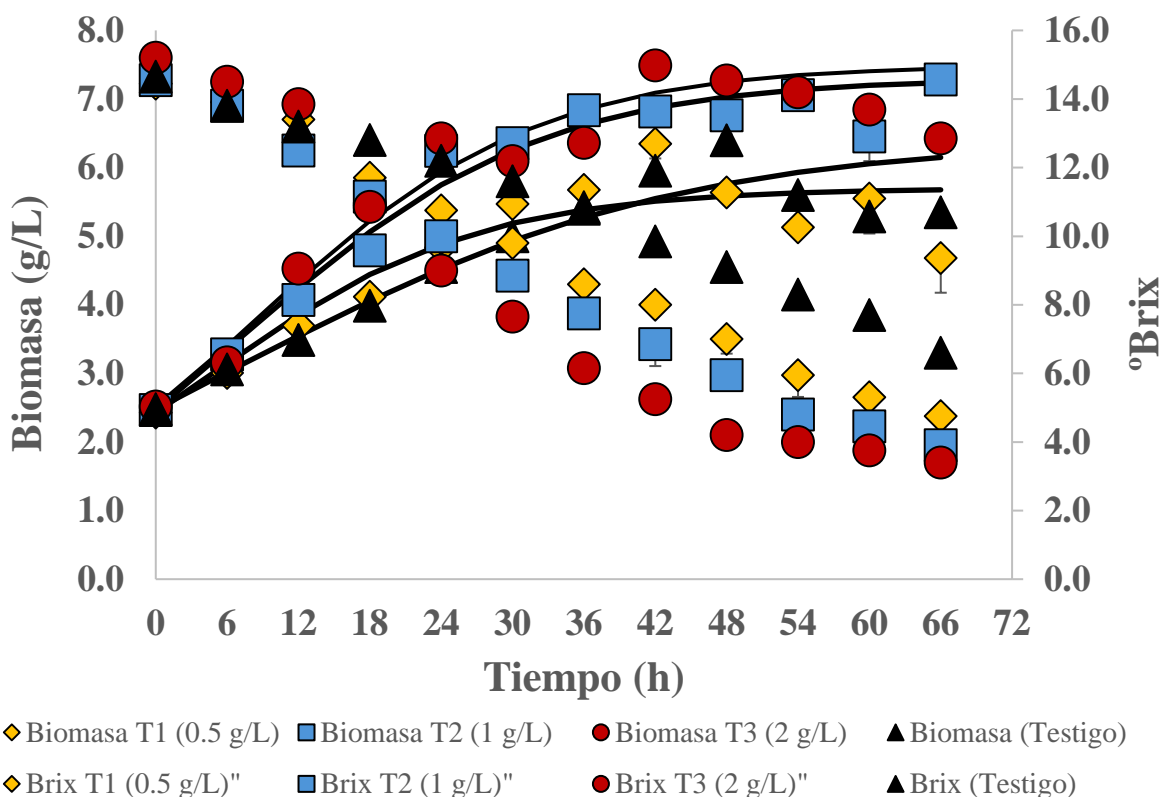
$X_0$ : concentración inicial de biomasa. Considerada en el tiempo cero.

$\mu$ : velocidad de crecimiento

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

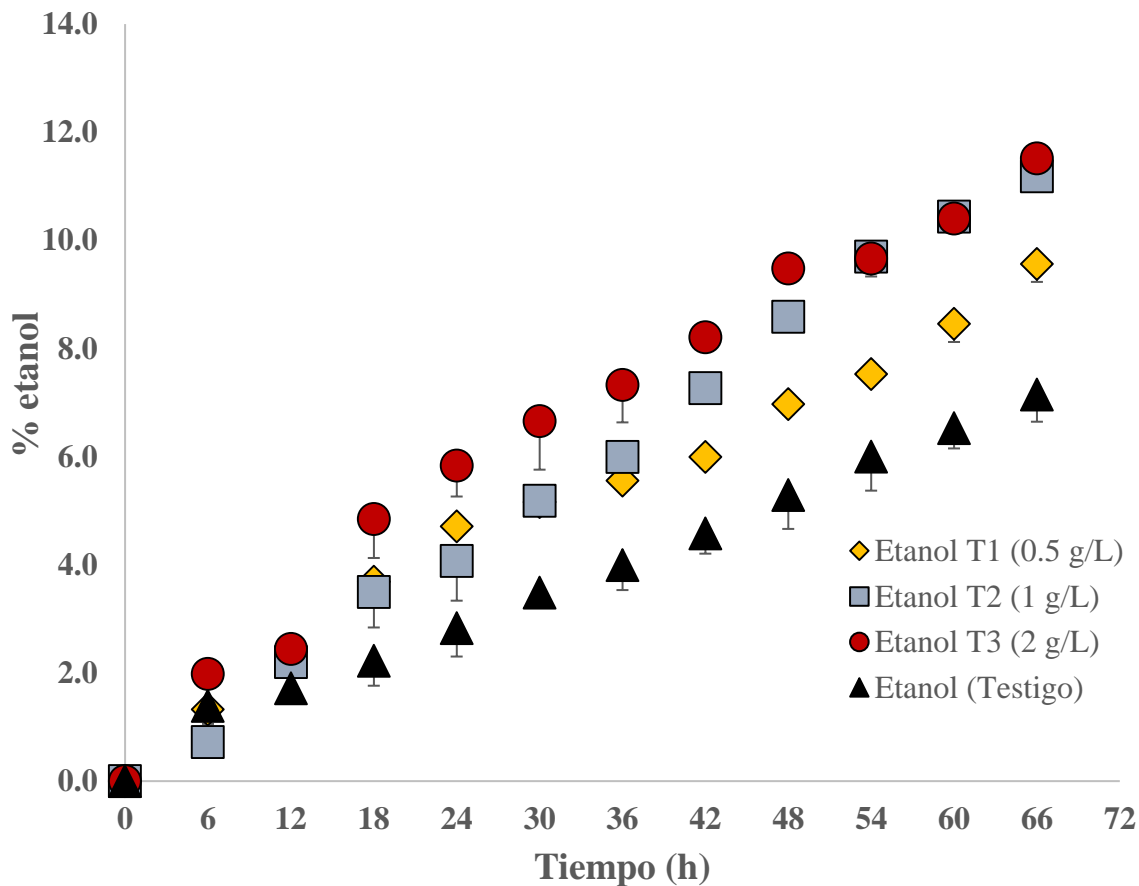
En la figura 4, se presenta el crecimiento de biomasa y el consumo de sacarosa para cada una de las condiciones evaluadas. Los resultados muestran que cuando se usaron 2 g/L de fosfato diamónico se alcanzó un valor de 7.5 g/L de biomasa, siendo este el mayor valor alcanzado en las condiciones evaluadas. Se observó que al incrementar la concentración de fosfato diamónico se incrementa la producción de biomasa. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones evaluadas, el incorporar el fosfato diamónico favorece la producción de biomasa. En otros estudios, se han evidenciado aumentos similares de biomasa, cuando han aumentado la concentración de fosfato diamónico. Por ejemplo, Robles Calderon (2021), reportó una concentración de biomasa de 7.34 g/L, bajo condiciones enriquecidas con fosfato diamónico con 2 g/L (Robles Calderón (2021); Gualtieri et al. (2007) y Blanco et al. (2019)).

