

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

**Producción continua de etanol en un reactor de lecho
fijo usando células inmovilizadas (*Saccharomyces cerevisiae*)
en alginato de calcio**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. CARLOS FRANCISCO TITO VARGAS

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA - PERU

2004

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN DE TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS No- 110----- Titulo Profesional de **BIÓLOGO – MICROBIOLOGO**

El secretario Academico Administrativo de la Facultad de Ciencias Certifica que el concejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de tesis **Producción continua de etanol en un reactor de lecho fijo usando células inmovilizadas (Saccharomyces cerevisiae) en alginato de calcio.**

El mismo que esta conformado por:

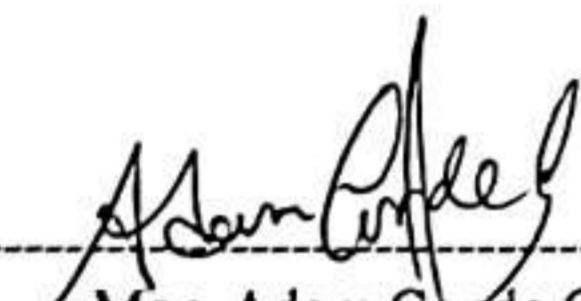
Presidente : Mgr. Adam Conde Cruz
Secretario : Mgr. Daladier Castillo Cotrina
Vocal : Blga. Soledad Bornas Acosta

Para examinar y calificar el trabajo de tesis sustentado en acto público el día 6 de
Septiembre del 2004.

Presentando por el Señor Bachiller **CARLOS FRANCISCO TITO VARGAS** de la Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual emitió su calificativo sobre el trabajo expuesto y se procedió a obtener el promedio que arrojó el calificativo de ----
Aprobado por unanimidad con tres
Votos a favor con la nota de Dieciséis----- y promedio de Bueno-----

Para ratificar lo detallado firman:



Mgr. Adam Conde Cruz
Presidente



Mgr. Daladier Castillo Cotrina
Secretario



Blga. Soledad Bornas Acosta
Vocal

Dedicatoria:

A Dios y mi familia que con su inmenso amor,
dedicación y aliento constante hicieron
posible mi formación profesional.

T
570
T62V

Agradecimientos:

A los docentes Mgr. Roberto Castellanos Cabrera y Mgr. Juan Viloche Bazán por sus valiosos aportes y asesoramiento en la culminación del presente trabajo.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| Resumen | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Objetivos | 2 |
| 1.1.1 Objetivos generales | 2 |
| 1.1.2 Objetivos específicos..... | 2 |
| 1.2 Hipótesis..... | 2 |
| II. FUNDAMENTO TEORICO | 3 |
| 2.1 Etanol..... | 3 |
| 2.2 Obtención del etanol..... | 3 |
| 2.3 Usos del etanol | 4 |
| 2.4 Fermentación del etanol | 4 |
| 2.5 Levaduras | 7 |
| 2.5.1 Taxonomía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| 2.5.2 Morfología de levaduras..... | 8 |
| 2.5.3 Género <i>Saccharomyces</i> | 9 |
| 2.5.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 2.5.5 Historia de las levaduras. | 9 |
| 2.5.6 Fisiología de las levaduras. | 10 |
| 2.6 Inmovilización de células..... | 12 |
| 2.6.1 Definición de inmovilización..... | 12 |
| 2.6.2 Importancia de la inmovilización..... | 12 |
| 2.6.3 Métodos generales de inmovilización | 15 |
| 2.6.3.1 Inmovilización por atropamiento | 15 |
| 2.6.3.2 Inmovilización por adsorción..... | 16 |
| 2.6.3.3 Inmovilización por entrecruzamiento..... | 18 |
| 2.7 Biorreactores | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7.1 Tipos de biorreactores | 20 |
| 2.7.1.1 Reactores discontinuos..... | 20 |
| 2.7.1.2 Reactores continuos..... | 21 |
| 2.8 Cinética de fermentaciones | 24 |
| 2.8.1 Cinética de fermentación discontinua | 25 |
| 2.8.2 Cinética de fermentación continua..... | 26 |
| 2.8.3 Fermentación continua usando células inmovilizadas | 27 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 3.1 Aislamiento e identificación de levaduras..... | 32 |
| 3.1.1 Aislamiento de levaduras | 32 |
| 3.1.2 Identificación de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 32 |
| 3.2 Determinación del crecimiento de levaduras | 33 |
| 3.2.1 Crecimiento de levaduras libres | 33 |
| 3.2.2 Crecimiento de levaduras inmovilizadas..... | 34 |
| 3.3 Producción de biomasa de levaduras..... | 34 |
| 3.4 Inmovilización celular..... | 35 |
| 3.4.1 Determinación de células viables..... | 36 |
| 3.4.2 Determinación del volumen y diámetro de esfera..... | 36 |
| 3.5 Determinación de la curva patrón de levaduras | 37 |
| 3.5.1 Determinación de la concentración celular por medición de la densidad óptica | 37 |
| 3.5.2 Determinación de la concentración celular por el método del recuento celular | 38 |
| 3.6 Determinación de la curva patrón de glucosa | 38 |
| 3.7 Determinación de la curva patrón de azúcares reductores totales..... | 39 |
| 3.8 Proceso de producción continua de etanol | 40 |
| 3.8.1 Esterilización del reactor y del medio de fermentación | 40 |
| 3.8.2 Fermentación discontinua..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8.3 Fermentación continua | 41 |
| 3.8.4 Control de la temperatura | 41 |
| 3.8.5 Control del pH..... | 41 |
| 3.8.6 Producción de etanol | 42 |
| 3.9 Determinación de la concentración de etanol..... | 42 |
| 3.9.1 Método del picnómetro..... | 42 |
| 3.10 Diseño experimental y análisis estadístico..... | 43 |
| 3.11 Diseño del reactor de lecho fijo..... | 44 |
| 3.12 Determinación de los parámetros cinéticos de la fermentación en el reactor continuo | 45 |
| 3.13 Establecimiento del mejor rendimiento de etanol | 45 |
| IV. RESULTADOS | 46 |
| 4.1 Concentración de etanol..... | 46 |
| 4.2 Parámetros cinéticos de fermentación en el reactor continuo | 47 |
| 4.3 Producción de etanol | 48 |
| 4.3.1 Efecto de las variables estudiadas según el grafico de pareto..... | 49 |
| 4.3.2 Efecto de las variables estudiadas en la producción de etanol según el grafico de líneas | 49 |
| 4.3.3 Efecto de las variables estudiadas según el Análisis de superficie de respuesta..... | 51 |
| 4.3.4. Modelo matemático que representa a la experimentación de fermentación.... .. | 52 |
| 4.3.5. Producción máxima de etanol | 52 |
| V. DISCUSIÓN | 53 |
| VI CONCLUSIONES | 58 |
| VII. RECOMENDACIONES | 59 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| IX. ANEXOS..... | 65 |

RESUMEN

El presente trabajo constituye el estudio de producción continua de etanol en un biorreactor de lecho fijo usando un sistema de células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio.

La experimentación se realizó de acuerdo al diseño factorial 2³, fue realizado en un reactor de lecho fijo con los parámetros cinéticos de: 72 ml/h, tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 8,33 h y una cinética de fermentación de $S_0 = 147,9 e^{-0,02244t}$

Se obtuvo la mayor concentración de etanol de 14,4 g/l a una concentración de sacarosa de 100 g/l, a un pH de 4,6 y a una temperatura de 25 °C. El modelo matemático que representa la producción de etanol en g/l fue de: $69,4 - 0,17A - 5,675B - 1,5C + 8,25 \times 10^{-3}AB + 3,25 \times 10^{-3}AC + 0,11BC$

De acuerdo al análisis estadístico se observa que el rendimiento de la producción de etanol es a través del modelo de superficie de respuesta y que la variable respuesta está relacionada en gran medida con las variables de concentración del sustrato y temperatura.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de etanol que se realiza por un proceso metabólico, en el cual se utiliza un conjunto de enzimas que transforman el azúcar en etanol usando la vía glicolítica de Embden-Meyerhof.

La industria del etanol, utiliza el método de proceso discontinuo, el cual se lleva a cabo en las siguientes 4 etapas: carga, fermentación, descarga y limpieza. En la primera fase del proceso, se realiza la producción de biomasa (semillamiento) por un proceso estrictamente aeróbico, donde las levaduras consumen parte del sustrato para su mantenimiento y multiplicación. En una segunda fase de fermentación, sin aireación, se produce el alcohol.

La fermentación continua utiliza un sistema de reactores completamente agitados colocados en cascada o reactores tubulares de lecho fijo. Este tipo de fermentación elimina la etapa de carga del sustrato y descarga del producto del fermentador, aumentando los rendimientos y productividades del proceso.

A través del proceso de inmovilización, las células atrapadas o capturadas dentro de un soporte de material inerte (manteniendo su actividad) mejoran la

producción y los productos pueden ser rápidamente separados del biocatalizador. Utilizando levaduras inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio en un reactor tubular de lecho fijo se produce etanol continuamente. En este tipo de fermentación se carga una sola vez las levaduras inmovilizadas al reactor del lecho fijo. Constantemente se alimenta el sustrato al fermentador y continuamente se produce etanol

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General:

- Obtener etanol en fermentación continua utilizando levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en gel de alginato de calcio

1.1.2 Objetivos Específicos:

- Establecer los parámetros cinéticos de la fermentación con que se realiza en el reactor continuo de lecho fijo.
- Establecer la mejor producción de etanol en la fermentación continua mediante un diseño experimental.

1.2 HIPOTESIS:

Es posible obtener etanol por fermentación continua con levaduras *S. cerevisiae* inmovilizadas en alginato de calcio.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 ETANOL

El etanol o alcohol etílico cuya fórmula es C_2H_5OH , es un líquido incoloro muy fluido de agradable olor, se mezcla con el agua en todas proporciones desprendiendo calor y disminución de volumen próximo al 4%, arde con llama azulada, con formación de agua y anhídrido carbónico a $20^{\circ}C$, tiene un peso específico de 0,7894, hierve a $78.37^{\circ}C$ y se congela a $-114^{\circ}C$. Cuando está sin diluir, el alcohol tiene un olor ardiente. (Vogt y col., 1984).

2.2 OBTENCIÓN DE ETANOL

El etanol se puede producir por dos vías: síntesis química y biológica. La primera se realiza por una reacción de adición del eteno (etileno), esta reacción también llamada hidratación, utiliza un ácido mineral como el ácido sulfúrico como catalizador, que rompe una de las ligaduras del doble enlace, permitiendo que cada uno de estos átomos de carbono formen un enlace con los átomos del agua (Burns, 1996). La segunda es biológica por medio de la fermentación de mostos azucarados en la que interviene un complejo enzimático (que poseen ciertos microorganismos específicamente levaduras) que transforman el azúcar en etanol.

2.3 USOS DEL ETANOL

El alcohol etílico es uno de los compuestos más usados, tanto en la industria licorera de diferente naturaleza, laboratorios y en el hogar. Ha adquirido gran importancia comercial puesto que se utiliza como combustible, disolvente, agente extractivo, anticoagulante y producto intermedio de la síntesis de innumerables productos químicos. Es empleado en la industria de perfumes, barnices, lacas, pinturas, jabones, productos medicinales, películas fotográficas, cosméticos, etc. (Monick, 1987)

2.4 FERMENTACION DEL ETANOL

La fermentación del etanol realizada por levaduras, utiliza un ciclo de reacciones bioquímicas para transformar el sustrato (sacarosa) en etanol. Este ciclo se divide en dos etapas: de oxidación y de reducción. La primera se lleva a cabo catalizando el sustrato hasta piruvato, en presencia de oxígeno. Y la segunda que transforma el piruvato hasta etanol, que es una reacción netamente anaeróbica. Ambas etapas se detallan a continuación:

- El sustrato (sacarosa) que se encuentra en el medio de fermentación es hidrolizado por la levadura en sus dos unidades monosacáridos (glucosa y fructosa). Esta reacción es realizada por enzimas invertasas o sacarasas producidas por la levadura.

- En presencia de iones de magnesio, por la acción del enzima hexoquinasa y con la colaboración del coenzima ATP (adenosintrifosfato), que contiene fosfato orgánico ligado, la glucosa se transforma en el éster-ácido fosfórico o glucosa-6-fosfato (fosforilación). La fructosa se fosforiliza en fructosa-6-fosfato siguiendo el mismo mecanismo de reacción.
- El enzima glucosa fosfato isomerasa transforma a glucosa-6-fosfato en fructuosa-6-fosfato (isomerización).
- La fructuosa-6-fosfato, bajo la acción del enzima fosfofructo-quinasa y de una segunda molécula de ATP como coenzima, en presencia de iones de Magnesio, se fosforiliza en el átomo C₁ para convertirse en fructuosa-1,6-difosfato.
- La fructuosa-1,6-difosfato se desdobla bajo la acción del enzima aldolasa y, sin la participación de ninguna coenzima, en dos triosafosfatos: gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato se forma GAP en un 4%.
- Por la acción del enzima triosafosfatoisomerasa se genera a partir del dihidroxiacetona-fosfato la gliceraldehído-3-fosfato (GAP) hasta que se instaura un equilibrio entre ambos triosa-fosfatos. En esta etapa no participa ninguna coenzima.

- El gliceraldehido-3-fosfato, en presencia de la coenzima NAD se oxida hasta ácido-1,3-difosfoglicérico bajo la acción del enzima gliceraldehido—fosfato-deshidrogenasa y mediante la captación de fósforo inorgánico.
- El enzima ácido fosfoglicérico-fosfo-kinasa traslada el resto fosfatado del ácido 1,3-difosfoglicérico a la coenzima ADP, originando ácido 3-fosfoglicérico. Aquí se forman por mol de hexosa 2 mol de ATP y 2 mol de ácido fosfoglicérico. Se recuperan así las moléculas de ATP utilizadas en las etapas 1 y 3.
- Por la acción del enzima ácido fosfoglicérico-mutasa se transforma el ácido 3—fosfoglicérico en ácido 2—fosfoglicérico.
- En presencia de iones de magnesio, el enzima enolasa desprende agua del ácido 2-fosfoglicérico. Se origina así el enol del ácido fosfopirúvico. Esta reacción es marcadamente exotérmica, por cada mol de hexosa se desprende 67.2 kJ (16 Kcal.). De aquí 29.4 kJ (7 Kcal.) por mol se fijan en forma de ATP.
- Por efecto del enzima piruvato-quinasa se traslada el resto de fosfato al ADP. La energía liberada resultante es aprovechada por la levadura para otros procesos bioquímicos como producto de desdoblamiento se forma ácido pirúvico.
- El ácido pirúvico se desdobla en acetaldehído y dióxido de carbono por la acción del enzima piruvato-descarboxilasa.

- El enzima alcohol-dehidrogenasa ocasiona la reducción del acetaldehído a alcohol etílico. Como coenzima vuelve a actuar el NAD y el hidrógeno transferido procede de la etapa 6.

2.5 LEVADURAS

El término “levadura” es un término general sin significado taxonómico, se aplica a hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fusión. Las levaduras son de extraordinario interés económico. Algunas especies se emplean en todas las partes del mundo para la elaboración del pan, bebidas alcohólicas y como biomasa en la producción de proteína unicelular.

Las levaduras son seres eucariontes, que presentan alternancia de generaciones. En la fase haploide la cantidad de cromosomas por célula se llama n , y en la fase diploide $2n$. Así en la levadura una célula haploide de *S. cerevisiae* contiene 17 cromosomas y las diploides 34 cromosomas.

2.5.1 TAXONOMIA DE *Saccharomyces cerevisiae*

| | |
|---------------|---------------------------------|
| Sub-división: | EUMYCETES |
| Clase: | ASCOMICETES |
| Subclase: | HEMIASCOMICETIDAS |
| Orden: | ENDOMICETALES |
| Familia: | SACAROMICETACEAS |
| Género: | SACCHAROMYCES |
| Especie: | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

2.5.2 MORFOLOGÍA DE LEVADURAS

La levadura que crece en medios sólidos presenta un aspecto característico. Las colonias jóvenes son siempre húmedas y algo viscosas. En general son blanquecinas de color crema o rosadas. Al envejecer algunas de estas colonias cambian poco, pero otras se tornan secas y rugosas. Casi todas las especies crecen en forma de agregados sueltos de células aisladas que pueden ser globosas, ovoides más o menos piriformes o alargadas y casi cilíndricas. Cuando crecen vigorosamente en cultivos, en portaobjetos, forman a menudo cadenas de células alargadas, por los que se les llama pseudomicelio. En casi todas las especies de interés industrial el modo habitual de reproducción vegetativa es por gemación.

2.5.3 GÉNERO *Saccharomyces* (gr. Sakchar, azúcar; hongo del azúcar).

Estas células presentan células redondas ovoides o alargadas, a menudo formando pseudomicelio; se reproducen por gemación multipolar; conjugación isogámica o heterogámica que puede o no estar precedida de formación del asca; contienen de 1 a 4 esporas por asca, por lo regular redondas u ovoides, raras veces de otras formas; las esporas pueden conjugarse antes de iniciar el crecimiento, realizan intensa fermentación de la glucosa y otros azúcares, no utiliza los nitritos.

2.5.4 *Saccharomyces cerevisiae* (Lat. cerevisia, cerveza; hongo de la cerveza)

Las colonias de estas células en agar mosto son blandas y húmedas, de color crema; células redondas ovoides o algo piriformes en cultivos jóvenes que miden de 4 a 14 μm por 3-7 μm , con una proporción (largo:ancho) entre 1:1 y 2:1.

2.5.5 HISTORIA DE LAS LEVADURAS

Desde la antigüedad tanto en las culturas de oriente como en occidente los microorganismos han sido utilizados para transformar o producir alimentos. La fermentación ha sido realizada como un arte durante muchos siglos; por ejemplo, la elaboración del vino se cree que se practicaba ya al menos 10 000 a.C. mientras que los historiadores creen que los egipcios producían cerveza en los años 5 000-6 000 a.C. dejando germinar la cebada en vasijas de barro y después estrujándola, amasándola, y finalmente remojándola con agua para obtener la bebida. Hacia el

año 4 000 a.C. los egipcios utilizaron las levaduras de la cerveza para la producción de dióxido de carbono para la hinchazón de la masa del pan. El vinagre probablemente se conoce desde el momento en que se obtuvo vino, aunque los datos más tempranos referidos a este compuesto se hallan en el Antiguo y Nuevo Testamento. Las primeras referencias para destilar alcohol y bebidas datan del año 10 000 a.C. en China.

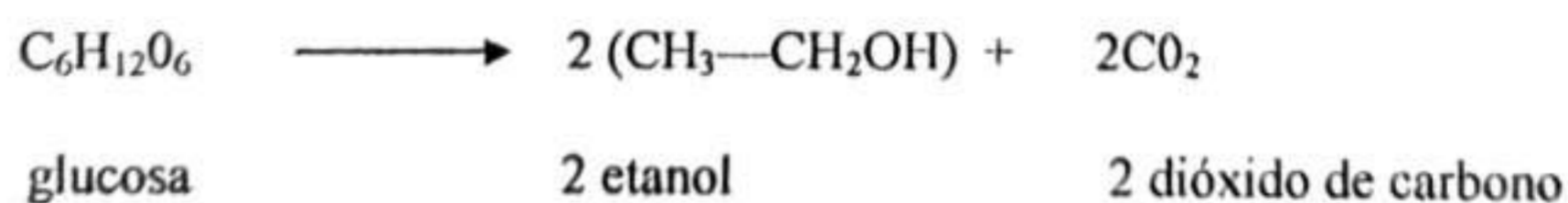
La producción de alimentos y bebidas modificadas mediante procesos de fermentación es operativa desde aproximadamente 10 000 años antes de que se reconociera la existencia de los microorganismos, es evidente que estas tecnologías tradicionales han ido mejorando gradualmente. El examen microscópico de los sedimentos de las vasijas de cerveza excavadas que datan del 3 400 al 1 440 a.C. demuestra claramente que la mayoría de las veces contienen levaduras, observándose también, en los sedimentos, que su pureza es mayor.

2.5.6 FISIOLÓGÍA DE LEVADURAS

Los microorganismos pueden dividirse, de acuerdo a sus necesidades ambientales, en tres grupos: aeróbios estrictos, anaerobios estrictos y organismos facultativos a este último pertenecen las levaduras, que pueden cambiar su metabolismo de aeróbico (respiración) a anaeróbico (fermentación), en función del ambiente donde se encuentren.

El metabolismo aerobio, capacita a las levaduras para oxidar completamente una cierta fracción del sustrato y extraer así la máxima energía par convertir el resto del sustrato en masa celular. Si el objetivo de la fermentación industrial es aumentar la biomasa, resulta una ventaja obvia tener un crecimiento aeróbico con utilización completa del sustrato por respiración, este metabolismo utiliza tres vía bioquímicas: glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria.

En el metabolismo anaerobio no interviene la cadena respiratoria. En la industria, sin embargo, se suele denominar fermentación. Las fermentaciones son propias de los microorganismos como ciertas bacterias y levaduras; y es un proceso catabólico en el cual tanto el dador como el aceptor final de electrones son compuestos orgánicos. Generalmente estos dos compuestos son metabolitos de un único sustrato que durante el proceso se escinden, uno que actúa como dador de hidrógeno (se oxida) y otro que actúa como aceptor final de hidrógenos (se reduce). Por ejemplo en la fermentación alcohólica de la glucosa:



Se ve que la glucosa, sin reaccionar con ninguna otra molécula, se ha escindido en una sustancia sin hidrógenos (CO_2), la sustancia oxidada, y en otra con tres hidrógenos por carbono ($\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{OH}$), la sustancia reducida.

Los enzimas de la fermentación son constitutivos y los enzimas de la respiración son inducibles. Los enzimas que intervienen en la fermentación se encuentran en el citoplasma de la célula; los enzimas de la respiración están en unos organelas denominados mitocondrias.

2.6 INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS

2.6.1 DEFINICIÓN DE INMOVILIZACIÓN

La inmovilización se define como el proceso por el cual se restringe total o parcialmente el movimiento de las enzimas, células, orgánulos, etc., dando lugar a una forma de partícula insoluble en agua denominándose biocatalizador.

El método de inmovilización debe ser permanente, seguro, barato, simple, versátil y fácil de escalar, y los reactivos no deben ser tóxicos. Las partículas deben ser pequeñas, para minimizar restricciones difusionales internas, de tamaño uniforme. También deben ser fuertes mecánicamente para que resistan la compactación de las columnas y la abrasión en los reactores con agitación.

2.6.2 IMPORTANCIA DE LA INMOVILIZACIÓN

En la industria se usan frecuentemente enzimas o células inmovilizadas porque estos biocatalizadores se pueden usar en procesos continuos. los cuales son

especialmente importantes para mantener un medio de fermentación con flujo constante a través del biocatalizador inmovilizado, factor determinante en la estabilidad del enzima y evitándose la contaminación del producto por lo enzimas o células.

Las células o enzimas libres son muy difíciles de volver a utilizar o emplearse en continuo, puesto que ambos son demasiado pequeños para ser filtrados, y su recuperación mediante centrifugación es muy cara. Se pueden obtener células o enzimas inmovilizados uniéndolos a polímeros solubles.

Los procesos con enzimas o células inmovilizadas son más fáciles de automatizar y permiten explotar las diversas ventajas que ofrece la configuración de un reactor, entre las que se incluyen el control rápido de pH y temperatura.

Frecuentemente la estabilidad de los enzimas o de las células aumenta por inmovilización y/o la concentración del enzima se eleva de forma que hay que emplear un reactor mucho más pequeño para conseguir la misma productividad cuando se usan biocatalizadores inmovilizados en vez de libres. La inmovilización hace que el enzima o la célula se distribuyan uniformemente por todo el reactor, asegurando así mismo el suministro de sustrato para cada enzima o célula.

Por último, una ventaja importante a la hora de usar células y enzimas inmovilizadas es que ambos están libres por el soporte frente a los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, etc. en el seno del solvente; lo que se manifiesta en el aumento de estabilidad. Comparativamente, las células son más fáciles de manejar, menos susceptibles a las contaminaciones microbianas y a la vez más fáciles de separar del producto; mejorando el rendimiento y la calidad del producto. Además las células inmovilizadas no se dividen y sólo requieren energía de mantenimiento. Los rendimientos del producto son mayores que en los métodos de fermentación con células libres. (Wiseman, 1978)

El uso de células inmovilizadas facilita el lograr las condiciones para que crezcan las células y se optimice la formación del producto ya que en estas etapas se llevan a cabo separadamente, mientras que las fermentaciones se producen simultáneamente o al menos se realizan en el mismo reactor de forma que las condiciones de operación son un compromiso entre los dos requerimientos. (Wiseman, 1991)

En una comparación económica entre la producción del agente saborizante por fermentación discontinua y por el uso continuo de enzimas inmovilizados en colágeno, se encontró que la inversión de capital total y los costos de operación fueron más bajos en la planta que trabajaba con células inmovilizadas. Este

método da como resultado un retorno del 50% del capital invertido frente al 36% obtenido en los procesos de fermentación (Ven Katasubramanian, et al 1978).

2.6.3 MÉTODOS GENERALES DE INMOVILIZACIÓN

Las células pueden inmovilizarse de la misma forma que los enzimas, aunque muchos de los métodos empleados con aquellos deben ser modificados y adaptados a la naturaleza de las células.

2.6.3.1 INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO

Este método se basa en la localización de una célula o un enzima dentro de la red espacial de una matriz polimérica o de una membrana de forma que se evite la liberación de la célula sin impedir la penetración de substrato ni la salida de producto (Wiseman, 1985).

El atrapamiento de la célula dentro de los espacios intersticiales de una matriz polimérica es uno de los principales métodos empleados. Entre los polímeros empleados se incluyen poliacrilamida (D'souza y Nadkarni, 1980), alginato (Paul y Vignais, 1980); (Larreta Garde et al., 1979) gel de sílice (Rouxhet et al., 1981) y la gelatina (Park et al., 1980). Las formas de atrapamiento son:

a) Atrapamiento en geles

Beinfeld y Wan (1963) lo usaron por vez primera. Este método se basa en la localización de células dentro de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados e insolubles en agua.

b) Atrapamiento en fibras

Este consiste en atrapar dentro de cavidades microscópicas de fibras sintéticas, de forma que las células pudieran quedarse atrapados, estas soportan medios ácidos y básicos débiles; fuerzas iónicas altas y algunos solventes orgánicos.

c) Atrapamiento en cápsulas (Microencapsulado)

Consiste en atrapar en membranas poliméricas semipermeables esféricas cuyos diámetros oscilan entre 1 y 100 μm de forma que estén contenidos físicamente dentro de la membrana y las moléculas del substrato y producto deben difundir libremente.

2.6.3.2 INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN

Este es un método antiguo y común de inmovilización y fue descubierto a comienzos del siglo XIX. La estabilidad operacional es muy alta. Aunque su uso es reducido a nivel comercial por problemas de costo.

a) Adsorción física

En estado natural, todas las células microbianas se encuentran adsorbidas a los suelos, a los sedimentos de los ríos, a la piel, etc. y tienen pues la propiedad de que se pueden unir a cualquier superficie con la que estén en contacto y, a la vez, hacer que esta superficie se active biológicamente. La adhesión de ciertos tipos de microorganismos puede atribuirse a la formación de “pies”, que se unen a la superficie en tanto que otros tipos de células tienen en las paredes capas delgadas de materiales adhesivos que son las que producen la adsorción. Para la inmovilización de células se usan materiales como intercambiadores de iones. (Hattori y Furusaka, 1961); (Gainer et al, 1981), cloruro de polivinilo (Holló et al, 1980) y astillas de madera (Mod-Young et al., 1979), carbón (Ngian y Martín, 1980) polipropileno (Hollo et al., 1979), y compuestos inorgánicos como vidrio (Rouxhet et al., 1981), cerámica (Messing et al., 1979), tierra de diatomeas (Grindbergs et al., 1977) y acero inoxidable (Atkinson et al., 1979)

b) Unión con metales o quelación

Algunas células se pueden inmovilizar mediante oxohidroxido de titanio (IV) (Kennedy et al., 1980) e hidróxido de Zirconio (Kennedy et al., 1976) o celulosa activada con oxido de titanio (Kennedy et al., 1980) que se han utilizado en fermentadores a escala de planta piloto. El método es suficiente suave para no

causar disrupción celular, y además se han demostrado que las células se unen firmemente.

b) Enlace covalente

Aunque este método es el más usado en la inmovilización de enzimas debido a que se obtienen materiales con estabilidades operacionales altas, no se utiliza mucho para la inmovilización de células por la toxicidad de los reactivos empleados, que en algunos casos pueden destruir tanto la actividad enzimática como la viabilidad de las células (Chiple, 1974) . En los casos en los que se obtengan células inmovilizadas activas viables el producto no experimenta ninguna limitación por problemas de difusión y el rezumado de células durante períodos largos de uso es mínimo.

2.6.3.3 INMOVILIZACION POR ENTRECruzAMIENTO

Este método, aunque relativamente suave, tiene el inconveniente de que la toxicidad de los reactivos bifuncionales utilizados para la inmovilización de enzimas es tal que la viabilidad de este método queda limitada severamente. El procedimiento se ha aplicado a células que catalizan una sola reacción. (Chivata et al., 1974) y el empleo de glutaraldehido, diaminas dioazotizadas y diisocianato de tolueno que reaccionan con los grupos amino libres de los peptidoglicanos de las paredes celulares. Las formas de entrecruzamiento son:

a) Entrecruzamiento puro

Este método es más suave y menos tóxico basado en el entrecruzado físico por floculación, que da lugar a una concentración elevada de células por unidad de volumen, empleando para ello varios agentes de floculación, entre los que se incluyen polielectrolitos catiónicos. como poliaminas, polietilenimina y poliacrilamidas polielectrolitos aniónicos como poliacrilaminas carboxil-substituidas, sulfonatos de poliestireno y ácidos policarboxílicos y sales metálicas como los óxidos, hidróxidos, sulfatas y fosfatos de Mg(II), Ca(II), y Fe (II).

b) Entrecruzamiento combinado

Es más frecuente su empleo al combinarse con otras técnicas de inmovilización, en el cual se logra un aumento sustancial en la estabilidad del catalizador. Por ejemplo el entrecruzado y atrapamiento se han utilizado en forma combinada para inmovilizar células mediante glutaraldehido y alginato o poliacrilamida.

2.7 BIORREACTORES

Un biorreactor, es básicamente, el recipiente en donde se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células libres o inmovilizadas. El papel que cumple el reactor es el de obtener un producto específico a una velocidad dada a

partir de unos reactantes concretos y con un costo mínimo. Los biorreactores se diferencian de los reactores químicos, en que trabajan a temperaturas y presiones bajas y comparativamente consumen o generan poca energía durante la reacción. (Wiseman, 1991).

Los biorreactores se clasifican en homogéneos, con una sola fase o heterogéneos si coexisten varias fases que frecuentemente hay un substrato líquido continuo y otro sólido inmovilizado que es la fase catalítica. También se clasifican según sea la reacción, en forma continua o discontinua y como reactores abiertos o cerrados. La clasificación más importante es la de mezcla alcanzada dentro del reactor, y así se habla de reactores de mezcla completa o de flujo pistón. En los reactores de mezcla completa las moléculas de reactante es la misma en cualquier punto del reactor, en cambio en los reactores de flujo pistón los elementos del fluido se mueven a través del reactor como si fueran un émbolo, sin mezclarse con los elementos del fluido previos, es decir, que la concentración de los elementos reactantes es diferente en cualquier punto del reactor. (Wiseman, 1991)

2.7.1 TIPOS DE BIORREACTORES

2.7.1.1 REACTORES DISCONTINUOS

Estos son llamados también reactores “por cargas”, son los más versátiles y tradicionales; resultan útiles cuando se emplean enzimas o células libres o

cuando se necesita poca cantidad de producto o bien de manera intermitente. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como que las condiciones tienden a variar durante toda la reacción dentro del reactor imposibilitando de volver a usar el enzima o microorganismo debido a echarse a perder parte de los mismos o correr el riesgo de contaminación en cada ciclo. (Wiseman, 1986). Los reactores discontinuos tienen las siguientes características:

- Presentan el agotamiento de un nutriente esencial o disminución de la concentración del sustrato.
- Desarrollan un pH desfavorable (en ausencia de una solución tampón) debido a que el microorganismo realiza todo su ciclo de vida.
- Acumulan un producto final de metabolismo, por presentar una reacción cerrada.

2.7.1.2 REACTORES CONTINUOS

Los reactores continuos se caracterizan porque se le suministra sustrato a la misma velocidad con que se evacua el contenido del reactor, es decir, no hay acumulación del producto dentro del reactor.

a) Reactores continuos del tipo tanque con agitación

Estos tipos de reactores son versátiles y baratos, y son particularmente usados en las reacciones de fase líquida. El volumen contenido dentro del reactor

esta tan bien mezclada que la concentración de los reactantes es uniforme en todo el recipiente de modo que el flujo de salida del reactor tiene la misma concentración que la mezcla que permanece en el tanque agitado.

Los reactores de tanque agitado se mantienen homogéneos mediante agitación mecánica que provoca una rápida dispersión y mezclado de los materiales inyectados, consiguiéndose una rápida transferencia de calor para mantener la temperatura, así como una rápida disolución de los gases burbujeados tales como el oxígeno. La eficiencia de tales procesos depende de la cantidad de energía que se transmite en el medio, y el agitador es en esencia el mecanismo que lo realiza. (Wiseman, 1986).

La conversión máxima obtenida en los reactores continuos del tipo tanque agitado es siempre inferior que los reactores discontinuos equivalente para un tiempo de residencia dado. La reacción es menos selectiva en un reactor agitado que en un reactor con flujo pistón debido a la buena mezcla. La suspensión celular es menos selectiva y más susceptible a la inhibición por el producto en el reactor con agitación y es más difícil obtener grados de conversión altos; sin embargo, al tener buen mezclado las reacciones de inhibición por sustrato son menores que en un reactor de flujo pistón. (Lilly y Sharp, 1968). Se puede conseguir un flujo semejante al flujo pistón con una mezcla óptima usando

un cierto número de reactores tipo tanque con agitación conectados en serie, aunque comparativamente más complicado y caro, debido a esto no se utiliza a gran escala (Garley—Sinith y Lilly, 1979).

b) Reactores en columna de flujo pistón

Estos reactores consisten en columnas rellenas con partículas de biocatalizador inmovilizado, y son más eficaces cinéticamente que los reactores con agitación cuando se comparan tomando como base la actividad volumétrica y además son simples y fáciles de manejar y automatizar. Su mejor aplicación es para uso continuo y a gran escala, lo que reduce la mano de obra y facilitan el control y obtención de productos de calidad más estable que los obtenidos en los procesos discontinuos tradicionales.

Las moléculas de producto o de inhibidores producidas durante la reacción van saliendo continuamente del reactor de forma que la concentración del producto sea mínima con lo que la inhibición es baja; sin embargo, están más expuestos a la inhibición por sustrato que los reactores continuos tipo tanque con agitación (Adachi et al., 1981)

Las operaciones con flujo ascendente tienen la ventaja de que el contacto de la partícula con el fluido es bueno y la caída de presión es mínima, mientras

que en el caso del flujo descendente la operación se realiza bajo presión atmosférica, controlándose fácilmente el flujo de fluido a través de una llave hidráulica situada encima del reactor. Cuando se utilizan células o enzimas inmovilizados como relleno de lechos se debe llegar a un compromiso entre el uso de partículas pequeñas partículas más grandes, con mayores restricciones difusionales y menores comprensibilidades. (Wiseman, 1991)

En los reactores de flujo pistón el sustrato pasa a través del lecho de células inmovilizadas y el producto se obtiene a la salida. El grado de conversión se controla regulando el tiempo de permanencia en el reactor, que a su vez viene dado por la velocidad del flujo del sustrato y el volumen del reactor.

2.8 Cinética de fermentaciones

El crecimiento de una población bacteriana puede ser representado por:

$$dX / dt = \mu x \quad (1)$$

Donde X (g/L) es la concentración celular y μ (h⁻¹) es velocidad específica de crecimiento siendo constante durante la fase de crecimiento exponencial (corresponde a la pendiente de la fase exponencial). El valor de μ depende del microorganismo y de los parámetros ambientales del cultivo. Entre éstos cabe mencionar la composición del medio de cultivo, la temperatura, pH, etc.

2.8.1 Cinética de fermentación discontinua

El efecto de la composición del medio de cultivo es cualitativo y cuantitativo. El efecto cuantitativo de la fuente de carbono y energía fue estudiado por (Monod, 1949) quien observó experimentalmente y propuso la siguiente ecuación:

$$U = U_{\text{máx.}} \frac{S}{K_S + S} \quad (2)$$

La ecuación (2) describe adecuadamente la cinética de fermentación en condiciones ambientales bajas de inhibición. Cuando existen altas concentraciones de un inhibidor (que puede ser el mismo sustrato o el producto), se tiene que utilizar otros modelos de crecimiento. En el caso de la fermentación alcohólica, la concentración de sustrato S y la concentración del producto P (etanol) son inhibidoras. La velocidad específica de crecimiento se puede representar:

$$U = U_{o1} [1 - P/P_{\text{max}}]^n \quad (3)$$

$$U = U_{o1} [1 - X/X_m]^m \quad (4)$$

Donde P_{max} es la concentración del producto donde el crecimiento celular podría parar y X_m es la concentración máxima celular bajo condiciones ideales de crecimiento. La ecuación final de crecimiento celular usada en fermentación alcohólica resulta de la combinación de las ecuaciones (1), (2), (3) y (4)

$$Dx = U_o [1 - X/X_m]^m [1 - P/P_m]^n \cdot S.X / (K_s \cdot S) \quad (5)$$

Teniendo en cuenta los coeficientes de rendimiento ($Y_{x/s}$ y $Y_{x/p}$), se puede determinar, la velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de formación del producto.

$$dS/dt = - 1/Y_{x/s} \cdot dX/dt \quad (6)$$

$$dP/dt = 1/Y_{x/p} \cdot dX/dt \quad (7)$$

2.8.2 Cinética de fermentación continua

Haciendo un balance a cualquier régimen en un reactor tipo tanque completamente agitado (CSTR), se obtiene:

Acumulación = Flujo de entrada - flujo de salida + generación

Balance de células

$$V(dX)/dt = F_0 X_0 - F.X + U. X. V \quad (8)$$

Balance del sustrato

$$Vd(S)/dt = F_0 S_0 - F.S - U \cdot X \cdot V / Y_{x/s} \quad (9)$$

Balance del producto

$$Vd(P)/dt = F_0 P_0 - F.P + U. X. V / Y_{p/s} \quad (10)$$

Donde V (l) es el volumen del fermentador, F es el caudal (l/h), y X, S y P son la concentración de células, sustrato y el producto respectivamente.

Cuando el reactor trabaja en estado estacionario y considerando que (F/V) es igual a la velocidad de dilución, D (h^{-1}), las ecuaciones (07), (08) y (09) se transforman:

$$U = D \quad (11)$$

$$X = Y_{x/s} \cdot (S_o - S) \quad (12)$$

$$P = Y_{p/s} \cdot (S_o - S) \quad (13)$$

La ecuación (11) significa que el estado fisiológico de las levaduras se puede determinar por medio de la velocidad de dilución (D), en otras palabras por el caudal de alimentación del sustrato. La ecuación (12) y (13) permite calcular la concentración celular y la concentración del producto respectivamente.