En cuanto a los °Brix, el testigo representa las condiciones actuales bajo las cuales se fermenta en la planta de etanol y al finalizar la fermentación, se llega aproximadamente a 5 °Brix cuando solamente se utiliza sacarosa. Los resultados de la incorporación de fosfato diamónico en el medio evidencian que, cuando se agregan 2 g/L de fosfato diamónico, los °Brix descienden hasta un 3.4 %. La eficiencia del consumo de azúcar representa una ventaja económica significativa, ya que optimiza el uso del azúcar durante el proceso de fermentación, reduciendo las pérdidas y mejorando el rendimiento general. Otros estudios han demostrado que el consumo de la fuente de nitrógeno está asociada a una mejor asimilación de la fuente carbono (Badotti, F; Darío, MG; Alves, SL, et al. (2008) y Hawaz, E; Tafesse, M; Tesfaye, A. et al. (2024)).



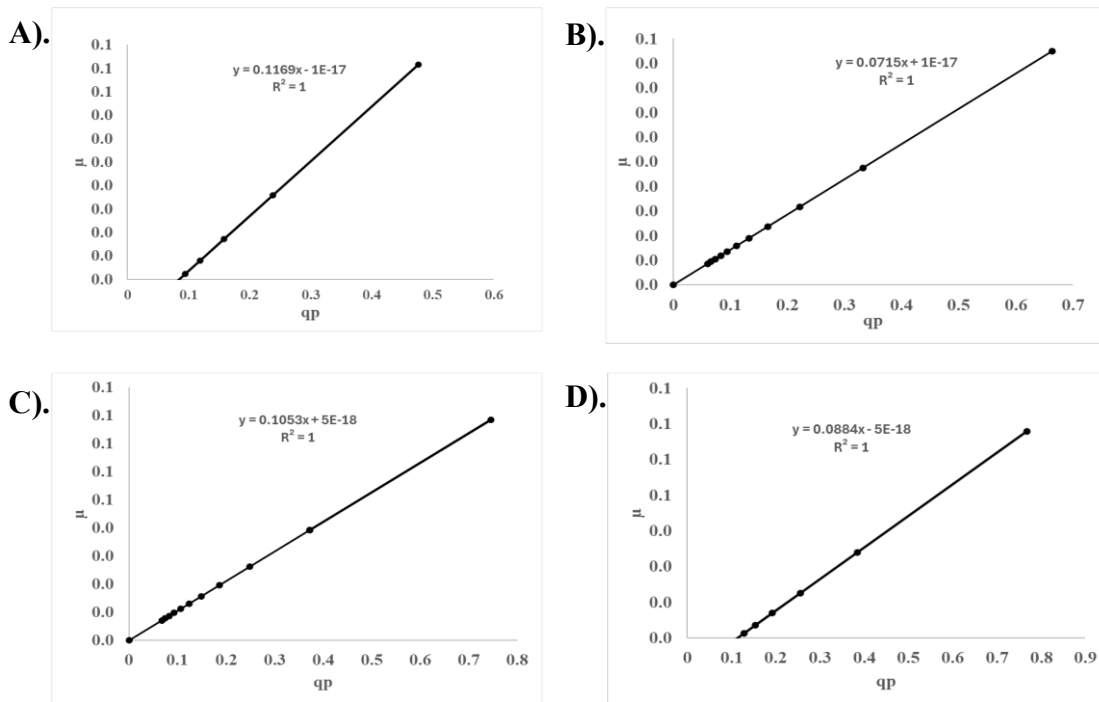
**Figura 4** Producción de biomasa (*Saccharomyces cerevisiae*) en relación con los °Brix durante el tiempo de fermentación.

En la figura 5, se muestra el % de etanol para cada una de las condiciones evaluadas con fosfato diamónico durante las 66 horas de fermentación. Se pudo observar que bajo las condiciones de 1 g/L y 2 g/L de fosfato diamónico, se obtienen concentraciones de etanol muy similares a las 66 horas de fermentación, aproximadamente 11 %. Al comparar los resultados de este trabajo con los reportados por Hernández (2012), quien obtuvo una producción de etanol de 11,69 % a las 24 horas de fermentación, cuando utilizó 5 g/L de fosfato diamónico, se nota una diferencia importante. Esto resalta que, aunque los resultados obtenidos en este trabajo, muestran concentraciones de etanol similares al cabo de 66 horas, el uso de una concentración más alta de fosfato diamónico, como la empleada por Hernández, puede mejorar la velocidad de producción de etanol, obteniendo valores comparables en menor tiempo.



**Figura 5** Porcentaje de etanol según al tiempo de fermentación.

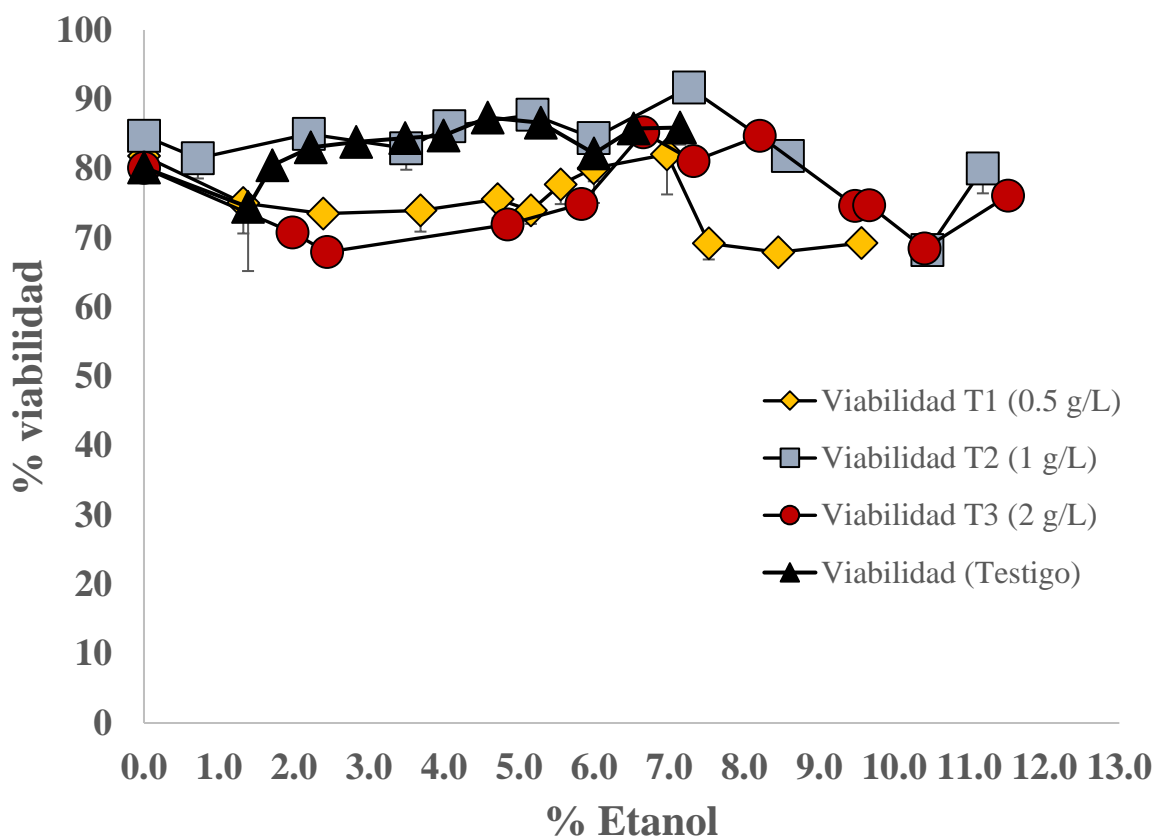
En la figura 6, se presentan los modelos de Luedeking-Piret, utilizados para determinar si la fermentación alcohólica está o no asociada a la producción de metabolitos primarios. La figura 6.A, representa el testigo, la figura 6. B, el T1 (0.5 g/L), la figura 6.C, el T2 (1 g/L) y la figura 6.D, representa el T3 (2 g/L). En todos los casos se muestra una línea recta y un factor de correlación 1, lo que indica que, son un metabolito primario, ya que están directamente asociadas con el crecimiento de la levadura y la producción de etanol.