De la ecuación (1) y (11) se puede obtener la velocidad de dilución como una función de la concentración celular, la concentración del sustrato y la concentración del producto:

$$D = U_{\text{máx}} \cdot [1 - P/P_m]^n \cdot [1 - X/X_m]^m \cdot S \cdot X / (X - X_o)(K_s + S) \quad (14)$$

2.8.3. Fermentación continua usando células inmovilizadas

Para Chibata (1978), los reactores de lecho fluidizados son los más usados para enzimas o células inmovilizadas, pudiendo ser de flujo ascendente o descendente. Una manera práctica de combinar las facilidades de construcción de

un biorreactor tubular con las ventajas operacionales de un reactor de mezcla completa, consiste en un reactor tubular con reciclo o externo, operando a altas tasas de reciclo, de esta forma, el reactor tubular se comporta como un reactor de mezcla completa, manteniendo condiciones de concentración prácticamente iguales en todas las secciones del reactor y también tiende a eliminar el gradiente de concentración externo al soporte conteniendo el catalizador inmovilizado. La velocidad de reacción en este tipo de reactores puede ser descrita como:

$$r_{obs} = \frac{Q \cdot (S_o - S_f)}{V_s} \quad (15)$$

Donde:

r_{obs} = Velocidad de reacción con células inmovilizadas

V_s = Volumen de soporte

Q = Caudal de alimentación del sustrato

S_o = Concentración de sustrato en la entrada

S_f = Concentración de sustrato en la salida del reactor.

2.8.4 Cinética del fermentador continuo de flujo pistón.

El rendimiento de un fermentador puede predecirse al conocerse las características cinéticas de los componentes reaccionantes y sus restricciones externas por la configuración del fermentador.

El diseño del fermentador hace uso de la ecuación que expresan balances de materia, desde el punto de partida de la ley de conservación de materia.

Balance global de la materia:

Si el espacio considerado es el volumen completo del fermentador entonces se trata de un balance global de materia que es estado estacionario conduce a una ecuación:

| | | |
|--|---|--|
| Diferencia entre la velocidad De flujo del reactante a la Entrada y salida del fermentador | = | Velocidad de pérdida de reactante como resultado de la reacción. |
| $F_{Si} - F_{So}$ | = | $V \cdot \Delta V_R$ (16) |

Balance diferencial de materia:

El fermentador tubular de flujo pistón se caracteriza porque todos los elementos del fluido tienen la misma velocidad y un gradiente de concentración solo en la dirección del flujo que es representado por la ecuación:

| | | |
|--|---|---|
| Suma algebraica de las Diferencias en la velocidad De flujo del reactante a través De las superficies de un elemento de fluido | = | Velocidad de pérdida de reactante como resultado de la reacción dentro del elemento de fluido. |
| $F \cdot Si z - F_{So} z + \Delta Z$ | = | $V \cdot \Delta V' R$ (17) |

El balance en el que se igualan el flujo por convección del componente reactivo y la velocidad de eliminación por la reacción, conduce a:

$$\int_{S_i}^{S_o} \left(-\frac{ds}{R_v} \right) = \frac{Z}{F} \quad (19)$$

Donde S_i y S_o son concentraciones de sustrato a la entrada y salida, Z es la longitud del fermentador y R_v esta relacionada linealmente con S con una reacción de primer orden como ($R_v = KS$).

Al final la ecuación (19) puede presentarse como:

$$S_o = S_i e^{(-K.Z/F)} = S_i e^{-KT} \quad (20)$$

Donde $T = Z/F$ es el tiempo de resistencia en el fermentador de flujo. La concentración S_o se interpreta como la concentración en cualquier punto Z del fermentador (Illanes, 1994), (Atkinson, 1986).

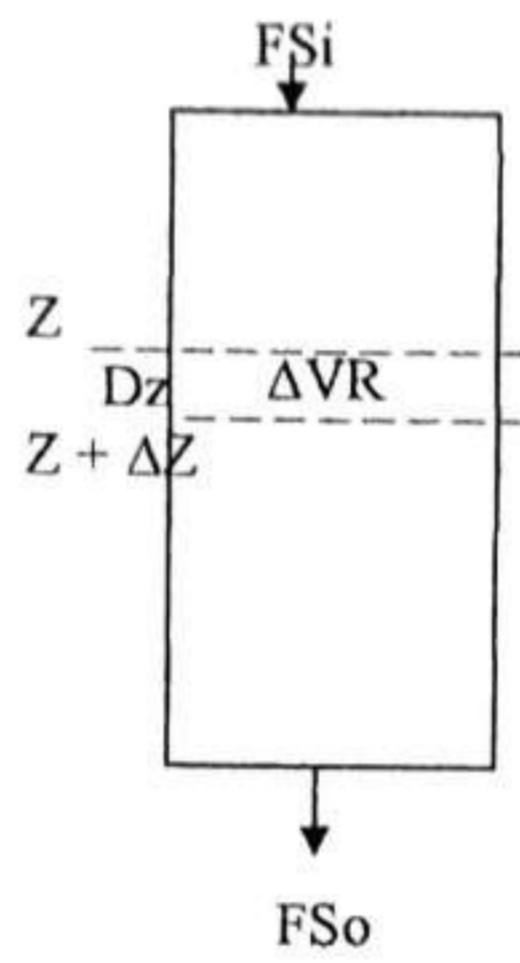


Figura 1: Balance diferencial de materia aplicado a un fermentador de Flujo pistón.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento e Identificación de levaduras

3.1.1 Aislamiento de levaduras

Se realizó un aislamiento a partir de una muestra comercial de levadura de panificación “Fleishman” que fue sembrada por estrías en agar Sabouraud, y se llevó a incubación a 30°C durante 24 horas. Las colonias típicas de levadura que se desarrollaron luego de la incubación, se replicaron nuevamente en una placa Petri con agar Sabouraud, después de esto, las colonias se incubaron y guardaron en tubos de ensayo con tapa rosca a 4°C para su identificación.

3.1.2 Identificación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El proceso de identificación se realizó estudiando el aspecto de colonia, de célula y bioquímico. El estudio de las colonias en agar Sabouraud se realizó analizando sus características de desarrollo luego de incubado a una temperatura de 30°C; estudiando el tamaño, la forma, el borde, la superficie, la elevación *la* consistencia y el color de las colonias. El estudio celular se hizo por observación en fresco de las colonias almacenadas en los viales. Este proceso se realizó retirando una asada de la colonia que se colocó después entre lámina y laminilla

con una gota de agua destilada. La observación se realizó en un microscopio compuesto a 400 aumentos con el cual se estudió la forma celular de la levadura.

En cuanto al estudio bioquímico de las levaduras, se utilizó el método de fermentación de carbohidratos, el cual consistió en sembrar las colonias de levaduras en cuatro tubos de ensayo conteniendo un medio de solución fermentadora, y luego se fermentaron los azúcares de lactosa, maltosa, sacarosa y glucosa. La evaluación se realizó luego de 24 horas de incubación a 30°C.

3.2 Determinación del crecimiento de levaduras.

El crecimiento de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la forma libre e inmobilizada en alginato de calcio se realizó en un reactor discontinuo con adición de oxígeno y agitación constante.

3.2.1 Crecimiento de levaduras libres

Se realizó activando el inóculo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en un medio líquido caldo sacarosa. Luego de activado el inóculo se procedió a depositarlo en el reactor discontinuo, conteniendo el medio de propagación de caldo sacarosado (sacarosa 60g/l, urea 3 g/l, infusión de papa 4 g/l, preparado a partir de 200 g de papa en un litro de agua destilada en ebullición y todo esto con un pH de 4,6). El reactor cargado con células de levadura y sustrato se le incubó a

30°C con una agitación y aireación constante por medio de un agitador magnético y una bomba peristáltica de oxígeno respectivamente. La toma de muestra se realizó cada dos horas, evaluándose con el método del conteo directo (número de levaduras/ml) con el uso de una cámara de Neubauer.

3.2.2 Crecimiento de levaduras inmovilizadas

Se evaluó el crecimiento de las levaduras inmovilizadas en alginato de calcio. Se colocaron 250 ml de células inmovilizadas en el reactor discontinuo con un (medio de propagación) de 500 ml. Luego se incubó a 30°C con agitación y aireación constante. El crecimiento se evaluó cada 24 horas utilizando el método del conteo directo previa disolución de las esferas en una solución de citrato de sodio al 1%. Las levaduras de las esferas disueltas se llevaron a la cámara Neubauer para su conteo y determinación del N° de levaduras/ml.

3.3 Producción de biomasa de levaduras

La producción de levaduras se hizo a través de un reactor discontinuo, utilizando como medio de propagación el caldo sacarosado al 6%, previo a la inoculación de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevistae* se sembró en un matraz conteniendo 100 ml de medio de cultivo a 30°C por 24 horas, para luego trasvasarlo al biorreactor discontinuo de 1 litro de capacidad con aireación y agitación constante. Se cosecharon las levaduras cuando la fermentación estuvo en

su crecimiento exponencial máximo, para después llevarlo a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, desechando el sobrenadante, lavando el sedimento tres veces con una solución de NaCl al 0,9% los cuales se centrifugaron nuevamente y las levaduras obtenidas se almacenaron a 4^oC en buffer acetato al 0.1 M con un pH de 4,5 para su conservación.

3.4 Inmovilización celular

El proceso de inmovilización de células de levaduras se realizó utilizando el método de atrapado en gel usando como soporte el alginato de sodio, en donde las células quedaron inmersos en la matriz del soporte. La inmovilización se realizó disolviendo 7,5% de alginato de sodio, en un vaso de precipitado con 200 mL de agua destilada en ebullición y luego de homogenizado el alginato se dejó enfriar hasta una temperatura de 40^oC.

En un beaker se disolvió 9% de levaduras, en 100 de agua destilada, al cual se llevó a baño maría hasta una temperatura de 40^oC. Se mezclaron ambas soluciones, vertiendo la solución de levaduras en el vaso de precipitación que contiene la solución de alginato de sodio y con una bagueta se homogenizó las soluciones, manteniendo a una temperatura de 40^oC en baño maría durante todo el proceso. Con una jeringa de vidrio de 25 ml de capacidad y una aguja N^o 21 (al cual se le acorto el largo de la aguja) se hizo gotear la solución levaduras-alginato

sobre una solución fría 300 mL de CaCl_2 al 1,5% en constante agitación. Las esferas producidas se almacenaron a 4°C con la solución de CaCl_2 al 1.5 % durante dos horas para darle mayor consistencia a las esferas luego se lavó con agua destilada y se almacenó a 4°C en buffer acetato con un pH de 4,5.

3.4.1 Determinación de células viables y no viables

Esta determinación se realizó haciendo gotear cinco esferas de solución levaduras-alginato en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de solución citrato de sodio. Se tapó y agitó el tubo de ensayo durante 10 minutos para disolver las esferas. El conteo de las células se hizo en cámara de Neubauer a través de un microscopio compuesto a 400 aumentos, agregándose el colorante azul de metileno, en la que se observó células viables no coloreadas y no viables coloreadas de azul de metileno.

3.4.2 Determinación del volumen y diámetro de esfera

Se tomó una muestra de esferas de biocatalizador y se agregó a una probeta, de 10 ml de capacidad, con 5 mL de agua destilada, el cual hizo desplazar un volumen de 5ml. Luego se retiró y contó el total de esferas. Realizando los cálculos se obtuvo el volumen promedio de cada uno. Y con este volumen se determinó el diámetro de esfera, haciendo uso de la ecuación de volumen de

esfera $V_e = \frac{4}{3} \pi r^3$ según el anexo de "determinación del volumen y

diámetro". Este volumen y diámetro de esfera se determinó en trabajos preliminares con diferentes diámetros de aguja.

3.5 Determinación de la curva patrón de levaduras de relación peso: densidad óptica y peso: N° células.

Se tomo 15 ml de solución de levaduras almacenadas a 40°C y se agregó en un tubo de ensayo. Luego se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se desecho el sobrenadante realizando tres lavados posteriores con agua destilada, resuspendiendo, centrifugado y eliminando el sobrenadante; las células obtenidas se trasvasaron a un recipiente de papel aluminio seco y pesado. Esta masa se llevó a secar en un horno a 100°C durante 8 horas hasta obtener un peso constante. Para elaborar la curva de patrón se procedió de dos maneras. La primera por concentración celular midiendo la densidad óptica y la segunda por el método del recuento celular en cámara Neubauer.

3.5.1 Determinación de la concentración celular por medición de la densidad óptica.

Con las levaduras secas se preparó patrones de concentración celular, pesando las levaduras y preparando diluciones de tal manera que las lecturas de absorbancia estén entre un rango de 0.1 a 0.7. Luego los tubos con las diluciones de levaduras se llevaron al espectrofotómetro y se realizaron las lecturas a 650 nm

evitando problemas de decantación. Con los datos obtenidos de concentración celular y absorbancia se elaboró la curva de calibración:

$$\text{Absorbancia} = a + b \cdot \text{levadura (g/L)}$$

3.5.2 Determinación de la concentración de levaduras por el método del recuento celular.

Paralelamente a las lecturas de absorbancia, de los tubos de ensayo y se retiraron muestras con una pipeta Pasteur para depositarla en una cámara Neubauer. Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto a 400 aumentos. Con las lecturas del recuento celular y los datos de absorbancia se realizó la curva de calibración.

$$\text{Absorbancia} = a + b \cdot \text{levadura (lev/ml)}$$

3.6 Determinación de la curva patrón de glucosa (AR)

Se preparó una solución patrón de glucosa al 1% y a partir de ésta, se hizo diluciones (0.2 , 0.4, 0.6 y 0.8 g/l). Se tomó 1 ml de las diluciones, al cual se le agregó 1 ml de reactivo 3,5-dinitrosalicilato (DNS). Se tapó los tubos, agitó y llevo la mezcla a ebullición durante 5 minutos, luego se enfrió rápidamente en baño de hielo y se agregó 10 ml de agua destilada. Paralelamente a este proceso se preparó un blanco que contiene 1 ml de agua destilada y 1 ml de DNS y se siguió el mismo proceso. Se dejaron en reposo 20 minutos y se hizo las lecturas de absorbancia a 540 nm, tomando como referencia el blanco. Se relacionó la

concentración de azúcar en función de la absorbancia para obtener la ecuación:

$$\text{Absorbancia} = a + b * \text{glucosa (g/L)}$$

3.7. Determinación de la curva patrón de azúcares reductores (ART)

Para determinar ART primero se realizó la inversión de la sacarosa en azúcares reductores por hidrólisis ácida. Se mezcló en un tubo con tapa rosca 1 ml de las diluciones (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 g/l de sacarosa) a partir de una solución patrón de sacarosa al 3%, con 1 ml de HCl 2N, y se llevó a ebullición durante 5 minutos, al término de esto se enfrió en baño de hielo, al cual se añadió 1 ml de NaOH 2N para neutralizar el ácido. Del tubo neutralizado se cogió 1 ml de muestra en un tubo con tapa rosca y se agregó 1 ml de DNS por las paredes del tubo, se tapó, agito y calentó a temperatura de ebullición durante 5 minutos al cual se le enfrió en baño de hielo y se agregó 10 ml de agua destilada. Paralelo a este proceso se preparó *un* tubo de ensayo (blanco) conteniendo 1 ml de agua destilada y se siguió el mismo tratamiento.

Se realizó las lecturas de absorbancia al cabo de 20 minutos en un espectrofotómetro a 540 nm, tomando como referencia el blanco. Se relacionó la concentración del azúcar en función de la absorbancia para obtener la ecuación.

$$\text{Absorbancia} = a + b * \text{Azúcares reductores (g/l)}$$

3.8 Proceso de producción de etanol

3.8.1 Esterilización del reactor y del medio de fermentación

Para cada proceso de fermentación de etanol se realizó una esterilización del reactor con una solución de hipoclorito de sodio al 5% con posteriores lavados con agua destilada. El medio de fermentación (Sacarosa, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y KH_2PO_4) se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C.

3.8.2 Fermentación discontinua

Para iniciar la fermentación primero se cargó el reactor con 300 ml del medio de fermentación y luego se adicionó por la parte superior 300 ml de esferas del biocatalizador (esferas de alginato de calcio conteniendo levaduras) retenidas por un filtro (perlas de vidrio) ubicado en el extremo inferior del reactor. La fermentación discontinua se inició a los pocos minutos con gran desprendimiento de CO_2 . En este momento se dio por terminado el tiempo de inducción o activación, para posteriormente pasar a la fermentación continua.

3.8.3 Fermentación continúa

Se inició la alimentación continua del medio de fermentación en forma descendente. La salida del producto se realizó por rebose en forma continua, transformándose de esta manera la fermentación discontinua en fermentación continua. Cuando la concentración del producto o la concentración de la sacarosa

remanente permanecen constantes se llega al estado estacionario y en este momento se tomó una muestra para determinar la concentración de etanol por el método del picnómetro.

3.8.4 Control de la temperatura

El control de la temperatura en el reactor durante el proceso de fermentación se realizó por recirculación de un flujo de 5 litros de agua caliente/por minuto a través de la chaqueta del reactor proveniente del ultratermostato.

3.8.5 Control de pH

Se reguló el pH del medio de fermentación antes de ingresar al reactor con una solución de buffer acetato. Esta solución buffer mantiene invariable el pH durante todo el proceso de producción continua de etanol.

3.8.6 Producción de etanol

La producción de etanol por fermentación continua con células inmovilizadas, se realizó haciendo circular un flujo de medio de fermentación a través de un lecho del biocatalizador (esferas con levaduras inmovilizadas). En el cual, el sustrato tuvo que difundirse hacia el interior de las esferas y de las levaduras, produciéndose la transformación del azúcar en etanol, que luego tiene

se difundió hacia el medio de fermentación. La producción de etanol se realizó variando la concentración de sacarosa (S), la temperatura (T) y el pH mediante un diseño experimental, manteniendo constante el tiempo de residencia hidráulico de 8.33 horas y el volumen de 300 mL de levaduras inmovilizadas al 3%..

3.9. Determinación de la concentración de etanol

Se tomó una muestra de 30 ml de la corriente de salida del reactor en cada experimento del diseño experimental y se determinó la concentración del producto por el método del picnómetro.

3.9.1 Método del picnómetro

Se llenó el picnómetro de 25 ml de capacidad con la muestra (producto de la fermentación continua) y luego se agregó a un balón de destilación de 100 ml. de capacidad. Se realizó tres lavados del picnómetro con un total de 12.5 ml de agua destilada y se agregó al balón hasta hacer un total de 37.5. Este balón se llevo a destilar hasta obtener unos 22.5 ml en el picnómetro y se completo con agua destilada mezclándolos, y se llevó a baño maría a una temperatura de 20°C durante 30 minutos, al término de esto se seco y pesó en una balanza con cuatro decimales. Obteniendo el peso en gramos (m1), éste valor se lleva a la ecuación

de: $d = \frac{m1 - m}{m2 - m}$, donde m es picnómetro vacío, m1 es picnómetro con el

destilado y m2 es picnómetro con agua.

Y a partir de este resultado como densidad, se determinó la concentración de etanol en gramos por litro, según el anexo de “determinación del contenido de etanol”.

3.10. Diseño experimental y análisis estadístico

Para la producción continua de etanol con células inmovilizadas, se realizó un planeamiento factorial de 2^3 con 8 experimentos y tres puntos centrales, estudiando 3 variables: Concentración de sacarosa (X_1), pH (X_2) y Temperatura (X_3) con el objetivo de Obtener etanol (Y) en fermentación continua, utilizando levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en gel de alginato de calcio. Las variables se estudiaron a dos niveles codificadas como -1 y +1.

Cuadro 1. Variables y niveles de variación del planeamiento experimental

| Variables | Codificada | Real | Nivel (-) | Nivel (+) |
|-------------------|------------|------|-----------|-----------|
| [Sacarosa] (g/l.) | X_1 | S | 100 | 200 |
| pH | X_2 | pH | 3.6 | 5.6 |
| Temperatura (°C) | X_3 | T | 25 | 35 |

Se tuvo como niveles centrales de concentración de sustrato, pH y temperatura a los valores de 150 g/l, 4,6 y 30°C respectivamente. Los parámetros

máximos y mínimos de cada variable independiente se escogieron dentro de las posibilidades operacionales del proceso.

3.11 Diseño del reactor de lecho fijo

Para el presente trabajo se diseñó y construyó un reactor de vidrio borosilicatado con los siguientes características.

Cuadro 2: Características del reactor continuo de lecho fijo tipo columna.

| Características | Diámetro (cm) | Altura (cm) | Área (cm ²) | Volumen (cm ³) |
|-----------------|---------------|-------------|-------------------------|----------------------------|
| Reactor | 3 | 120 | 7,854 | 943 |
| Chaqueta | 5 | 120 | 11,78 | 1414 |

Este reactor esta provisto con una chaqueta por el cual puede circular agua caliente o fría con un caudal de 5,7 l/min y que tuvo por finalidad mantener el medio de fermentación a la temperatura deseada.