**Figura 6** Modelo de Luedeking-Piret utilizado para describir la producción de etanol en el testigo y las condiciones evaluadas.

En la figura 7, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en función de las concentraciones de etanol, bajo las condiciones evaluadas de fosfato diamónico. Al inicio de la fermentación, la viabilidad celular de todos los tratamientos comenzó entre 80 y 85 %. Se pudo observar que el testigo y el T2 (1 g/L), fueron los que menos se vieron afectados por el aumento de la concentración de etanol, ya que su viabilidad celular se mantuvo más o menos constante, cercano al 85 %. Asimismo, se observó que, en las tres condiciones evaluadas, la viabilidad celular disminuyó una vez que se alcanzó un 8 % de etanol.

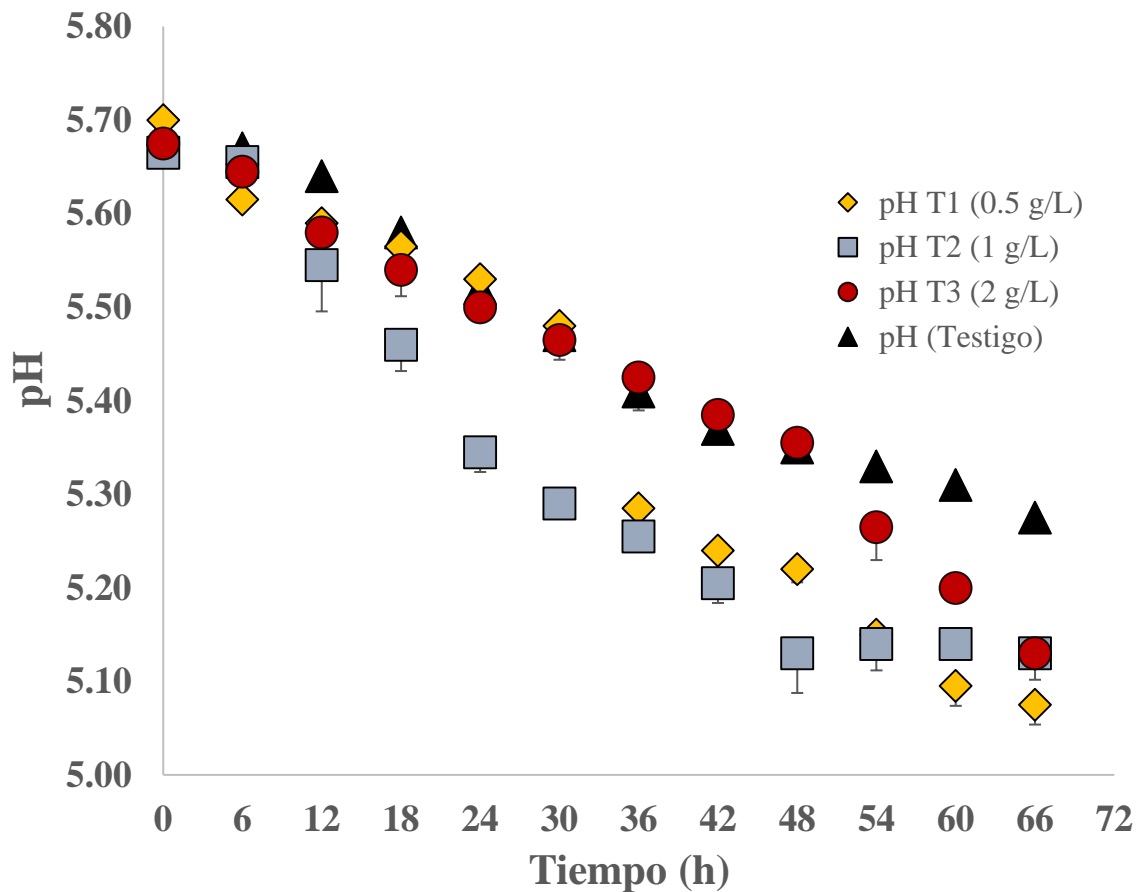
Durante la fermentación alcohólica, las células de levadura enfrentan un entorno estresante por la caída del pH externo y la acumulación de etanol, lo que afecta la viabilidad celular. Estos factores alteran la membrana plasmática y, junto con la falta de nutrientes puede disminuir la viabilidad celular (Salmon, J. M y Ortiz-Julien, A. 2008). Un estudio reportado por Alfenore et al. (2002) mostró que, cuando la concentración de etanol aumentaba de aproximadamente 11 a 12 % v/v, la viabilidad celular disminuyó hasta alcanzar un valor final del 30 %. De manera similar, en este trabajo se observó una disminución en la viabilidad celular, lo que podría atribuirse a las características de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada, la cual está destinada principalmente a la panificación y no a la fermentación alcohólica. Esto podría explicar por qué concentraciones de etanol alrededor del 8 % afectaron el metabolismo celular en este estudio, mientras que en el trabajo de Alfenore et al. la caída en la viabilidad ocurrió a concentraciones más altas, cercanas al 12 %.



**Figura 7** Comparación del porcentaje de viabilidad celular en función del porcentaje de etanol.

En la figura 8, se muestra el pH en relación al tiempo de fermentación, bajo las condiciones evaluadas. Se puede observar que el pH inicial en todas las condiciones fue cercano a 5.7. Después de 12 horas de fermentación, se observó una disminución en el pH para todas las condiciones. Sin embargo, al finalizar la fermentación a las 66 horas todas las condiciones evaluadas tuvieron un pH final cercano a 5.10. Aunque en todas las condiciones se observó una disminución de pH después de las 12 horas de fermentación, los valores finales a las 66 horas todavía estaban dentro del rango de pH permitido para una fermentación adecuada, generalmente entre 4.5 y 6.5 (Reyes 2023).

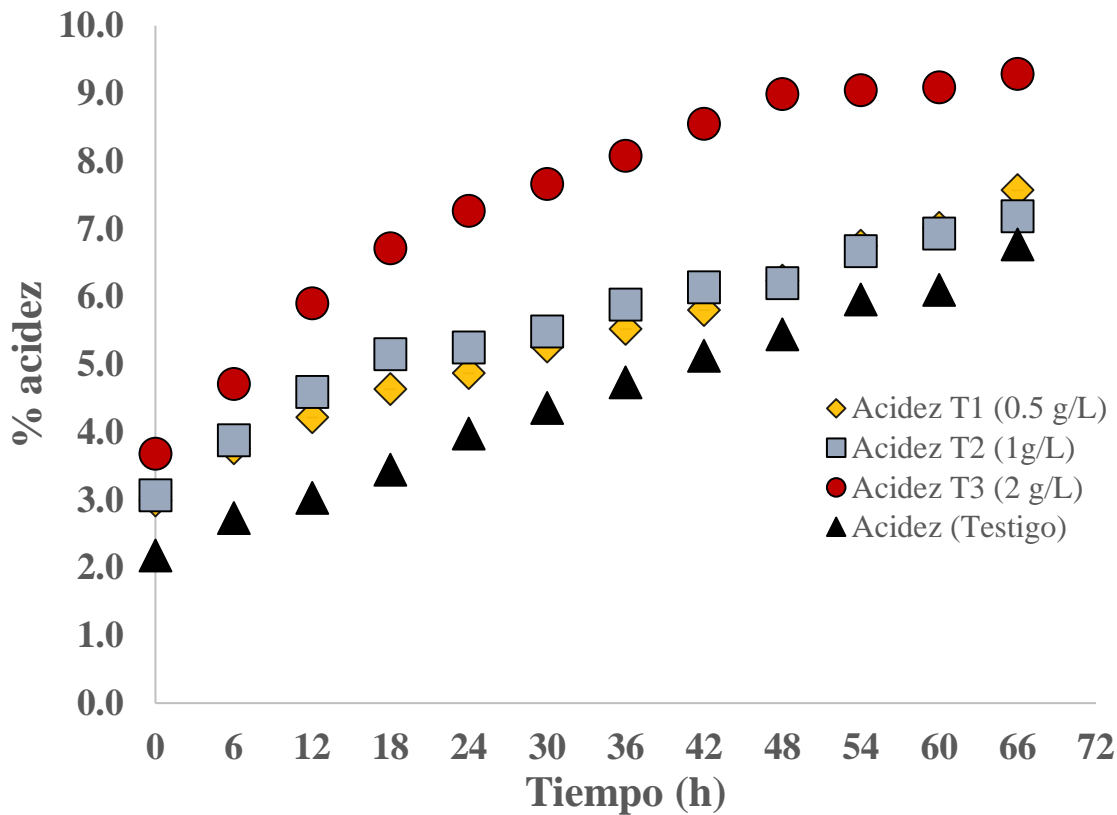
El descenso del pH en las condiciones evaluadas, puede ser explicado porque la disminución del pH durante el proceso se debe a la producción de ácidos, que se forman cuando los nitrógenos de los aminoácidos pierden su carácter anfótero, resultando en una disminución gradual del pH (Aguilar et al. 2015). Asimismo, el fosfato diamónico actúa como un regulador ácido-base, ayudando a ajustar y estabilizar el pH del medio de fermentación, por lo que su adición puede prevenir que el pH se vuelva demasiado ácido o alcalino (Rojas Sariol et al. 2011).



**Figura 8** Influencia del pH en relación al tiempo de fermentación

En la figura 9, se muestra el porcentaje de acidez titulable en las condiciones evaluadas. Se puede apreciar que, en todas las condiciones evaluadas, después de las seis horas de fermentación, se observó un incremento en el porcentaje de acidez, resaltando que el T3 (2g/L), fue el que presentó mayor porcentaje de acidez (9.3 %), al finalizar las 66 horas de fermentación. Este mayor incremento de acidez, coincidió con una de las menores disminuciones en el pH. Comportamiento contrario que obtuvo el testigo, que fue el que produjo menor cantidad de acidez (6.8 %).

El porcentaje de acidez reportado en este trabajo, puede compararse con el estudio realizado por Valencia et al. (2019), aunque su investigación se centra en la producción de vino, ellos consideran que la implementación de fosfato diamónico durante la fermentación, resulta en un aumento significativo de la acidez, lo que indica que la adición de nitrógeno a través del fosfato diamónico, estimula tanto el crecimiento celular como la actividad metabólica de las levaduras. Como consecuencia, se produce una mayor cantidad de compuestos volátiles y ácidos, especialmente cuando hay un exceso de nutrientes que favorecen la producción ácida. En la fermentación alcohólica se producen ácidos orgánicos volátiles (AOV) como subproductos del proceso, entre estos compuestos se encuentran el ácido acético, propiónico, butírico y valérico, los cuales se generan durante la conversión continua de los azúcares, afectando la acidez del medio y el producto final (Correa Otero 2011).



**Figura 9** % de acidez titulable bajo diferentes concentraciones de DAP en relación al tiempo de fermentación.

En la tabla 3, se presentan los parámetros cinéticos obtenidos de los cultivos de *S. cerevisiae*, realizados con diferentes concentraciones de fosfato diamónico, durante las 66 horas de fermentación. Se puede observar que para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), en los tratamientos evaluados (T1, T2 y T3), no hubo diferencia significativa, con una velocidad específica de crecimiento cercana a  $0.09 \text{ h}^{-1}$ . Las velocidades específicas calculadas en este trabajo, son similares a las velocidades específicas reportadas por Aguilar, et al. (2015), quien informa una velocidad de crecimiento de  $0.09 \text{ h}^{-1}$ . Contrario al testigo, que mostró una velocidad menor ( $0.06 \text{ h}^{-1}$ ), que fue diferente en comparación a las condiciones evaluadas.

Para el rendimiento de biomasa no se observan diferencias estadísticas entre el T1 (0.5 g/L) y el T3 (2 g/L), con un rendimiento de biomasa cercano a  $0.03 \text{ g L}^{-1}$ , sin embargo, si se

muestran diferencias estadísticas para el T1(0.5 g/L) con un rendimiento de biomasa de 0.02 g L<sup>-1</sup> y T2 (1 g/L) con un rendimiento de biomasa de 0.04 g L<sup>-1</sup>. Aunque el valor de las medias para los tratamientos es similar, la prueba de Tukey toma en cuenta la desviación estándar, por tanto, indica una diferencia estadística en los resultados. Los resultados en este trabajo, son inferiores a los reportados por Robles Calderon (2021), quien reportó un rendimiento de biomasa de 0.09 g L<sup>-1</sup> cuando se usó una concentración de ADP de 1 g/L. Lo que indica que aunque se hayan usado diferentes concentraciones de DAP su efecto sobre el rendimiento de biomasa fue similar entre algunos de los tratamientos e incluyendo al testigo.

Los resultados obtenidos para el rendimiento de producto ( $Y_{p/s}$ ) muestran que no hay diferencias significativas entre las condiciones evaluadas con un rendimiento de producto cercano a 0.09 g L<sup>-1</sup>. Estos resultados son inferiores a los reportados por Robles Calderon (2021), quien reportó un rendimiento de producto de 0.32 g L<sup>-1</sup>. Contrario al testigo, que mostró un rendimiento de producto menor (0.08 g L<sup>-1</sup>), que fue diferente en comparación a las condiciones evaluadas.

Finalmente, para la productividad volumétrica ( $Q_p$ ) no se muestran diferencias estadísticas entre las diferentes condiciones evaluadas (T1, T2 y T3), con una productividad volumétrica cercana a 1.17 g/L.h. Estos resultados son inferiores a los reportados por Rafael-Ayala y Bejarano (2024), quienes usando DAP como fuente de nutriente, reportaron una productividad volumétrica de 1.75 g/L.h. Contrario al testigo, que obtuvo una productividad volumétrica menor (0.71 g/L.h), diferente en comparación a las condiciones evaluadas. Lo que indica que la adición de fosfato diamónico en el medio tiene una influencia positiva en la productividad volumétrica.