3.12 Determinación de los parámetros cinéticos de la fermentación en el reactor continuo.

a) **Tiempo de residencia hidráulica:** Este parámetro indica el tiempo requerido por el sustrato, para transformarse en producto (por las celular inmovilizadas) antes de abandonar el reactor. Este tiempo se determino en base al flujo de alimentación y al volumen del reactor de 600 ml.

b) **Cinética de la fermentación:** Para determinar la cinéticas, se tomo en cuenta principalmente el sustrato reactante tiene una misma velocidad y un gradiente de concentración solo en dirección del flujo descendente a través de la longitud del reactor conteniendo las células inmovilizadas. Se tomo como dato de concentracion de sustrato inicial y final a través del método del DNS en el proceso de fermentación de etanol, tomando en cuenta el tiempo de residencia hidráulica se elaboro la ecuación de sustrato en función del tiempo en el reactor continuo de lecho fijo.

3.13 Establecimiento de la mejor producción de etanol

Tomando como referencia los datos de producción de etanol, obtenidos según el diseño experimental y luego a través de análisis de variables y sus interacciones mas importantes: mediante el diagrama de Pareto, diagrama de efecto de variables y el análisis de superficie de respuesta se determino el modelo de la mejor producción de etanol.

IV. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de: Concentración como producto de la fermentación de etanol a través del diseño experimental, parámetros cinéticos de la fermentación y el establecimiento del mejor rendimiento con el uso de un análisis estadístico.

4.1 Concentración de etanol.

El siguiente cuadro presenta los resultados del proceso de fermentación continua establecido según el diseño experimental, teniendo como valores máximos de concentración de etanol de 14.40 g/L y 10.10 g/L cuando se trabajo con variables de 100 g/L de sacarosa, 25 °C de temperatura y con pH de 3,6 y 5,6 respectivamente.

Cuadro 3. Producción de etanol a diferentes concentraciones de sustrato, pH y temperatura por fermentación continua de *S. cerevisiae* inmovilizado en gel de alginato de calcio.

| Experimento | Sustrato (g/l) | pH | Temperatura (°C) | Etanol (g/l) |
|-------------|----------------|-----|------------------|--------------|
| 1 | 100 | 3.6 | 25 | 14.40 |
| 2 | 200 | 3.6 | 25 | 8.50 |
| 3 | 100 | 5.6 | 25 | 10.10 |
| 4 | 200 | 5.6 | 25 | 5.80 |
| 5 | 100 | 3.6 | 35 | 6.40 |
| 6 | 200 | 3.6 | 35 | 3.70 |
| 7 | 100 | 5.6 | 35 | 4.20 |
| 8 | 200 | 5.6 | 35 | 3.20 |
| 9 | 150 | 4.6 | 30 | 8.80 |
| 10 | 150 | 4.6 | 30 | 9.30 |
| 11 | 150 | 4.6 | 30 | 8.30 |

4.2 Parámetros cinéticos de la fermentación en el reactor continuo.

El tiempo de residencia en la producción de etanol con células inmovilizadas usando un reactor continuo se obtuvo en base al flujo de sustrato de 72 ml/h, y al volumen del reactor de 600 ml el cual fue 8,33 horas el tiempo de residencia hidráulica.

La cinética de la fermentación continua, realizado en el fermentador de forma tubular, obtenido a través de un balance diferencial de materia (concentración de sacarosa) se muestra en la figura 1 donde la ecuación $S_0 = 147,9 e^{-0.02244t}$ representa la concentración de sustrato reactante puntual en el fermentador dependiendo del tiempo de residencia requerido.

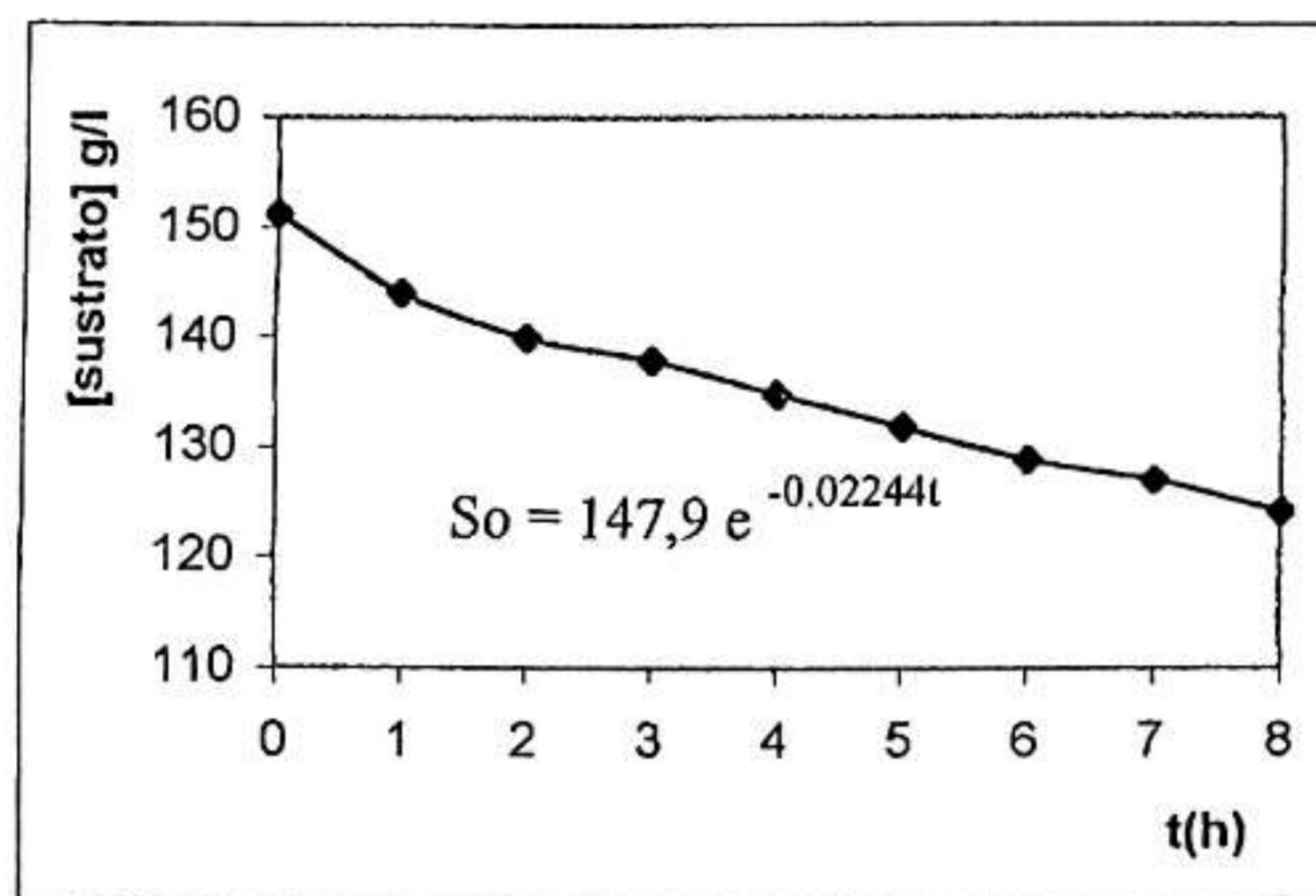


Figura 2: Cinética de fermentación del sustrato.

4.3 Producción de etanol.

El efecto de las variables y sus interacciones que influyeron en el proceso de fermentación continua de etanol así como la mejor producción de etanol estadísticamente bajo un modelo matemático en análisis computacional se tiene en las figuras 2-5 y cuadro 4.

4.3.1 Efecto de las variables estudiadas según el gráfico estandarizado de Pareto.

La importancia relativa de cada uno de las variables se puede observar

mediante el diagrama de Pareto, el cual representa gráficamente los efectos estandarizados de las variables y sus interacciones. Según este diagrama nos muestra los efectos principales sobre la producción de etanol en forma gráfica, indicándonos que el mayor efecto lo tiene la temperatura seguido de la concentración de sustrato y luego del pH y sus interacciones. En cuanto a la línea vertical nos indica que los efectos de temperatura y concentración de sustrato son significativos estadísticamente.

GRAFICO ESTANDARIZADO DE PARETO PARA EL ETANOL

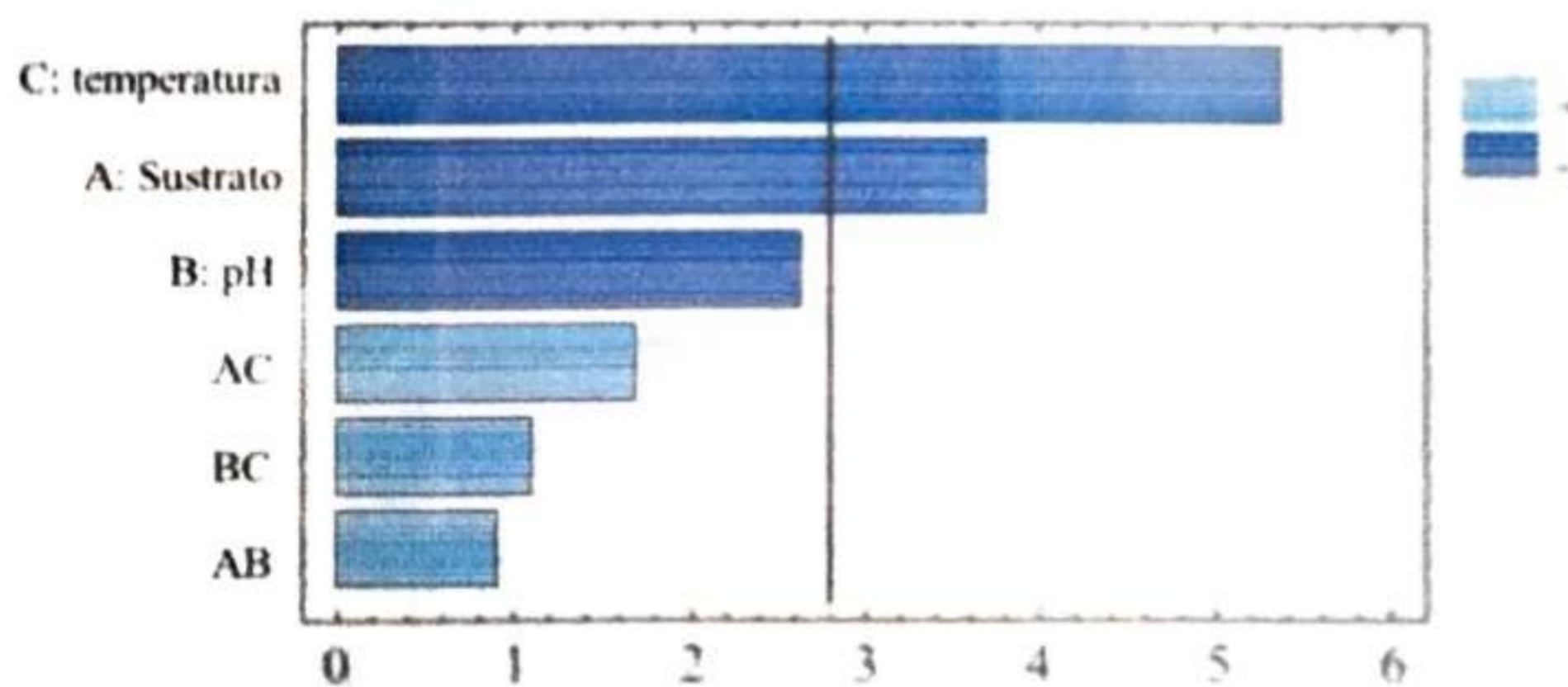


Figura 3: Efectos de las variables y su interacción en la producción de etanol.

4.3.2 Efecto de las variables estudiadas en la producción de etanol según el gráfico de líneas:

En la figura 4 se presentan gráficamente líneas con pendientes negativas

de los factores de sustrato, pH y temperatura, es decir los tres factores presentan efectos en el proceso, sin embargo estos efectos son negativos e la producción de etanol. En cuanto a la presencia de líneas paralelas indican la ausencia de la interacción de las variables.

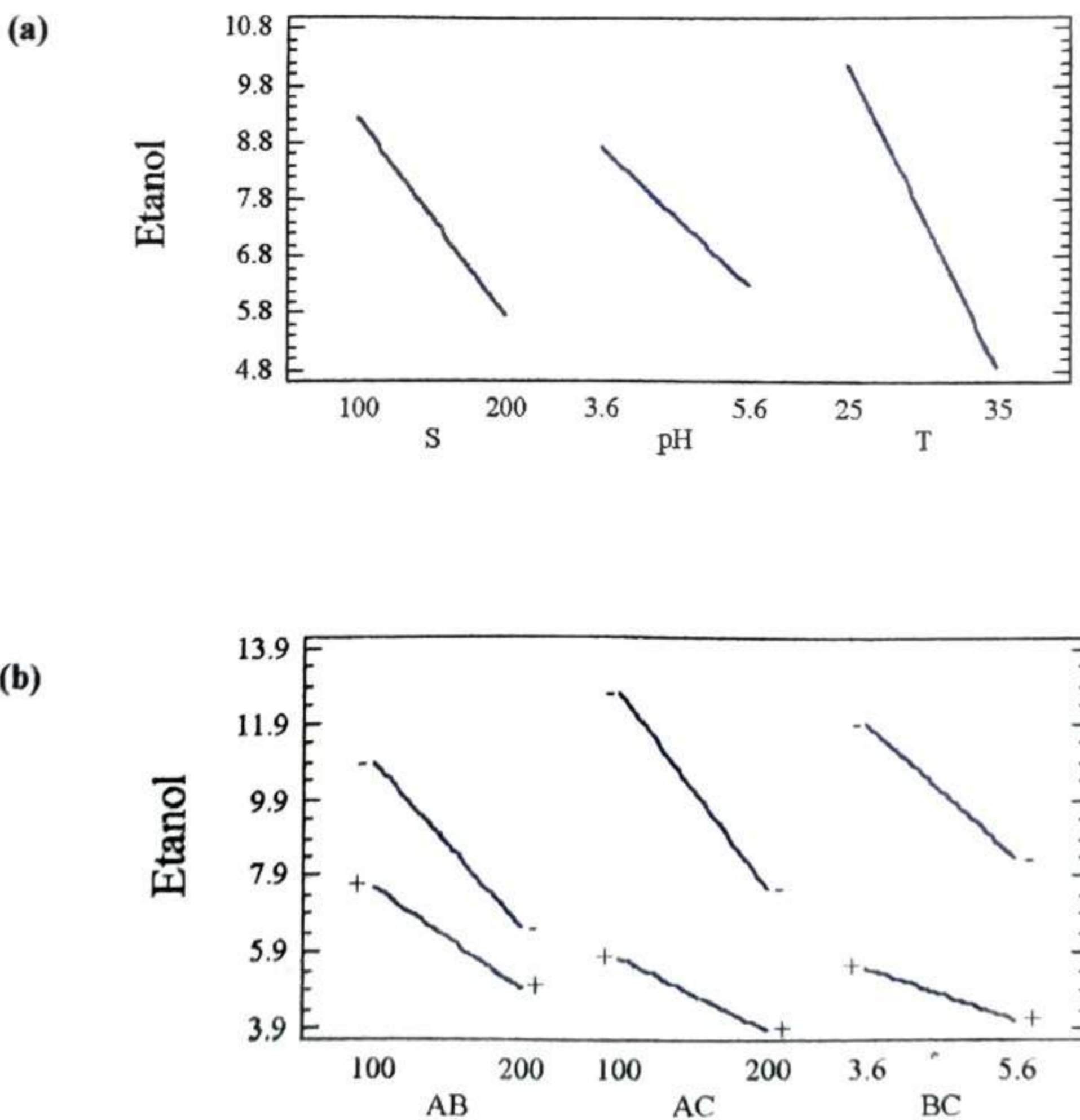


Figura 4: Efectos: (a) de las variables; (b) interacción de las mismas para la producción de etanol.

4.3.3 Efecto de las variables estudiadas según el análisis de superficie de respuesta:

El gráfico de la figura 5, muestra el efecto de las variables de sustrato, pH y temperatura sobre la concentración de etanol en forma cúbica (en superficie de respuesta) y en forma cuadrática (en líneas de contorno).

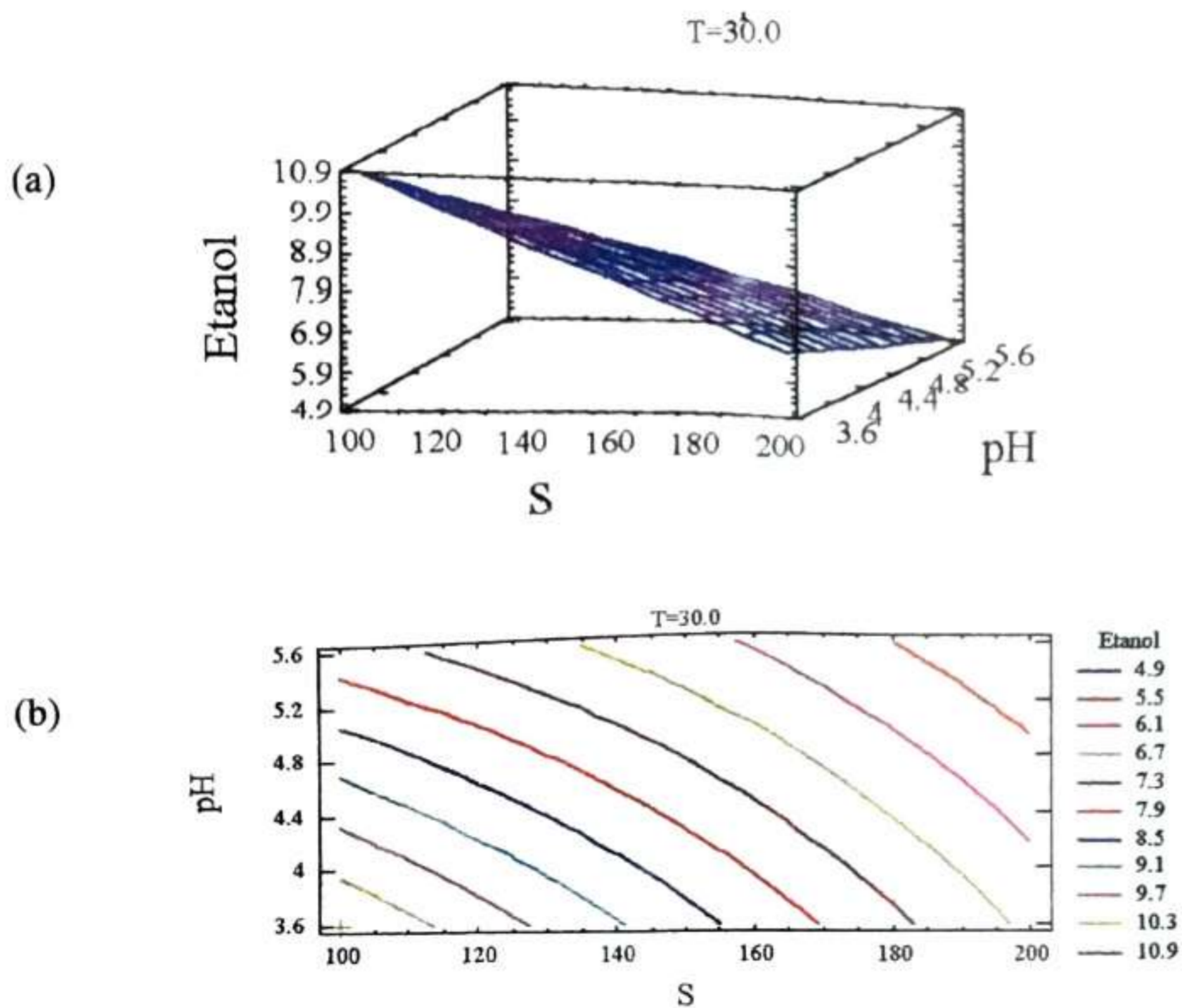


Figura 5: Gráficos de: (a) Superficie de respuesta y (b) Líneas de contorno de las variables estudiadas para la producción de etanol.