**Tabla 3** Parámetros cinéticos calculados con cada una de las condiciones evaluadas.

<b>Tratamiento</b>	<b><math>\mu</math></b>	<b><math>Y_{x/s}</math></b>	<b><math>Y_{p/s}</math></b>	<b><math>Q_P</math></b>
Testigo	$0.06 \pm 0.007^b$	$0.03 \pm 0.001^{ab}$	$0.08 \pm 0.009^b$	$0.71 \pm 0.068^b$
T1	$0.09 \pm 0.007^a$	$0.02 \pm 0.005^c$	$0.09 \pm 0.003^a$	$1.08 \pm 0.005^a$
T2	$0.09 \pm 0.007^a$	$0.04 \pm 0.000^a$	$0.09 \pm 0.002^a$	$1.12 \pm 0.015^a$
T3	$0.08 \pm 0.000^a$	$0.03 \pm 0.000^{bc}$	$0.09 \pm 0.002^a$	$1.17 \pm 0.033^a$

Medias con letras en común no son significativamente diferentes a partir de pruebas de Tukey ( $p > 0.05$ ). Testigo, T1 (0.5 g/L), T2 (1 g/L), T3 (2 g/L).

## VI. CONCLUSIONES

El estudio demostró que la adición de diferentes concentraciones de fosfato diamónico como fuente de nitrógeno, mostraron tener un efecto positivo significativo en la producción de biomasa. Es decir que al aumentar las concentraciones de fosfato diamónico en el medio, favorece al crecimiento celular. Por el contrario, en cuanto la producción de etanol al incrementar la cantidad de fosfato de amonio a más de 1 g/L, no mostró un efecto positivo en la concentración de etanol.

En cuanto a los parámetros cinéticos, se demostró que al incrementar la concentración de fosfato diamónico no hay un efecto sobre la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento de producto y la productividad volumétrica. Por el contrario si se observó un efecto sobre el rendimiento de biomasa en nutriente, resaltándose que cuando se utilizó el T2 (1 g/L) se mejoró el rendimiento de biomasa respecto al T1 (0.5 g/L) y T3 (2 g/L)

## **VII. RECOMENDACIONES**

Para próximas investigaciones, se recomienda estudiar otros nutrientes en el medio como por ejemplo la fuente de fosforo.

Se recomienda realizar el proceso de escalamiento a nivel industrial para hacer una traslación de escala.

Se recomienda hacer estudios de pH y temperaturas en la fermentación alcohólica.

## 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

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/12251/300060.2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

AGUILAR, J; ESPINOZA, M; CABANILLAS, J; ÁVILA, I; GARCÍA, A; JULCA, J; TACANGA, D; ZUTA, I Y LINARES, G. 2015. Evaluación de la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae*

utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. Agroindustrial Science. 5. 1-11. Disponible en

<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/932/866>

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>

ALFENORE, S; MOLINA-JOUVE, C; GUILLOUET, S; URIBELARREA, J.L; GOMA, G Y BENBADIS, L. 2002. Mejora de la producción de etanol y la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* mediante una estrategia de alimentación con vitaminas durante el proceso de lotes alimentados. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60, 67-72. Disponible en.

<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1092-7>



CHEKANOVAB, K; SCHASTNAYAA, E; SOLOVCHENKOA, A; LOBAKOVAA, E. 2017. Effects of CO<sub>2</sub> 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/>

DLANGAMANDLA, N; NTWAMPE, S. K. O; ANGADAM, J. O; CHIDI, B. S; Y MEWA-NGONGANG, M. 2019. Kinetic parameters of *Saccharomyces cerevisiae* alcohols production using *Nepenthes mirabilis* pod digestive fluids-mixed Agro-waste hydrolysates. *Fermentation*, 5(1), 10. Disponible en <https://doi.org/10.3390/fermentation5010010>

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/EVALUACION\\_DE\\_MELAZA\\_DE\\_CAÑA\\_COMO\\_SUSTRATO\\_PARA\\_LA\\_PRODUCION\\_DE\\_Saccharomyces\\_cerevisiae](https://www.academia.edu/8012167/EVALUACION_DE_MELAZA_DE_CAÑA_COMO_SUSTRATO_PARA_LA_PRODUCION_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, G. A. 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, J. I; 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>

GUALTIERI A, MJ; VILLALTA R, C; DÍAZ T, LE; MEDINA, G., LAPENNA, E; Y RONDÓN, ME. 2007. Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*, 38(2), 31–37. Disponible en [https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-04772007000200004&script=sci\\_arttext](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-04772007000200004&script=sci_arttext)

Gómez Bravo, J., Cruz Ramales, S., Rosado García, M., Tzompatzi Sánchez, A., & De los Santos Bañuelos, G. 2023. Modelación de la cinética de reacción para la producción de polihidroxialcanoatos microbianos mediante *Bacillus megaterium*. *Project Design and Management*, 1. Disponible en <https://doi.org/10.35992/pdm.mo2023.1886>

HERNÁNDEZ, MN. 2012. Determinación de la fuente de nitrógeno y su cantidad para optimizar la producción de etanol a partir de fermentación de jugo de caña de sorgo dulce a nivel de laboratorio. Trabajo para optar por el título de Lic. Ingeniería Química. Guatemala. Universidad del Valle de Guatemala. 95 p. Disponible en <https://repositorio.uvg.edu.gt/static/flowpaper/template.html?path=/xmlui/bitstream/handle/123456789/1375/%28Natalya%20Maribel%20Hern%c3%a1ndez%20Son%29%20DETERMINACI%c3%93N%20DE%20LA%20FUENTE%20DE%20NITR%c3%93GENO%20Y%20SU%20CANTIDAD%20PARA%20OPTIMI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

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&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-19352015000100008&script=sci_abstract&lng=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>

HAWAZ, E; TAFESSE, M; TEFAYE, A; KIROS, S; BEYENE, D; KEBEDE, G; BOEKHOUT, T; GROENWALD, M; THEELEN, B; DEGEFE, A; DEGU, S; ADMASU, A; HUNDE, B Y MULETA, D. 2024. Producción de bioetanol a partir de melaza de caña de azúcar mediante cofermentación del aislado TA2 de *Saccharomyces cerevisiae* y el aislado HCJ2F-19 de *Wickerhamomyces anomalus*. Ann Microbiol. 74(13). Disponible en <https://doi.org/10.1186/s13213-024-01757-8>

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](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; Y 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>

ROJAS-SARIOL, L; LORENZO-ACOSTA, Y; DOMENECH-LÓPEZ, F. 2011. Estudio del consumo de ácidos en el ajuste de pH en diferentes medios de fermentación alcohólica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 45 (2). 57-62 pp. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Ciudad de La Habana, Cuba. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223122259008.pdf>

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>

SALMON, J. M Y ORTIZ-JULIEN, A. 2008. Mejora de la fermentación alcohólica en condiciones extremas. Revista de enología científica y profesional. Disponible en [https://www.acenologia.com/ciencia97\\_1/](https://www.acenologia.com/ciencia97_1/)

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](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](https://www.researchgate.net/publication/310762331_Saccharomyces_cerevisiae_in_the_Production_of_Fermented_Beverages)

YEGRES, F; FERNÁNDEZ-ZEPPEFELDT 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](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%3%A9nulas%20de%20Saccharomyces%20cerevisiae,las%20prote%3%ADnas%20HSP104%20\(HSP%2C%20prote%3%ADna](https://www.redalyc.org/journal/674/67446178012/html/#:~:text=Algunas%20c%3%A9nulas%20de%20Saccharomyces%20cerevisiae,las%20prote%3%ADnas%20HSP104%20(HSP%2C%20prote%3%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](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>

VALENCIA, P; ROJAS, P; URBINA, C Y URTUBIA, A. 2019. Efecto del uso de hidrolizado enzimático de proteína de levadura sobre la fermentación y el perfil sensorial del vino. BIO web de conferencias. 12, 02017. Disponible en <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191202017>

## IX. ANEXOS

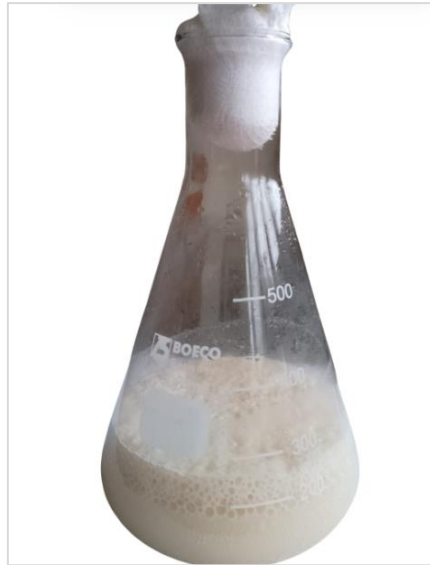
### *Anexos 1* Activación de levadura

Materiales y equipo:

- Incubadora termostática (BIOBASE)
- Matraz Erlenmeyer (500 ml)
- Balanza digital
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fermipan)

Procedimiento:

- Esterilizar el volumen necesario del medio de cultivo en un matraz de 500 mL, para la activación de la levadura (170 mL, volumen necesario para inocular 10 mL a los 17 matraces y completar el volumen total de 150 mL).
- Colocar el matraz (170 mL del medio) en la incubadora, durante 2 horas a una temperatura de 30 °C, para estabilizar la temperatura, previo a la activación.
- Sacar el matraz de la incubadora y pesar 5.1 g de levadura (cantidad calculada para 2550 mL, correspondiente a la conversión de 2 g/L) y agregarla en los 170 mL del medio de cultivo (la levadura debe caer directamente en el medio).
- Colocar nuevamente el matraz en la incubadora, a temperatura de 30 °C, durante 15 min, para absorción y activación de la levadura en el medio.
- Transcurrido el tiempo de activación (15 min), transfiera el 6.67 % de volumen (o lo que tenga calculado) a cada matraz de trabajo (se completan los 150 mL vol total)



**Figura 10** Levadura Activada

**Anexos 2** Preparación de solución con tampón (buffer) de citrato a pH 5.70 y 0.1 M.

#### Reactivos

- Ácido cítrico ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ).
- Citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ).
- Agua destilada.

#### Materiales

- Matraz aforado de 1 L.
- Beaker de 3000 mL.
- Varilla de agitación

- Pipetas volumétricas.

Equipos

- Balanza analítica.
- pH-metro.
- Agitador magnético.
- Guantes de laboratorio y gafas de seguridad.

Fórmula:

Para preparar 2.55 L de buffer pH 5.75 y 0.1 M:

$$pH = pKa + \log\left(\frac{base}{acido}\right)$$

$$5.75 = 4.76 + \log\left(\frac{base}{acido}\right)$$

$$0.94 = \log\left(\frac{base}{acido}\right)$$

$$\frac{base}{Acido} = 10^{0.94} \approx 8.71$$

$$base + acido = 0.1 M$$

$$base = 8.71 - acido$$

$$8.71 * acido + acido = 0.1$$

$$9.71 * acido = 0.1$$

$$Acido = \frac{0.1}{9.71} \approx 0.0103 M$$

$$Base = 8.71 * 0.0103 \approx 0.0897 M$$

### Calcular los moles y gramos

$$\text{Ácido cítrico} = \text{Moles de ácido} = 0.0103M * 2.55 L = 0.02627 \text{ moles}$$

$$\text{Gramos de ácido} = 0.02627 \text{ moles} * \frac{192.15g}{\text{mol}} \approx \mathbf{5.05g}$$

$$\text{Citrato de sodio} = \text{Moles de base} = 0.0897M * 2.55 L = 0.22874 \text{ moles}$$

$$\text{Gramos de ácido} = 0.22874 \text{ moles} * \frac{258.07g}{\text{mol}} \approx \mathbf{59.03g}$$

### Procedimiento:

- Pesar 5.05 g de ácido cítrico y 59.03 g de citrato de sodio utilizando una balanza analítica.
- Disuelva el ácido cítrico en aproximadamente 400 mL de agua destilada estéril en un vaso de precipitados de 500 mL, utilizando una varilla de agitación.
- Añada el citrato de sodio a la solución de ácido cítrico y continúe agitando hasta que todos los sólidos se disuelvan completamente.
- Transfiera la solución al vaso de precipitados con agua destilada estéril y añádalos al matraz aforado, completando el volumen hasta 2.55 L con agua destilada estéril.
- Verifique el pH de la solución utilizando un pH-metro. Si es necesario, ajuste el pH añadiendo pequeñas cantidades de ácido cítrico si necesita bajar el pH o citrato de sodio si necesita subir el pH, según sea necesario.

### *Anexos 3* Determinación de biomasa por espectrofotometría y peso seco.

#### Materiales:

- Matraz Erlenmeyer (250 mL)
- Tubos de ensayo
- Capachos de aluminio (crisoles)
- Agua destilada
- Cloruro de sodio (NaCl) al 1M

#### Equipos:

- Espectrofotómetro
- Centrifuga
- Balanza digital
- Horno

#### Procedimiento:

##### Por espectrofotometría

- Se toma un volumen menor o igual a 700 uL de caldo de cultivo y se diluye entre 5.7, 6.7, 8.5, 10, 16, 19 y 40 veces con agua destilada.
- Se mide la absorbancia a 600 nm usando como blanco agua destilada.
- El valor obtenido de absorbancia se extrapola en la curva de calibrado de biomasa.

##### Por peso seco:

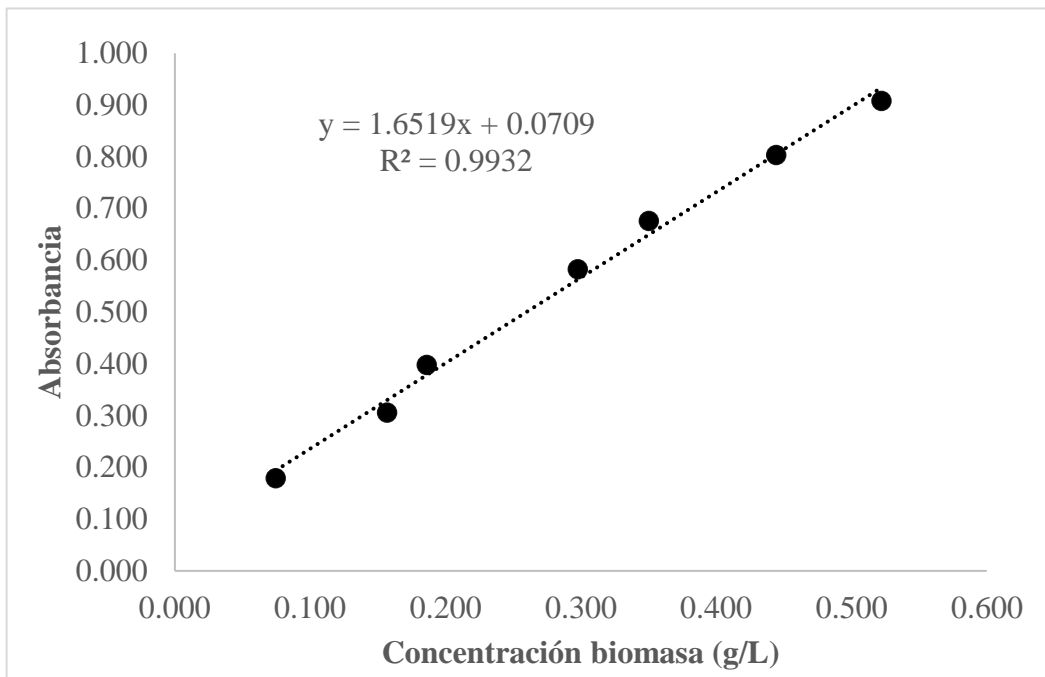
- Se toman 10 mL del caldo de cultivo y se le agrega 1 mL de NaCl 1M
- Se centrifuga a 12,000 rpm durante 10 min.
- El pellet de biomasa se resuspende en 10 mL de agua destilada y es centrifugado nuevamente (este paso se repite 2 veces).
- El pellet obtenido se deposita en capachos de aluminio (o crisol) previamente secados a 80 °C hasta peso contante y pesado.
- Por diferencia del peso del capacho (o crisol) antes de colocar la muestra y luego de secar la muestra a 80 °C hasta peso constante y considerando el volumen de 10 mL se obtiene la concentración celular.