4.3.4 Modelo matemático que representa a la experimentación de fermentación continua.

En base a los análisis estadísticos realizados se determinó el modelo matemático de la mejor producción de etanol que representa la fermentación continua en el experimento, realizado computacionalmente (Statgraphics)

$$[\text{etanol}] \text{ g/l} = 69.4 - 0.17A - 5.675B - 1.5C + 8.25 \times 10^{-3}AB + 3.25 \times 10^{-3}AC + 0.11BC$$

4.3.5. Producción máxima de etanol

En base a la aplicación del modelo matemático encontrado para la experimentación se obtuvo la máxima producción de etanol.

Cuadro 4: Producción máxima de etanol aplicando el modelo matemático que representa la fermentación continua de etanol

| Variables Independientes | | | Variable Dependiente |
|--------------------------|-----|------------------|----------------------|
| Sustrato (g/l) | pH | Temperatura (oC) | Etanol (g/l) |
| 100 | 3.6 | 25 | 14.8932 |

V. DISCUSIÓN

En los resultados de concentración de etanol, obtenidos en el cuadro 3 según el diseño experimental, se observa que las mayores concentraciones de etanol fueron de 14,40 g/l y 10,10 g/l en las cuales se utilizó las variables de concentración de sacarosa de 100 g/l, pH₁ 3,6 y pH 5,6 y menores se obtuvieron 3,70 g/l y 3,20 g/l, estos al usar variables con valores de concentración de sacarosa de 200 g/l, pH₆ de 3,6 y pH₈ de 5,6 y con una temperatura de 35°C. Evaluando estos resultados con el análisis de varianza (ver anexo), se determinó que existe influencia de las variables de concentración de sacarosa y de temperatura. A concentraciones de 200 g/l de sacarosa y 35°C de temperatura, el biocatalizador tiende a disminuir la producción del contenido alcohólico en el producto.

La inhibición por sustrato es muy frecuente en este tipo de biorreactores como es el reactor tubular de flujo pistón, el cual al ingresar no se distribuye homogéneamente en todo el biorreactor sino que se difunde lentamente y los biocatalizadores inmovilizados que reaccionan primero sufren a través de un gradiente de concentración descendente estas concentraciones elevadas de sustrato y no así las últimas que reaccionan con una concentración de sustrato disminuido (Atkinson, 1986).

A temperaturas elevadas las células de levaduras inmovilizadas tienden a inactivarse, esta inactivación aumenta cuando también se eleva la temperatura (Wiseman, 1991). La fermentación continua a pH que se estableció por un buffer con un rango de 3,6 y 5,6 no causó mayor variación.

Al evaluar el análisis de varianza (ver anexo) se observó que existe diferencias significativas en los tratamiento con sustrato (sacarosa) y temperatura, teniendo como F. Exp. 13,27 y 31,16 respectivamente que son valores mayores a la F. tabular de 7,71 con un 95% de confianza, así mismo esto no sucedió con el pH el cual presento una F. experimental de 6,46 que es menor a la F. tabular indicando así que no existe diferencia significativa utilizando esta variable con un 95% de confianza, es decir que no hay mayor efecto usando pH mayor o menor. Esta afirmación se puede corroborar con el grafico estandarizado de Pareto que indica que el proceso es afectado mayormente por la variable temperatura seguida por la variable sustrato siendo el pH y las interacciones de las variables no significativas. Y así como también en la figura 3 de efectos de las variables en la producción de etanol, en el grafico de líneas indica que las variables presentan un efecto negativo, es decir que a valores elevados la producción de etanol de etanol disminuye.

El empleo del reactor continuo de lecho fijo para la fermentación de etanol el cual presentó parámetros de control durante todo el proceso con un flujo de 72 ml/h, el cual al recorrer un volumen de 600 ml, con un tiempo de residencia de 8,33 horas, En este fermentador para el presente trabajo, con las condiciones de variables establecidas obtuvo una disminución en la producción esperada por diferentes causas como ser las restricciones disfuncionales externas e internas, la concentración de levaduras inmovilizadas, el tiempo de residencia empleado y los requerimientos de sustrato como medio de mantenimiento.

Las R.D. externas en las reacciones con fase heterogénea como en el presente trabajo comprendió los pasos de transporte del sustrato desde el seno del líquido a la superficie del biocatalizador, estas R.D. externas son consideradas por estas en un medio en constante movimiento hacia una dirección descendente y las R.D. internas en este caso son importantes debido a que el sustrato que está en la superficie del biocatalizador se dirige al interior del soporte y de allí a las células de levaduras, donde se produce la reacción bioquímica para transformar el sustrato (sacarosa) en etanol y CO₂.

Esta producción de etanol también puede variar según el tiempo de residencia es decir que a menor tiempo de residencia la difusión del sustrato a

través del biocatalizador es deficiente. Sin embargo si el TRH fuera mayor, el contacto y reacción del sustrato con las células dentro del biocatalizador también sería mayor dando como resultado una mayor concentración del producto etanol.

La concentración de levaduras inmovilizadas fue muy importante en la producción de etanol, a mayores concentraciones de levaduras se eleva la concentración de etanol, sin embargo en el presente trabajo se observa que la concentración del 3% de levaduras inmovilizadas en gel de alginato de calcio, se obtuvo una concentración de 14.40 g/l de etanol. Este valor se puede mejorar analizando el adecuado requerimiento de sustrato que contenga nitrógeno como medio de mantenimiento, para que así las levaduras inmovilizadas tengan una óptima producción o en su defecto por la falta del medio de mantenimiento, las levaduras sufrirían un estrés disminuyendo así la producción de etanol. Otra forma en que se puede disminuir es por problemas de arrastre de las células inmovilizadas, que se ubicaron en la superficie del soporte esférico del biocatalizador.

Según el análisis de superficie de respuesta que se presenta en la figura 4 el cual muestra que hay efecto de las variables en la producción de etanol, también se observa que se alcanzara una máxima producción usando valores de

concentración de sustrato de 100 g/l, pH de 3.6 y a una temperatura de 30 °C. Esto debido a que su efecto es altamente significativo, el cual se corrobora con el gráfico de líneas de la figura 3 que indica que a valores mínimos del rango de las variables se incrementa la producción de etanol, sin embargo para la variable pH no es significativo, y se puede utilizar el pH de 4.6 propuesto, según el análisis de varianza, por no ser significativo sobre la variable dependiente.

En la producción máxima de etanol que se determino con el uso del modelo matemático obtenido por el paquete estadístico Statgraphics, el cual indica que usando valores de rango mínimo se obtiene 14.8932 g/l de etanol como variable dependiente.

VI. CONCLUSIONES

1. La producción de etanol, en un reactor de lecho fijo usando células de levaduras inmovilizadas fue de 14,40 g/l bajo las condiciones de sustrato (sacarosa) 100 g/l; pH y temperatura de 25 °C.
2. Los parámetros cinéticos del reactor de lecho fijo en la fermentación de etanol fue de: tiempo de residencia hidráulica de 8,33 horas y una cinética de fermentación de sustrato (S) Vs. Tiempo (t), cuya ecuación es:
$$S_0 = 147.9e^{-0.002244t}$$
3. En la producción de etanol según el diseño experimental se estableció que las variables con mayor efecto en la fermentación fueron: la concentración de sacarosa y la temperatura según el análisis de varianza con un 95 % de confianza.
4. El modelo matemático que representa la producción de etanol en g/l, como producto (P) usando variables de sustrato g/l, (A), pH (B) y temperatura, °C, (C) fue de:

$$P = 69.4 - 0.17A - 5.675B - 1.5C + 8.25 \times 10^{-3}AB + 3.25 \times 10^{-3}AC + 0.11BC.$$

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios de fermentación tanto en reactores continuos de flujo pistón como los de tipo tanque completamente agitado para evaluar en que medida influye la inhibición por sustrato así como de productos en el reactor de flujo pistón y a la vez como la fermentación es afectado por la propiedad de difusión tanto de sustratos como de productos.
2. Investigar los requerimientos apropiados de medios de mantenimiento de las levaduras durante la fermentación de etanol a diferentes concentraciones de levaduras inmovilizadas, es decir, el sustrato que utilizan como energía para realizar su metabolismo en la producción de etanol.
3. Realizar estudios de fermentación alcohólica con mayores tiempos de residencia hidráulica de los biocatalizadores en el reactor de flujo pistón así como de tiempos de vida útil de los mismos para tener una mejor producción de etanol.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Atkinson, B. 1986. Reactores Bioquímicos. Editorial Reverte, S,A Barcelona – España.

Ayala, J y Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería Lima – Perú

Becker, J.; Caldwell, G.y Zachgo, E. 1998. Biotecnología: Curso de Practicas de laboratorio. Segunda Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza —España.

Burns, R. 1996. Fundamentos de Química. Segunda edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. Mexico.

Canahua, H. 2001. Métodos analíticos en investigación científica. Tacna – Perú.

Crueger, W. y Crueger, A. 1989. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia. Zaragoza. España

Godia, F. Y Col. 1987. Immobilized cells: behaviour of carrageenan entrapped

yeast during continuous ethanol fermentation applied microbiology and biotechnology No 26;34-346. Barcelona, Spain.

Illanes, A. 1994. Biotecnología de Enzimas. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Valparaíso — Chile

Johansen, A. And Flink, J. 1986. Influence of alginate properties and gel reinforcement on fermentation characteristics of immobilized yeast cells. Enzyme Microb. Technol. vol. 8 No 737-748 Copenhagen Denmark.

Johansen, A. and Flink, J. 1985. Immobilization of yeast cells by internal gelation of alginate. Enzyme Microb. Technol. vol. 8 No 145-148. Copenhagen-Denmark.

Lee, J.; Pollard, I. and Coulman, G. 1983. Etanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. Biotechnology and bioengineering. Vol. XXV pag.497-511. Ohio – U.S.A.

Leo, J: Pollard, J. And Coulman, G. 1983. Etanol Fermentation with cell recycling:computer simulation. Biotechnology. Vol. XXV, Pp. 497-511 Cleveland, Ohio.

Leon A.; Chalala, G. y A. 1999. Diseño y puesta en marcha de un “sistema semicontinuo en dos etapas: Hidrólisis-Fermentación” para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Escuela de Química Universidad Industrial de Santander Bucaramanga-Colombia.

Levenspiel, O. 1995. Ingeniería de las reacciones químicas. Segunda Edición. Editorial. Reverté S.A. Barcelona —España.

Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. S.A. de C.V. México D.F.

Núñez, I. and Lema, J. 1987. Cell immobilization: application to alcohol production. Enzyme Microbiology Technology. Vol. 9 España.

Palacios, S. 1997. Diseño y Análisis de Experimentos Industriales. Editorial Latina Editores Oruro — Bolivia

Park, J. And Chiang, H. 2000. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnology advances. Vol. 18: 303-319.
South Korea.

Pérez, S. 1994. Tópicos sobre Biotecnología Editorial Libertad E.I.R.L. Lima - Perú.

Prescott, S. Y Gordon, D. 1986. Microbiología Industrial. Editorial Acribia. España.

Quinteros, R 1981. Ingeniería Bioquímica Teoría y aplicaciones. Editorial Alambra Mexicana-México.

Rammakrishna, S, Ratnakumary, T. And Sai, P. 1991. Optimization of process parameters for the continuous production of alcohol with a cell immobilized bioreactor. Bioprocess Engineering. No 141 -144. Trivandrum, India.

Roukas, T. 1993. Ethanol Production from Nonsterilized carob Pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fedbatch culture. Biotechnology and Bioengineering Vol. 43 No 189-194. Thessaloniki — Greece.

Shabtai, Y. Et. al 1991. Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor coupled with membrane pervaporation unit.

Sitton O. Foutch, G., Book y Gaddy, J. 1981. Etanol a partir de residuos de plantas de maíz. Revista de Ingeniería Química Pág. 20-25. Missouri.

Vogt. E. 1986. El vino. Novena edición. Editorial Acribia. SA. Zaragoza, España.

Wiseman, A. 1986. Principios de Biotecnología-Editorial Acribia. Zaragoza España.

Yarleque, J. y Col. 1993. Producción de etanol por bioconversión de pericarpio de cacao (*Theobroma cacao L.*) utilizando células inmovilizadas de *S. Cerevisiae* ATCC 4126 — UNSCH. Ayacucho — Perú.

ANEXOS

ANEXO 1



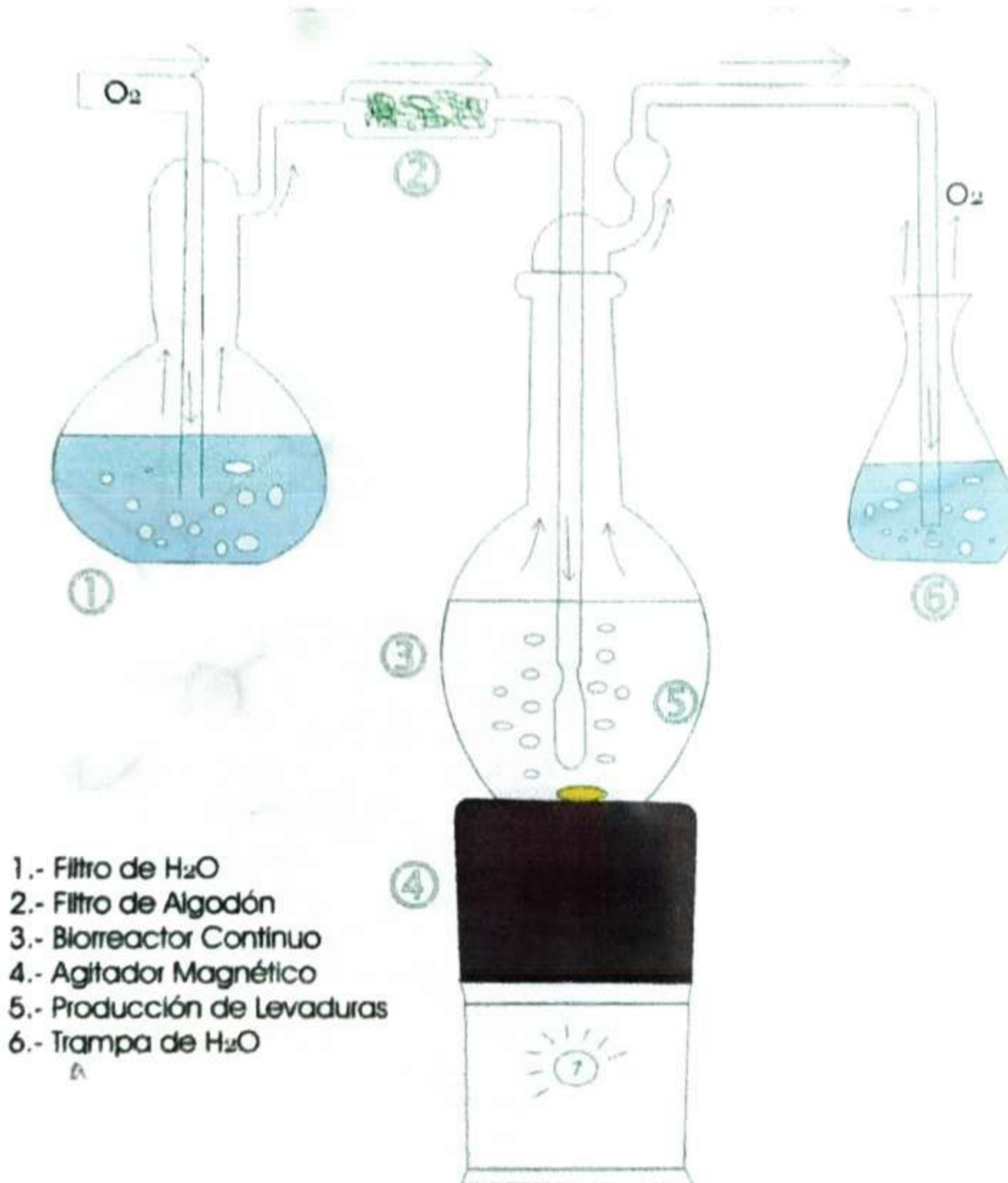
Colonias de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en agar Sabouraud

ANEXO 2



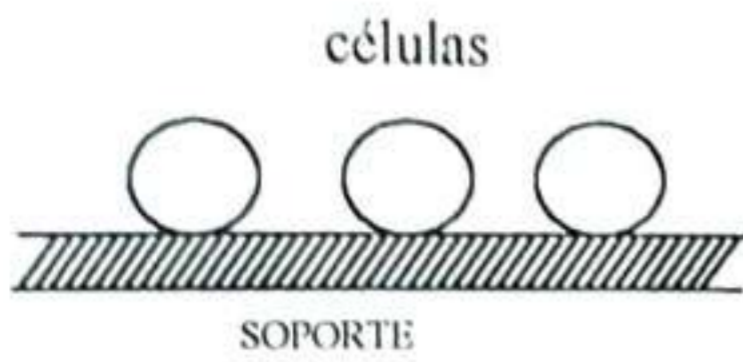
Células de *Saccharomyces cerevisiae*

ANEXO 3

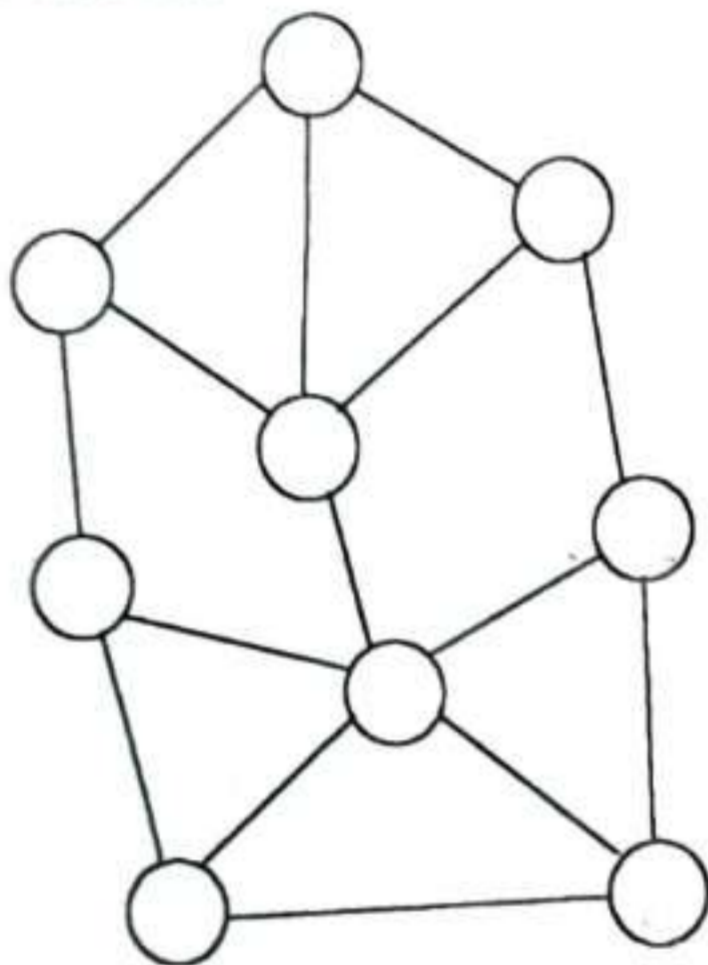


PROPAGACIÓN DE LEVADURAS EN UN BIOREACTOR DISCONTINUO
CON AGITACIÓN.

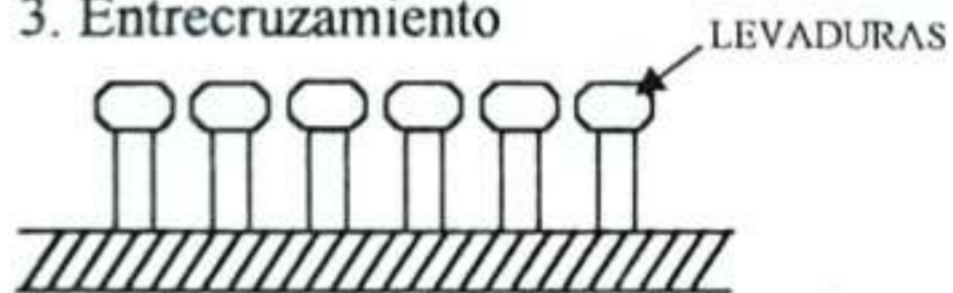
ANEXO 4



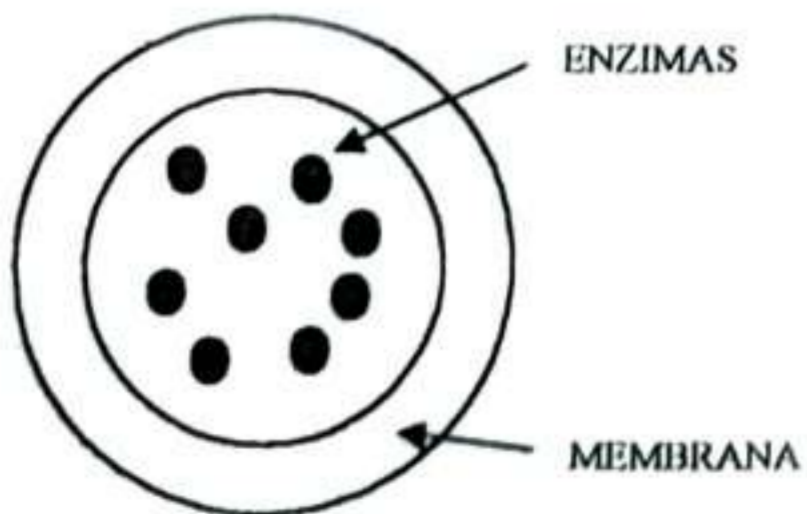
1. Adsorción



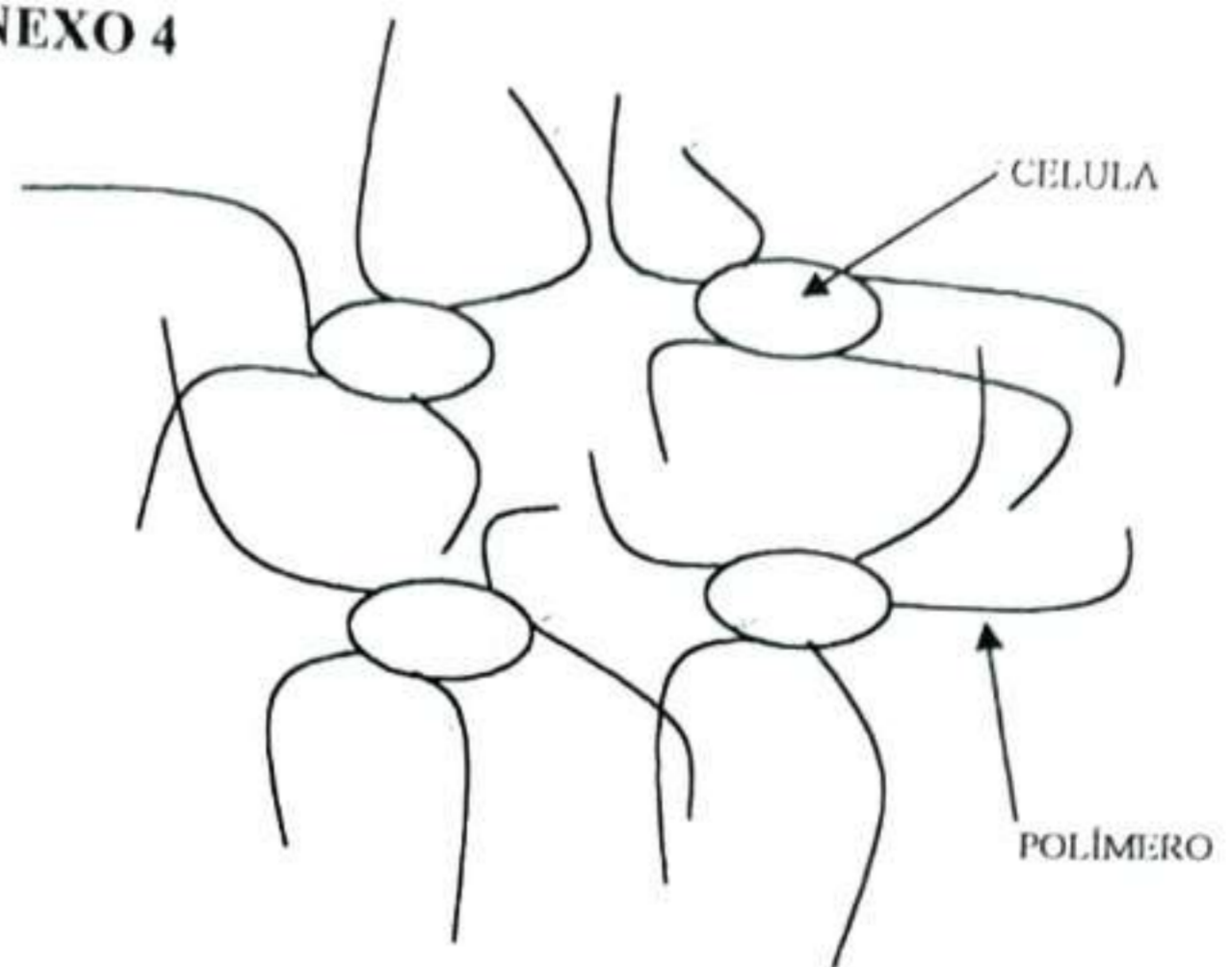
3. Entrecruzamiento



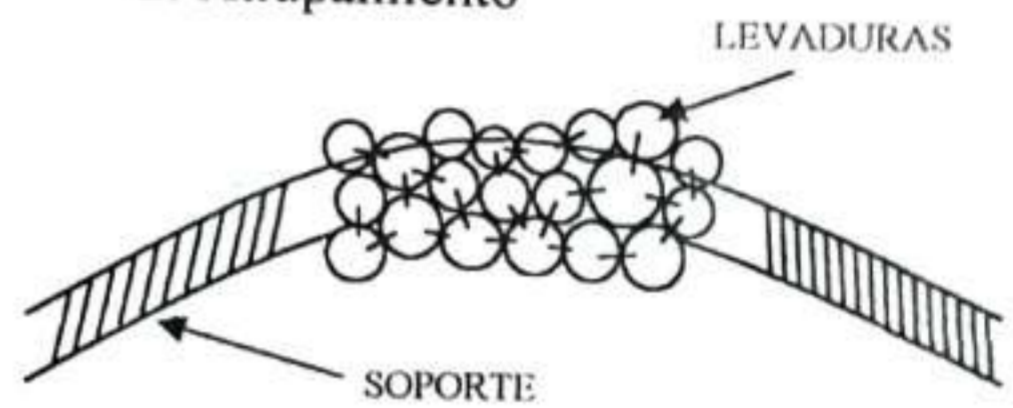
5. Unión covalente



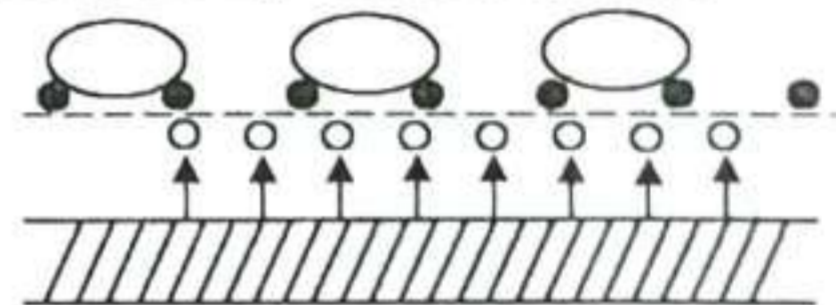
7. Microencapsulación



2. Atrapamiento



4. Adsorción y entrecruzamiento



6. Intercambio Iónico



7. Copolimerización

Métodos de inmovilización. 1 al 5 para células y del 1 al 8 para enzimas y células.

ANEXO 5

INMOVILIZACION DE LEVADURAS

SUSPENSION DE LEVADURAS
PROVENIENTES DE FASE LOGARÍTMICA
AL 3% (m/v) A 40°C

+

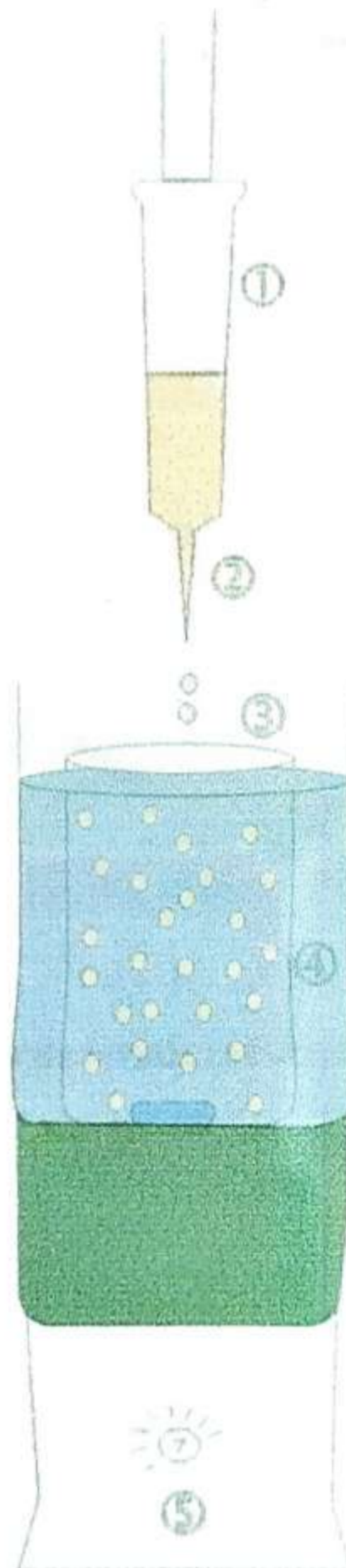
SOLUCIÓN DE ALGINATO DE
SODIO AL 2,5% (m/v)
ESTERIL A 40°C

HACER GOTEAR EN SOLUCION
DE CITRATO AL 1% PARA
CONTEO CELULAR

HACER GOTEAR EN SOLUCION
FRIA DE CaCl₂ AL 1,5 % (m/v)

LEVADURAS INMOVILIZADAS
POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO
DE CALCIO

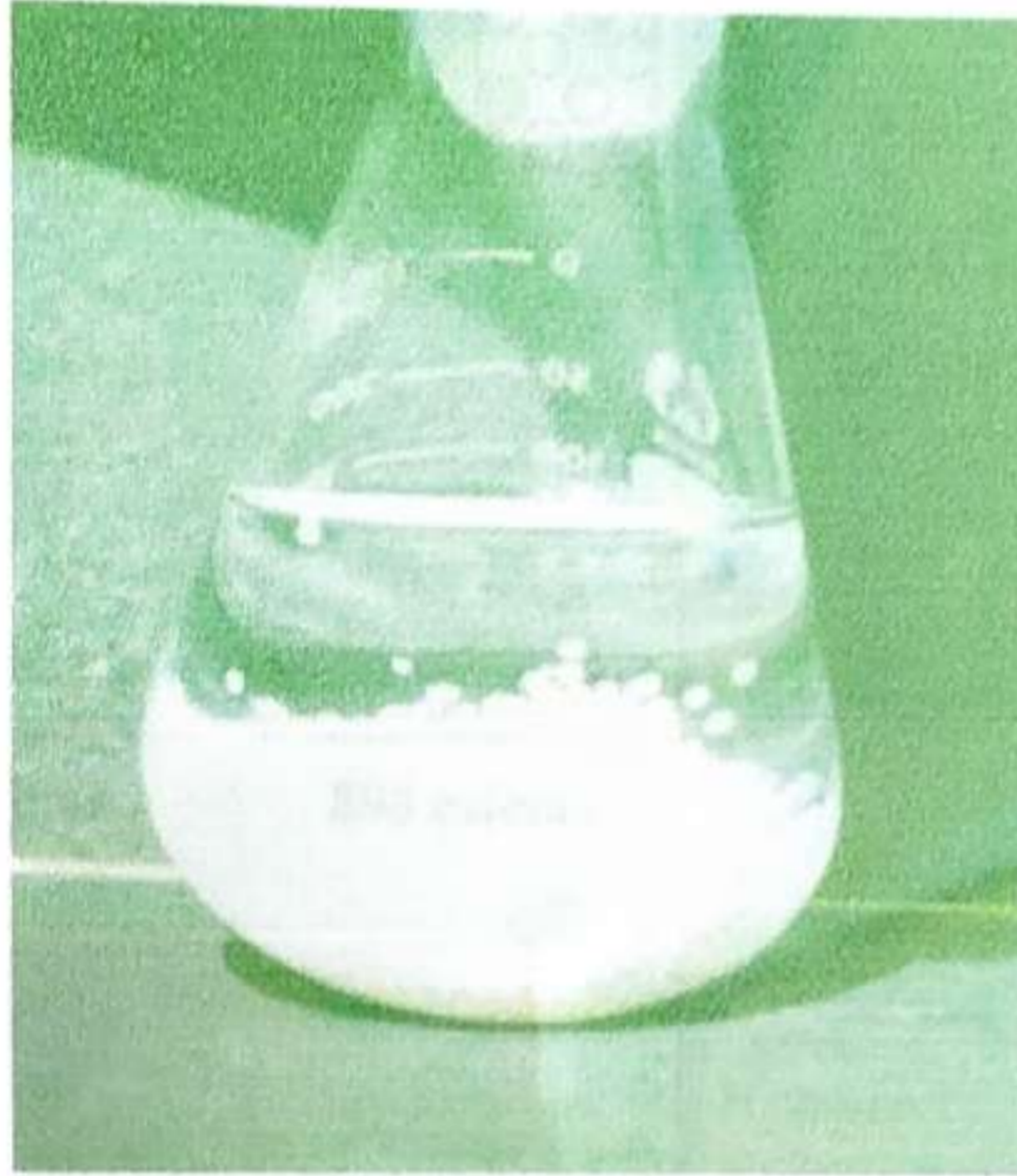
ANEXO 6



- 1.- Jeringa de Vidrio
- 2.- Esferas de Células inmovilizadas.
- 3.- Solución de $CaCl_2$
- 4.- Agua de hielo
- 5.- Agitador Magnético

Inmovilización de levaduras

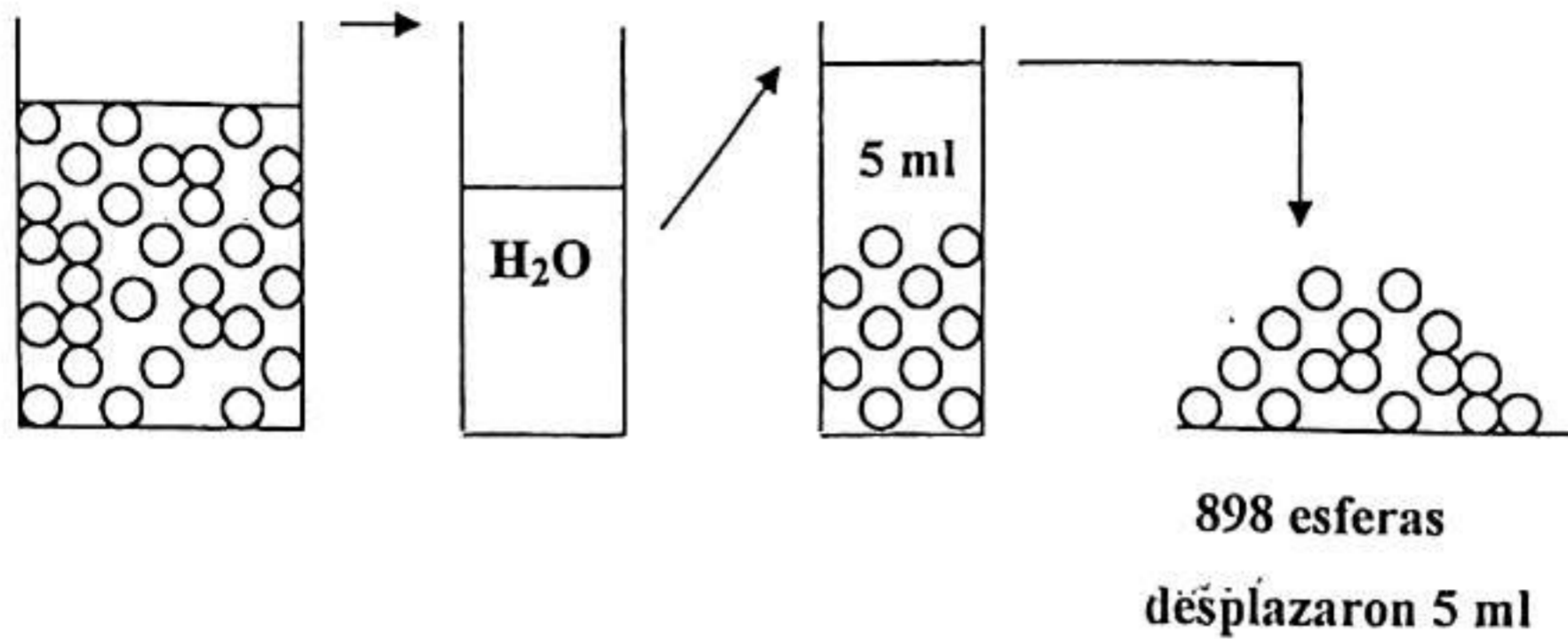
ANEXO 7



Células de levaduras inmovilizadas

ANEXO 8

DETERMINACION DEL VOLUMEN Y DIAMETRO DE ESFERAS



Volumen de esfera (V_e)

$$V_e = \frac{\text{Volumen desplazado}}{\text{Número de esferas}} = \frac{5 \text{ ml}}{898 \text{ esferas}}$$

$$V_e = 0,0056 \text{ ml}$$

Diámetro de esfera (D_e)

$$V_e = \frac{4}{3} \pi r_e^3 \quad ; \quad r_e^3 = \frac{3V_e}{4\pi}$$

$$r_e^3 = \frac{3 \times 0,0056 \text{ ml} \left(\frac{10^3 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \right)}{4\pi}$$

$$r_e^3 = 1.3369 \text{ mm}^3$$

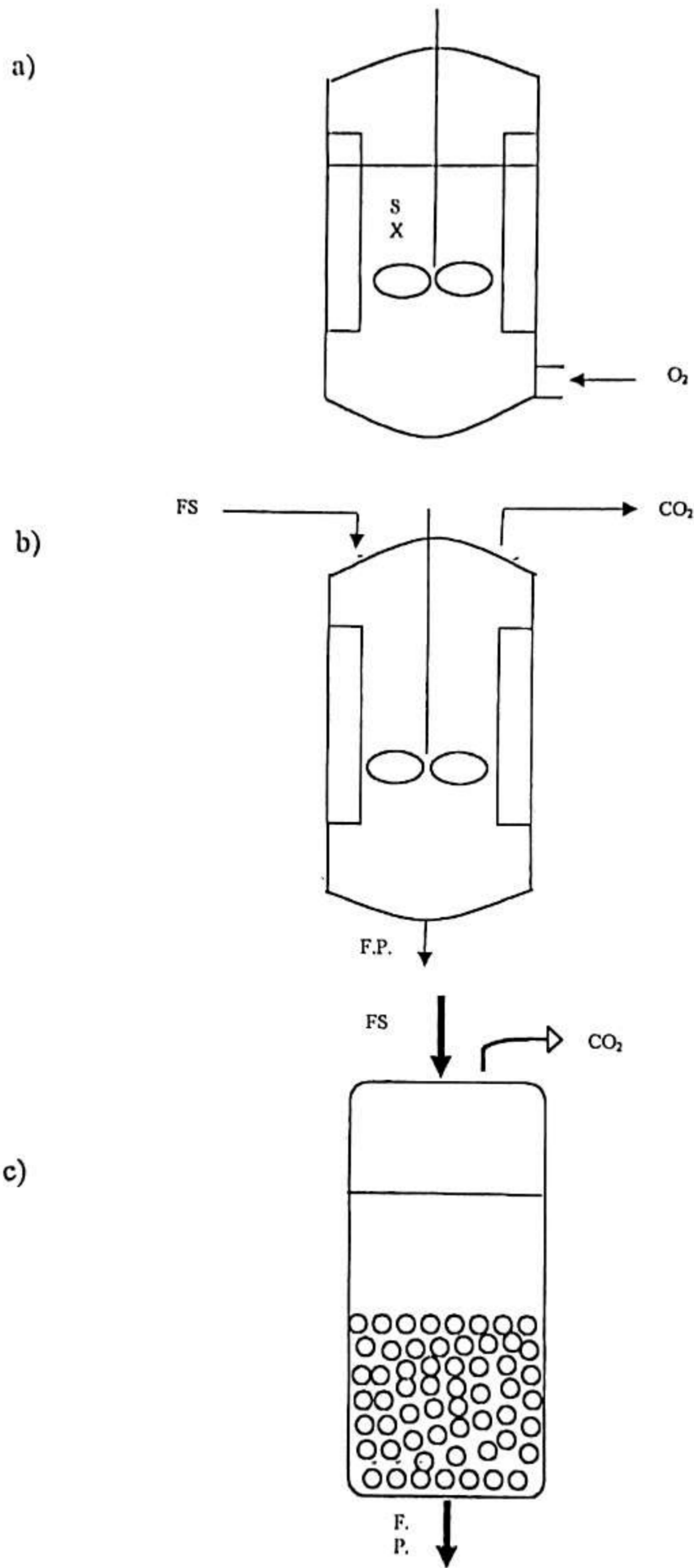
$$r_e = 1.1 \text{ mm}$$

$$D_e = 2 r_e$$

$$D_e = 2 \times 1.1 \text{ mm}$$

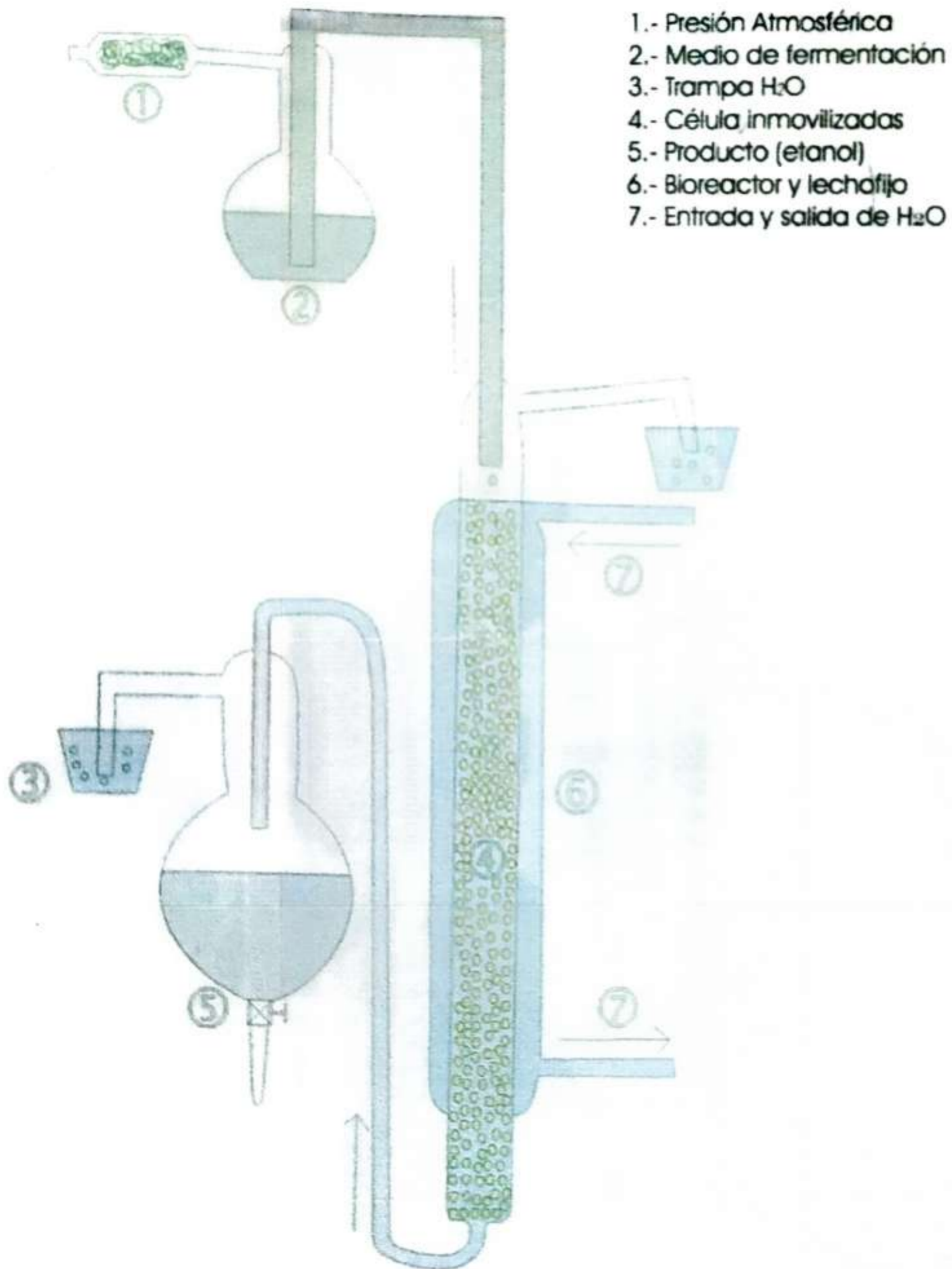
$$D_e = 2,2 \text{ mm}$$

ANEXO 9



Principales tipos reactores: a) Reactor discontinuo. b) Reactor continuo tipo tanque agitado c) Reactor continuo de flujo pistón y lecho fijo.

ANEXO 10



PRODUCCIÓN DE ETANOL EN UN BIOREACTOR DE LECHO FIJO
USANDO CELULAS DE *S. cerevisiae* INMOVILIZADAS

ANEXO 11

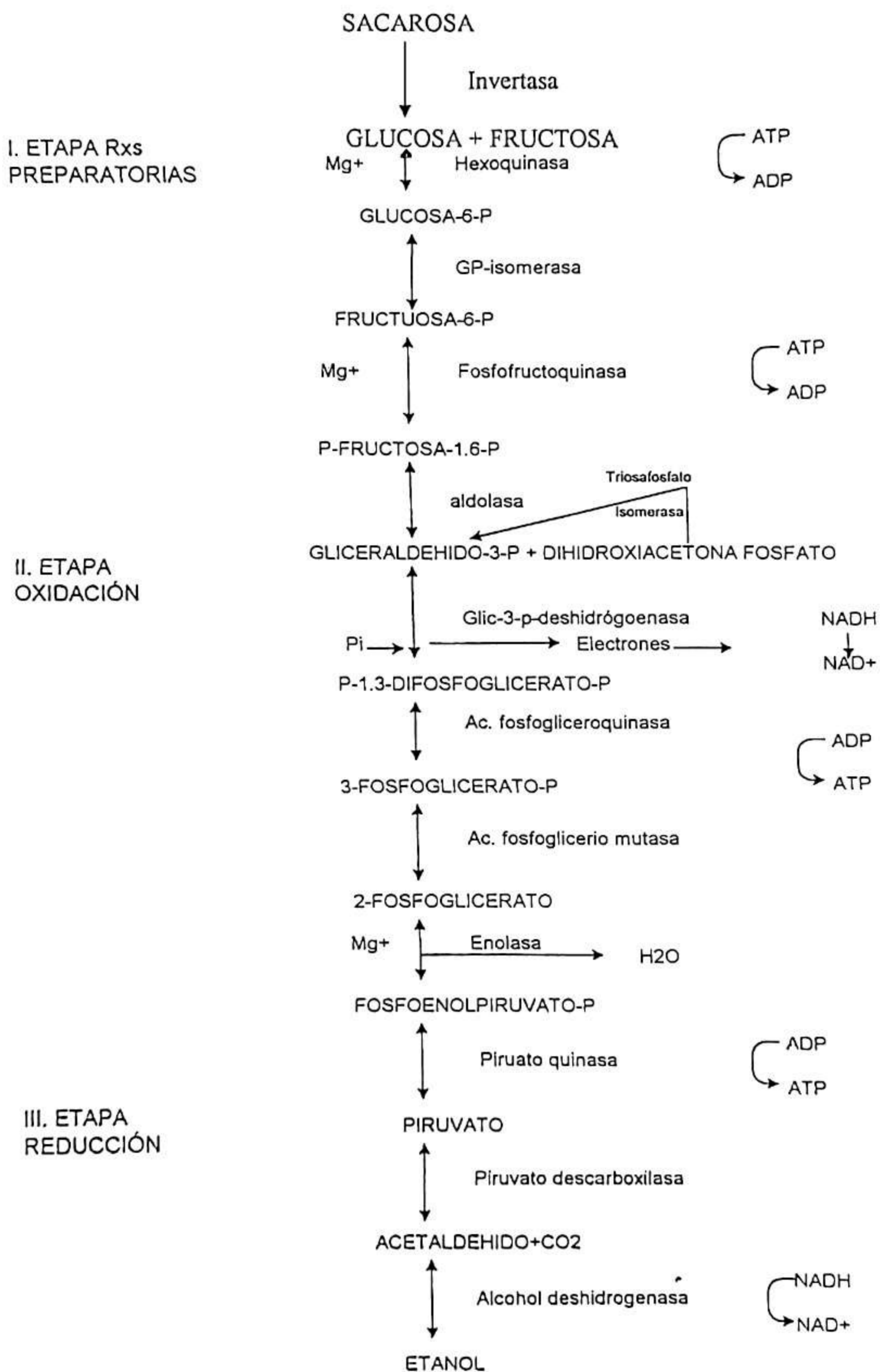


Diagrama de la fermentación del etanol.

ANEXO 12

Determinación de la concentración de ETANOL por el método del picnómetro a partir de una muestra de fermentado.



ANEXO 13

Determinación del contenido de etanol (gramos por litro) a partir de la densidad del destilado a 20°C, referido a agua a 20°C

| Densidad del destilado | 4ª decimal de la densidad del destilado | | | | | | | | | |
|------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| | Gramos por litro | | | | | | | | | |
| 0.999 | 0.50 | 1.10 | 1.60 | 2.10 | 2.70 | 3.20 | 3.70 | 4.20 | 4.80 | 5.30 |
| 0.998 | 5.80 | 6.40 | 6.90 | 7.40 | 8.00 | 8.50 | 9.00 | 9.50 | 10.10 | 10.60 |
| 0.997 | 11.20 | 11.70 | 12.30 | 12.80 | 13.30 | 13.90 | 14.40 | 15.00 | 15.50 | 16.10 |
| 0.996 | 16.60 | 17.20 | 17.70 | 18.20 | 18.80 | 19.30 | 19.90 | 20.50 | 21.00 | 21.60 |
| 0.995 | 22.10 | 22.70 | 23.30 | 23.80 | 24.40 | 25.00 | 25.50 | 26.10 | 26.60 | 27.20 |
| 0.994 | 27.80 | 28.30 | 28.90 | 29.40 | 30.00 | 30.60 | 31.20 | 31.80 | 32.40 | 32.90 |
| 0.993 | 33.50 | 34.10 | 34.70 | 35.30 | 35.80 | 36.40 | 37.00 | 37.60 | 38.20 | 38.80 |
| 0.992 | 29.40 | 39.90 | 40.50 | 41.10 | 41.70 | 42.30 | 42.90 | 43.50 | 44.10 | 44.70 |
| 0.991 | 45.30 | 45.90 | 46.50 | 47.10 | 47.70 | 48.30 | 48.90 | 49.50 | 50.10 | 50.70 |
| 0.990 | 51.30 | 51.90 | 52.50 | 53.20 | 53.80 | 54.40 | 55.00 | 55.60 | 56.20 | 56.80 |
| 0.989 | 57.40 | 58.10 | 58.70 | 59.30 | 59.90 | 60.50 | 61.20 | 61.80 | 62.50 | 63.10 |
| 0.988 | 63.70 | 64.30 | 65.00 | 65.60 | 66.30 | 66.90 | 67.50 | 68.20 | 68.80 | 69.40 |
| 0.987 | 70.00 | 70.70 | 71.30 | 72.00 | 72.60 | 73.30 | 73.90 | 74.60 | 75.20 | 75.90 |
| 0.986 | 76.50 | 77.20 | 77.80 | 78.50 | 79.10 | 79.80 | 80.50 | 81.10 | 81.80 | 82.50 |
| 0.985 | 83.10 | 83.80 | 84.50 | 85.50 | 85.80 | 86.50 | 87.20 | 87.80 | 88.50 | 89.20 |
| 0.984 | 89.90 | 90.60 | 91.20 | 91.90 | 92.60 | 93.30 | 94.00 | 94.70 | 95.30 | 96.00 |
| 0.983 | 96.70 | 97.40 | 98.10 | 98.80 | 99.50 | 100.20 | 100.90 | 101.60 | 102.20 | 102.90 |
| 0.982 | 103.60 | 104.30 | 105.00 | 107.70 | 106.40 | 107.10 | 107.80 | 108.50 | 109.20 | 109.90 |
| 0.981 | 110.70 | 111.40 | 112.10 | 112.80 | 113.50 | 114.20 | 114.90 | 115.70 | 116.40 | 117.10 |
| 0.980 | 117.80 | 118.50 | 119.30 | 120.00 | 120.70 | 121.50 | 122.20 | 122.90 | 123.60 | 124.40 |

Fuente: Bundesanzeiger 1960 n° 86, pág. 17

ANEXO 14

Cuadro 5. Evaluación de características colonial y celular de la levadura

| Aspecto | Levaduras | Características |
|-----------------|--------------|--------------------|
| Colonial | Tamaño | 1,5 a 2,5 mm |
| | Forma | Circular |
| | Bordes | Definidos |
| | Superficie | Lisa |
| | Elevación | Convexa |
| | Consistencia | Húmeda |
| | Color | Blanco-cremoso |
| Celular | Forma | Ovalada |
| | Borde | Definido |
| | Gemación | Polar y multipolar |

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 6. Evaluación de la fermentación de carbohidratos por *S. cerevisiae*.

| CARBOHIDRATOS | PRODUCCIÓN DE CO ₂ |
|---------------|-------------------------------|
| LACTOSA | - |
| MALTOSA | - |
| SACAROSA | + |
| GLUCOSA | + |

Fuente: Elaboración propia.

(-) No existe producción de gas; (+) Si hay producción de gas.

ANEXO 15

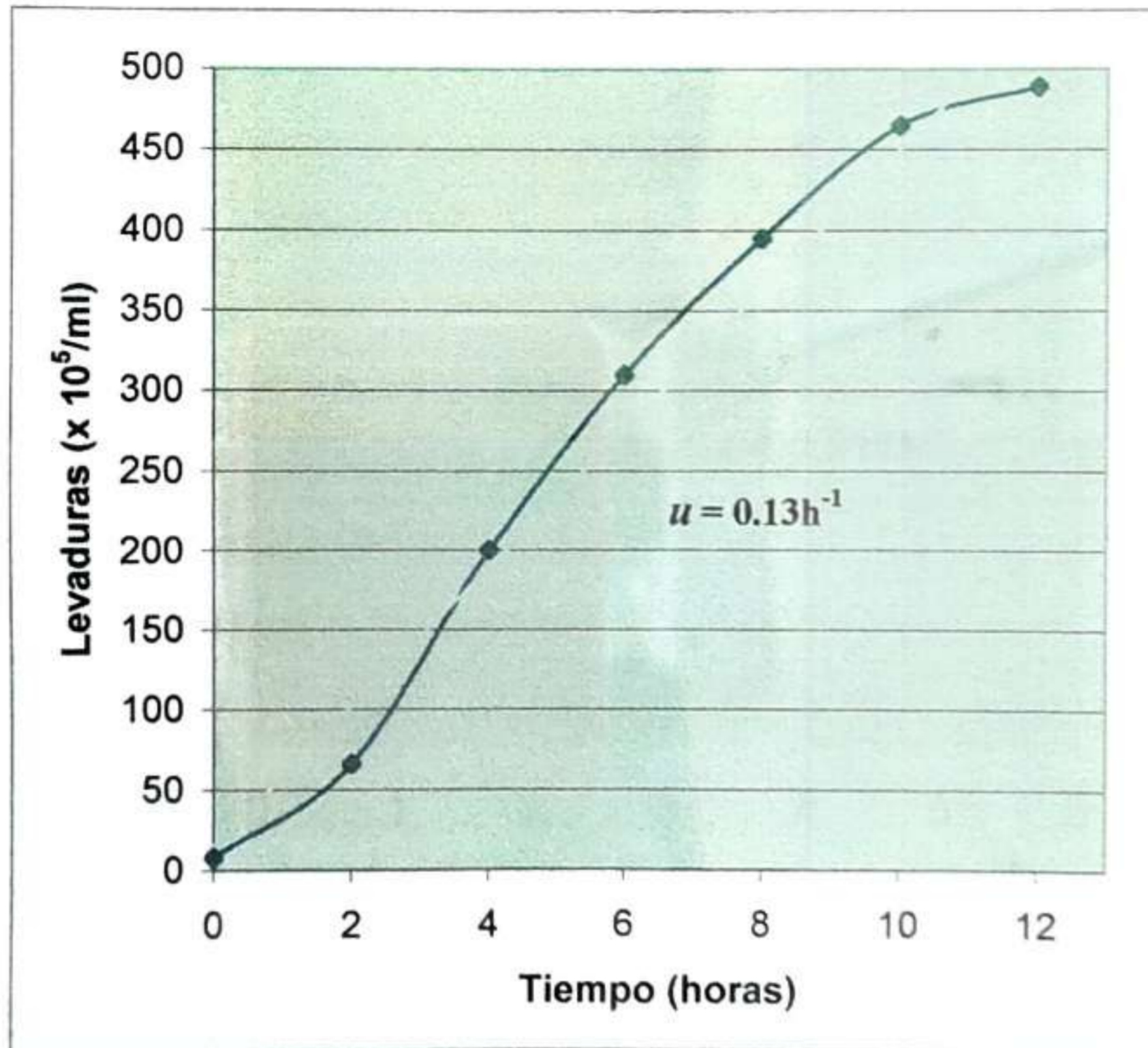


Figura 6. Crecimiento de levaduras libres

ANEXO 16

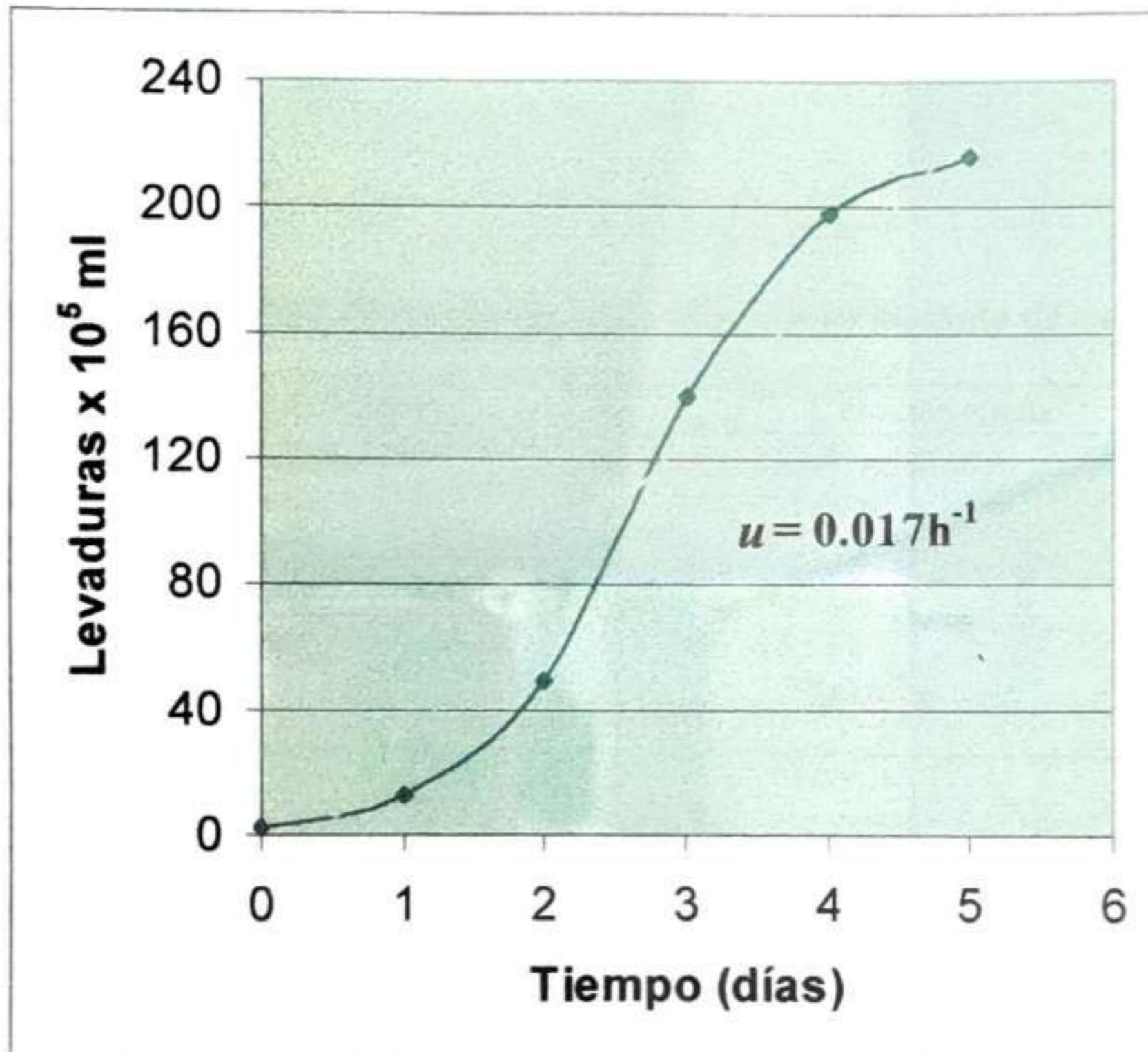


Figura 7. Crecimiento de levaduras inmovilizadas

ANEXO 17

Cuadro 7. Características de levaduras inmovilizadas en alginato de calcio

| Células inmovilizadas | Características |
|----------------------------|---------------------------|
| Células viables por esfera | 2×10^5 levaduras |
| Diámetro de cada esfera | 2.2 mm |
| Volumen de esferas | 5.6×10^{-3} ml |
| Volumen total de esferas | 300 ml |
| Número total de esferas | 53,571 |
| Peso por esfera | 1.68×10^{-4} g |

ANEXO 18

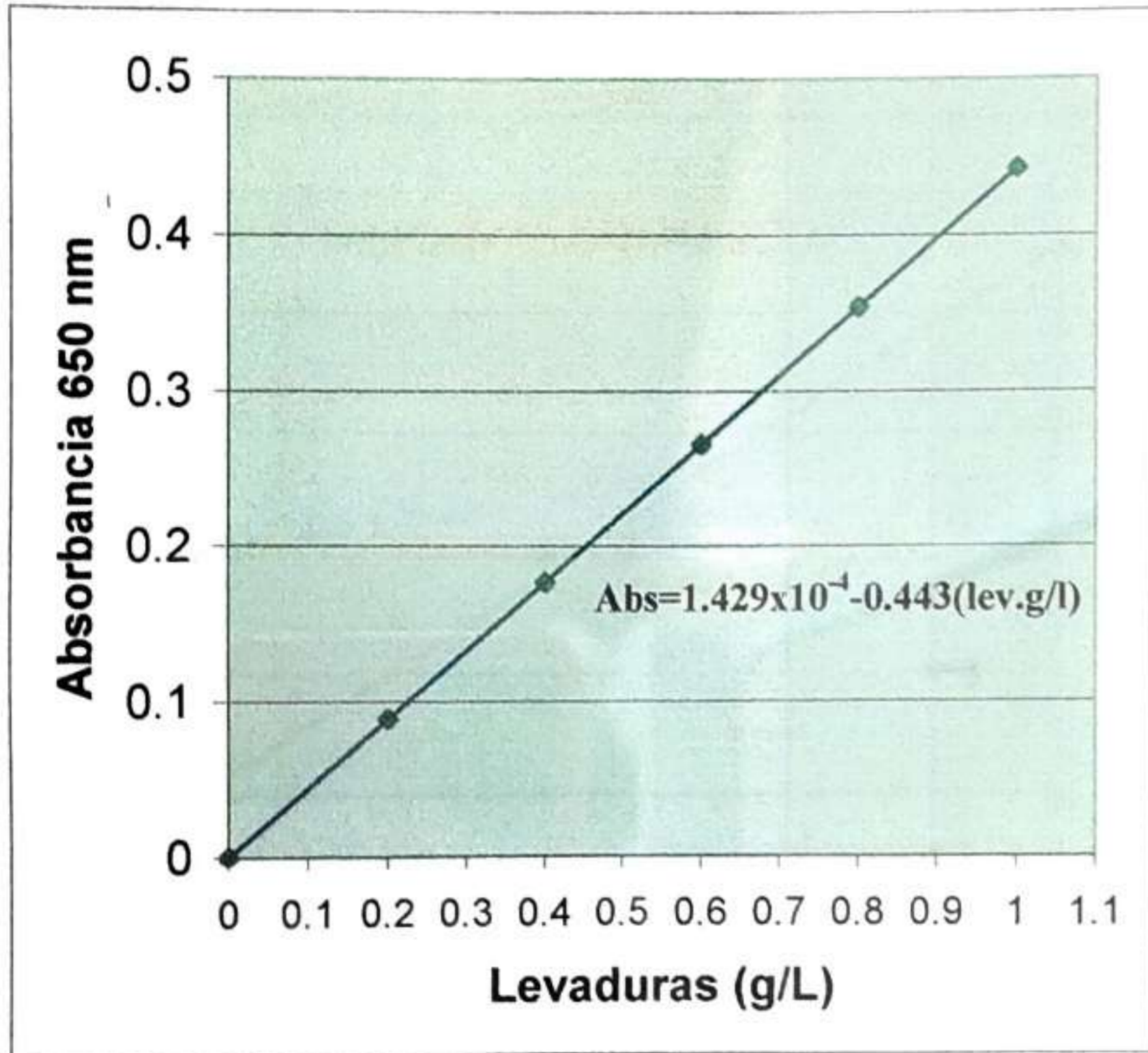


Figura 8. Curva patrón de levaduras por densidad óptica (Abs.)

ANEXO 19

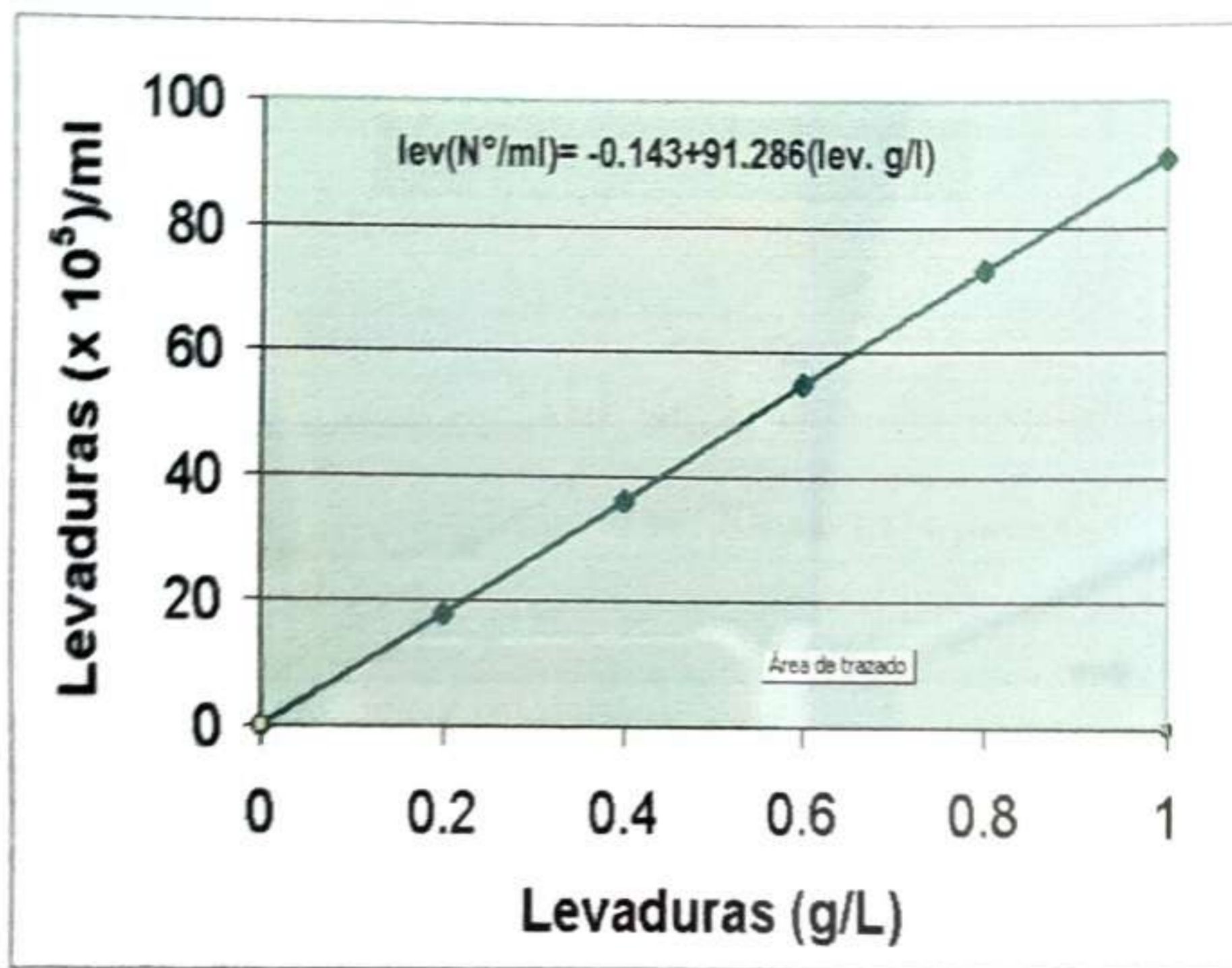


Figura 9. Curva patrón de levaduras por conteo directo de células

ANEXO 20

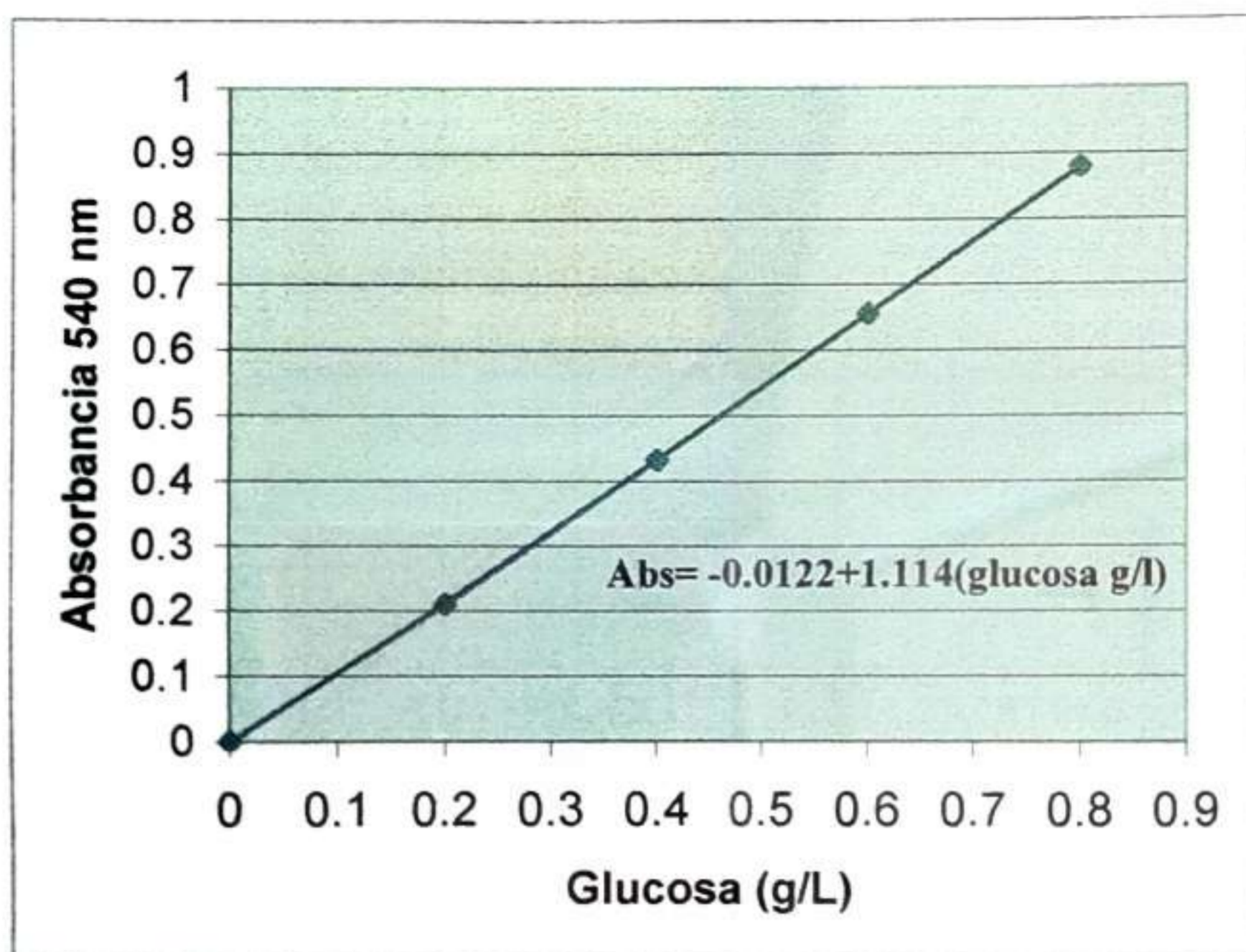


Figura 10. Curva padrão de glicose

ANEXO 21

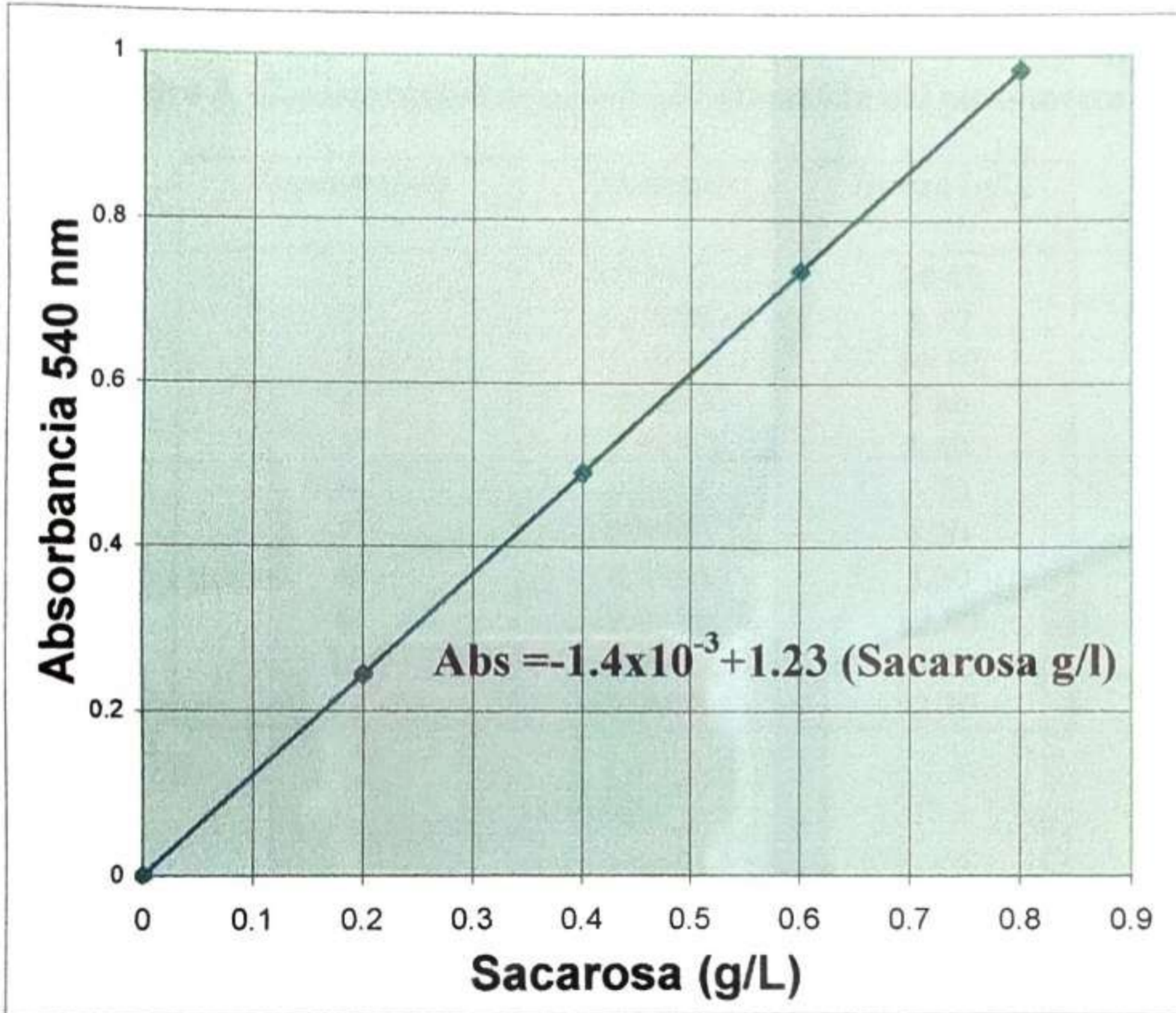


Figura 11. Curva padrão de azúcares reductores totales (Sacarosa)

ANEXO 22

Cuadro 8. Concentración de etanol por el método del picnómetro

| Experimento | Densidad | Etanol (g/l) |
|-------------|----------|--------------|
| 1 | 0.9973 | 14.40 |
| 2 | 0.9884 | 8.50 |
| 3 | 0.9976 | 10.10 |
| 4 | 0.9889 | 5.80 |
| 5 | 0.9888 | 6.40 |
| 6 | 0.9993 | 3.70 |
| 7 | 0.9992 | 4.20 |
| 8 | 0.9994 | 3.20 |
| 9 | 0.9976 | 12.80 |
| 10 | 0.9975 | 13.30 |
| 11 | 0.9977 | 12.30 |

Cuadro 9: Efectos estimados en la producción de etanol

| | | |
|----------------|---------|-----------|
| Promedio | 7.51818 | +/- 0.407 |
| A: Sustrato | -3.475 | +/- 0.954 |
| B: pH | -2.425 | +/- 0.954 |
| C: Temperatura | -5.325 | +/- 0.954 |
| AB | 0.825 | +/- 0.954 |
| AC | 1.625 | +/- 0.954 |
| BC | 1.075 | +/- 0.954 |

ANEXO 23

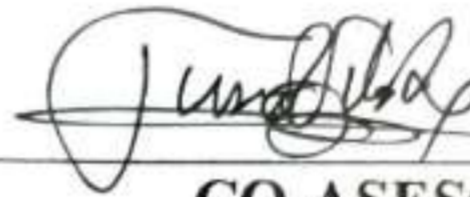
Cuadro 10. Análisis de varianza para la producción de etanol con células inmovilizadas

| Fuente | SC | GL | CM | F. exp. | F. exp. |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|----------------|
| A sustrato | 24.1512 | 1 | 24.1512 | 13.27 | 7.71 |
| B pH | 11.7613 | 1 | 11.7613 | 6.46 | 7.71 |
| C Temperatura | 56.7113 | 1 | 56.7113 | 31.16 | 7.71 |
| AB | 1.36125 | 1 | 1.36125 | 0.75 | 7.71 |
| AC | 5.28125 | 1 | 5.28125 | 2.90 | 7.71 |
| BC | 2.31125 | 1 | 2.31125 | 1.27 | 7.71 |
| Total error | 7.27886 | 4 | 1.81972 | | |
| Total correlativo | 108.856 | 10 | | | |



ASESOR

Mgr. Roberto Castellanos Cabrera



CO-ASESOR

Mgr. Juan Viloche Bazán