### **Curva de calibrado de biomasa**

La curva de calibrado de biomasa se construye de la siguiente manera:

- Se realiza un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 150 rpm y 30 °C asegurando obtener células en etapa de crecimiento (aprox. 16 a 24 h).
- Se toman 10 mL del caldo de cultivo (por duplicado), y se le adiciona 1 mL de NaCl al 1M. Por mientras se procesa la muestra, el matraz con el cultivo de *S. cerevisiae* se deja en temperaturas de refrigeración para evitar crecimiento.
- Se centrifugan los 10 mL con el mL de NaCl, en una centrifuga a 12,000 rpm, durante 10 min.
- El pellet de biomasa se resuspende en 10 mL de agua destilada y es centrifugado nuevamente (este paso se repite 2 veces).
- Se secan los capachos de aluminio en un horno a 80 °C, hasta obtener un peso constante (deben estar pesados, para realizar la diferencia del capacho con la muestra).

- El pellet obtenido de la segunda centrifugación (10 mL), se deposita en los capachos de aluminio (previamente secados) y se toma el peso inicial antes de llevarlo nuevamente al horno (80 °C).
- Se toma el peso cada dos horas, hasta obtener un peso constante.
- Al tener el peso constante de biomasa, se toman todos los pesos obtenidos, y se les resta el peso del capacho. Valores que serán procesados para la realización de la curva de calibrado.
- Se preparan diluciones del caldo de cultivo de *S cerevisiae* entre: 5.7, 6.7, 8.5, 10, 16, 19 y 40 veces con agua destilada, de modo que se tenga un volumen final de 4 mL.
- Al tener las diluciones, se procede a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm, usando como blanco agua destilada.
- Para realizar la curva de calibrado, la absorbancia debe de estar entre 0.1 y 0.9.
- Con los datos obtenidos del peso seco y la absorbancia se grafican los datos para obtener la curva de calibrado.
- En el eje x, se grafica la concentración de biomasa y en el eje y, la absorbancia medida en el espectrofotómetro.



**Figura 11** Curva de calibrado de biomasa

**Anexos 4** Protocolo para determinación de etanol

Reactivos:

- Agua destilada
- Alcohol (70%)
- Dicromato de potasio (95-98 % en polvo)
- Ácido sulfúrico líquido a una concentración de 98%

Materiales y equipos:

- Frasco de vidrio (500 ml)
- Probeta (100 ml)
- Tubos de ensayo

- Papel aluminio
- Espectrofotómetro
- Centrifuga

## **Procedimiento**

### **Preparación de Soluciones**

1. Se prepara la solución de dicromato de potasio al 0.1 M, para ello se hace lo siguiente:
  - Pesar 7.5 g de dicromato de potasio al 95-98% ( $K_2Cr_2O_7$ ).
  - Disolver el dicromato de potasio en agua destilada hasta completar un volumen de 250 ml.
2. Solución de ácido sulfúrico al 5 M:
  - Medir 26.7 mL de ácido sulfúrico concentrado al 98% ( $H_2SO_4$ ).
  - Verter el ácido sulfúrico y completar con agua destilada hasta un volumen final de 100 mL.
3. Mezcla de soluciones:
  - Agregar lentamente la solución de ácido sulfúrico al 5 M en el recipiente que contiene la solución de dicromato de potasio al 0.1 M.
  - Agitar vigorosamente durante la adición para homogeneizar la mezcla.

### **Procedimiento Experimental:**

Se prepararon 7 patrones de etanol a partir de disoluciones al 0.5%, 1%, 1.4%, 2%, 3%, 3.5% y 4% de etanol en volumen con agua destilada. Para la preparación de las disoluciones se añaden diferentes  $\mu L$  de etanol al 70 % v/v respectivamente, hasta completar un volumen

final de 50 mL con agua destilada. Los volúmenes a añadir para la concentración de diferentes porcentajes de etanol, se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4** Concentración de volúmenes para la preparación de diferentes concentraciones de etanol

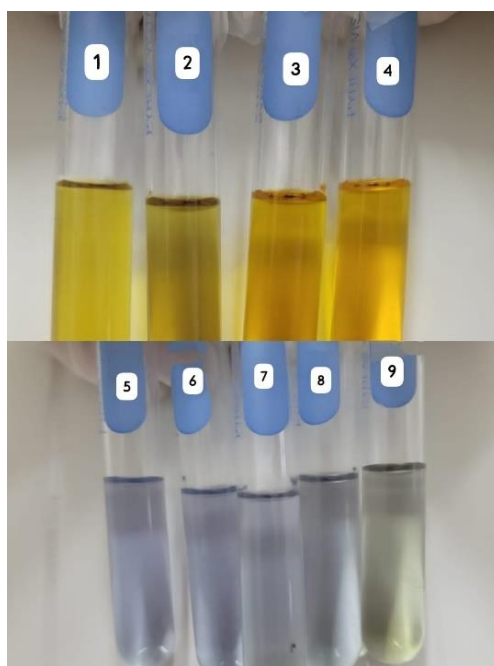
<b>Etanol</b>	<b>Etanol (ml)</b>	<b>Agua destilada (ml)</b>
<b>0.5%</b>	0.4	49.6
<b>1%</b>	0.7	49.3
<b>1.4%</b>	1.0	49.0
<b>2%</b>	1.4	48.6
<b>3%</b>	2.1	47.9
<b>3.5%</b>	2.5	47.5
<b>4%</b>	2.9	47.1

#### 4. Curva de calibrado

La curva de calibrado de etanol se construye de la siguiente manera:

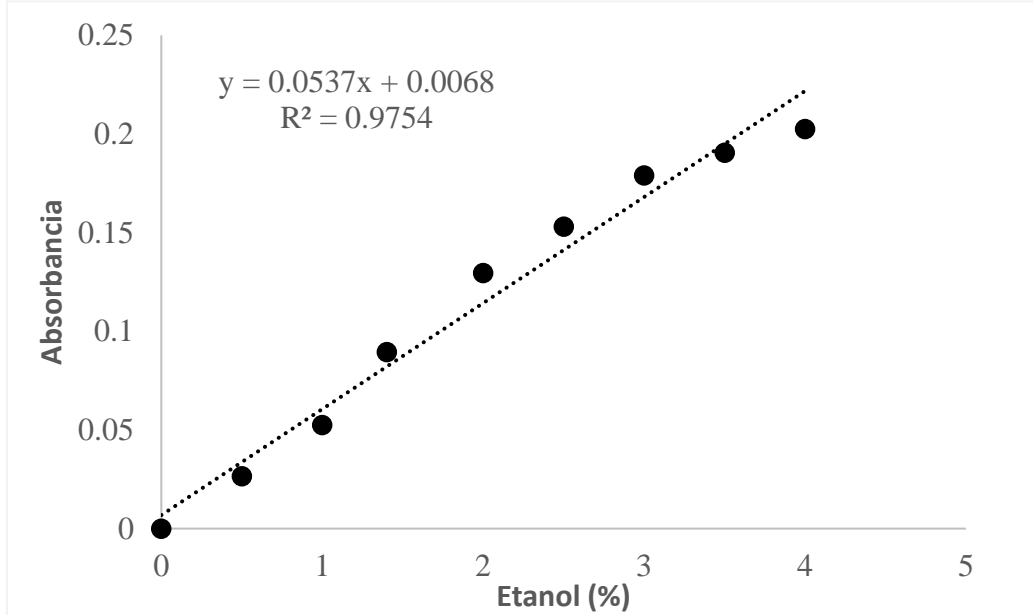
- Se toman 3 ml de la solución oxidativa de dicromato de potasio y se adicionan en los diferentes tubos.
- Se agrega 300  $\mu$ L de cada una de las diluciones de etanol a los tubos correspondientes.
- Se centrifuga a 3600 rpm durante 5 minutos.
- Se tapan herméticamente los tubos de ensayo.
- Se dejan reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, si hay cambio de coloración volver a realizar (figura 12)
- Se mide la absorbancia a 590 nm usando como blanco la solución de la reacción oxidativa con agua destilada.
- El valor obtenido de la absorbancia se extrapola en la curva de calibrado de etanol.

En la figura 12, se muestran las soluciones oxidativas con diferentes porcentajes de etanol, si después de dejarlas en reposo (30 min.) hay un cambio de coloración (verdoso a azul), esto se debe a concentraciones altas de etanol (4.5 %), por lo que para poder medir la absorbancia, la coloración debe de estar tal como se muestra en la Fig. 12 (4); por lo que este método es únicamente eficiente para diluciones bajas de etanol, tal como lo comprobó Gonzáles (2013).



**Figura 12** Solución oxidativa con diferentes porcentajes de etanol.

Finalmente se realizó la curva de calibrado para las diluciones (bajas), a una longitud de onda específica de 590 nm; estas diluciones arrojaron resultados confiables como se puede observar en la figura 13, obteniendo una R2 de 0.9754.



**Figura 13** Curva de calibración para concentraciones bajas de etanol (0.5-4 %)

Ejemplo de cálculo

Datos:

Promedio de índice de absorbancia=0.0065

FD=10

Intercepto ecuación:0.007

Pendiente ecuación: 0.054

$$X = \frac{0.065 - 0.054}{0.007} * 10$$

$$X = 15.71 \% v/v$$

## *Anexos 5* Preparación de Cloruro de Sodio (NaCl)

### Materiales y equipos:

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Agua destilada
- Vaso medidor o matraz aforado de 1 L
- Pipeta
- Centrifuga
- Tubos de centrifugación
- Medio de cultivo celular fermentado (caldo fermentado)

### Preparación de NaCl a 0.1 M:

- La molaridad de NaCl (M) se calcula usando su peso molecular (58.44 g/mol).
- Para preparar 1 L de solución de NaCl a 0.1 M:
- Pesar 5.844 g de NaCl.
- Disolver la sal en un vaso medidor con aproximadamente 800 mL de agua destilada.
- Completar el volumen a 1 L con agua destilada.
- Mezclar bien hasta que el NaCl se disuelva completamente.

### Remoción del sobrenadante del medio de cultivo:

- Se toma 5 mL de medio de cultivo fermentado en un tubo de centrifugación.
- Se añaden 500  $\mu$ L de la solución de NaCl a 0.1 M preparada previamente al tubo con el caldo fermentado.
- El tubo se coloca en la centrifuga y se centrifuga a 3600 rpm durante 20 minutos.

- Tras la centrifugación, se retira cuidadosamente el sobrenadante y se vierte en otro tubo de centrifugación, el precipitado final se descarta.
- Después de retirar el sobrenadante, el precipitado restante se descarta y el volumen original del sobrenadante se vuelve a centrifugar.
- El proceso de centrifugación a 3600 rpm durante 20 minutos se repite nuevamente.
- El sobrenadante tiene que quedar transparente, sin ninguna suspensión celular, de lo contrario volver a repetir la centrifugación.

*Anexos 6* Protocolo para determinación de viabilidad celular.

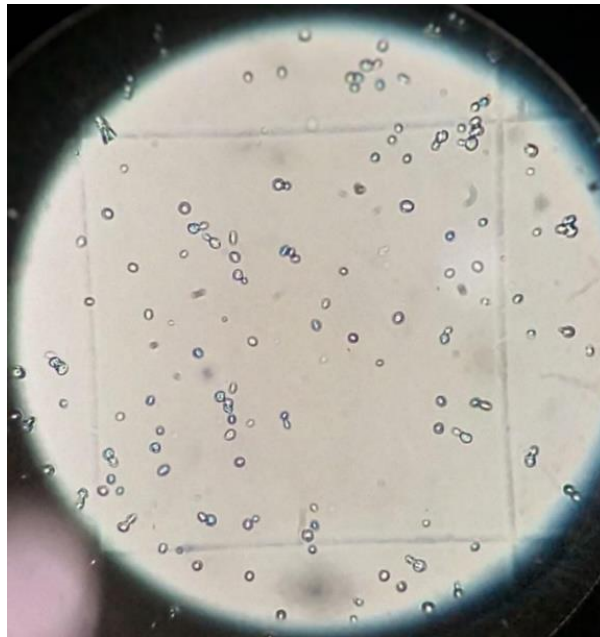
Materiales y equipos:

- Cámara de Neubauer
- Azul de metileno
- Tubos de ensayo
- Pipeta
- Microscopio

Procedimiento:

- Se prepara diluciones del caldo de cultivo entre: 5.7, 6.7, 8.5, 10, 16, 19 y 40 veces con agua destilada (el FD varía dependiendo el tiempo de fermentación), de modo que se tenga un volumen final de 1 mL.
- El azul de metileno se prepara diluyendo la solución original a una concentración de 1:10 con agua destilada.
- Se toma el mL de la dilución del caldo de cultivo y se mezclan con 400  $\mu$ L de la dilución de azul de metileno.

- Después de preparar la mezcla de células con azul de metileno, se esperan 3 min.
- Se pipetea cuidadosamente 10  $\mu$ L de la mezcla (dilución células y azul de metileno) sobre la cámara de Neubauer, cubriendo, toda el área del reticulado sin sobrellenar.
- Se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio y se realiza la observación con el lente de 40X.
- Para el recuento de las células, se seleccionan los cuatro cuadrantes de los extremos de la cámara de Neubauer mejorada.
- En cada extremo de la cámara de Neubauer se realiza el conteo de células teñidas y no teñidas
- Las células viables permanecen sin teñir, mientras que las no viables se tiñen de azul, tal como se muestra en la figura 14.
- El recuento se hace en cuatro áreas cuadradas de 1 mm<sup>2</sup> de la cámara (los últimos cuatro extremos), anotando por separado las células teñidas y las no teñidas.



**Figura 14** Células viables y no viables en uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer.