

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Química

**“Producción continua de etanol utilizando
Sacharomyces cerevisiae inmovilizada en
alginato de calcio en un biorreactor
tipo tanque”**

TESIS

Presentada por:

Bach. ELIZABETH MARIA CRUZ ESCALANTE

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO QUÍMICO

**TACNA - PERÚ
2010**



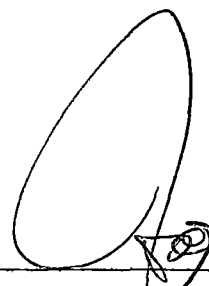
~~Mgr. Zoila Luz Mendoza Rodas~~

Asesora



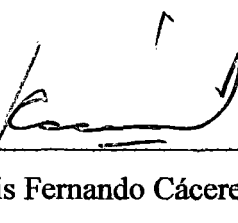
Mgr. Roberto Supo Hallasi

Presidente



Ing. José Gabriel Avilés Hinojosa

Secretario



Ing. Luis Fernando Cáceres Yáñez

Vocal

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 145 TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO

El secretario académico de la Facultad de Ciencias, certifica que mediante la resolución de Facultad N° 6163 - 2010 – FACI – UN/JBG, se ha designado como jurados para la sustentación de Tesis **“Producción continua de etanol utilizando *Sacharomyces cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio en un biorreactor tipo tanque”**

El mismo que está conformado por:


Presidente : Mgr. Roberto Supo Hallasi
Secretario : Ing. José Gabriel Avilés Hinojosa
Vocal : Ing. Luis Fernando Cáceres Yáñez

Para examinar y calificar el trabajo de tesis sustentado en acto público el día Martes, 27 de Abril del 2010.

Presentado por la Srta. Bachiller **ELIZABETH MARIA CRUZ ESCALANTE** de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Química.

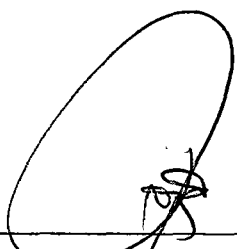
El jurado calificador en forma secreta e individual se pronuncio sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado: Aprobado por Unanimidad con 03 votos y promedio de Sobresaliente

Para ratificar lo detallado firman:



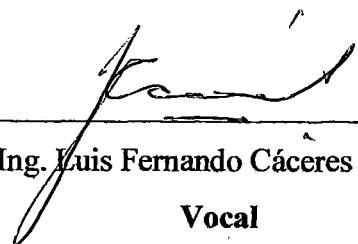
Mgr. Roberto Supo Hallasi

Presidente



Ing. José Gabriel Avilés Hinojosa

Secretario



Ing. Luis Fernando Cáceres Yáñez

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por la fuerza motivadora, que me brindó todos los días de mi vida.

A mis padres, Yony Cruz Cohaila y Josefina Escalante Berrocal, quienes me formaron y animaron en todo momento a seguir adelante.

A mi novio Raúl Sánchez Vizcarra y a mi amiga Rocío Zapana Quispe por su apoyo y confianza en la realización de mis sueños.

A mis profesores, quienes me apoyaron a compartieron conmigo sus conocimientos.

Y a las pruebas que encontré en el camino, porque me permitieron desarrollar madurez y liderazgo.

ÍNDICE

RESUMEN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo	2
1.1.1 Objetivo general	2
1.1.2 Objetivo específico	3
1.2 Hipótesis	3
CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO	4
2.1 Etanol	4
2.2 Obtención de etanol	4
2.3 Usos de etanol	5
2.4 Fermentación alcohólica a partir de la sacarosa	6
2.5 Levaduras	12
2.5.1 Historia de las levaduras	13
2.5.2 Características generales	14

2.5.3	Características morfológicas	15
2.5.4	Reproducción de las levaduras	16
2.5.5	Fisiología de las levaduras	16
2.5.6	Género <i>Saccharomyces</i>	17
2.5.7	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	18
2.5.8	Taxonomía de la <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	19
2.6	Inmovilización de levaduras	19
2.6.1	Definición de inmovilización	19
2.6.2	Importancia de la inmovilización	20
2.6.3	Modos generales de la inmovilización	21
2.6.3.1	Métodos de inmovilización de enzimas por retención física	22
a)	Atrapamiento	23
b)	Inclusión en membranas	24
2.6.3.2	Métodos de inmovilización de enzimas por unión química	25
a)	Unión a soportes	26
b)	Reticulado	28
2.7	Efectos de la inmovilización	29
2.7.1	Efectos en la estabilidad	30
2.7.2	Efectos en la actividad enzimática	31

a) Efectos difusionales	32
b) Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato	33
c) Efectos en el microentorno	33
2.8 Biorreactores	34
2.8.1 Tipos de biorreactores	35
2.8.1.1 Biorreactores discontinuos	35
2.8.1.2 Biorreactores continuos	37
a) Tipo tanque agitado	38
b) Biorreactores tubulares de flujo pistón	39
2.9 Cinética de fermentación	40
2.9.1 Cinética de fermentación discontinua	41
2.9.2 Cinética de fermentación continua	44
2.9.2.1 Cinética del fermentador continuo tipo tanque	47
2.10 Determinación de los parámetros cinéticos	48
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 Materiales	49
3.1.1 Materia Prima	49
3.1.2 Reactivos biológicos	49

3.1.3	Reactivos químicos	50
3.1.4	Materiales y equipos	50
3.2	Métodos	52
3.2.1	Determinación de los parámetros cinéticos de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
a)	Determinación de la velocidad específica de crecimiento a diferentes concentraciones de sacarosa	52
3.2.2	Determinación de la curva patrón celular	53
a)	Por medición de la densidad óptica	53
b)	Por el método del recuento celular	54
3.2.3	Determinación de la curva patrón de azúcares reductores	54
3.2.4	Determinación de la curva patrón de azúcares reductores totales	55
3.2.5	Inmovilización celular	56
a)	Determinación del volumen y diámetro de la esfera	57
3.2.6	Determinación del grado de actividad de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
a)	Producción de CO ₂ de las levaduras libres e inmovilizadas	58
b)	Producción de CO ₂ con levaduras inmovilizadas a diferentes concentraciones	59

3.3	Construcción del biorreactor	59
3.4	Producción de etanol	62
3.4.1	Esterilización del reactor y del medio de fermentación	62
3.4.2	Fermentación discontinua	63
3.4.3	Fermentación continua	63
3.4.4	Control de temperatura	64
3.4.5	Control de pH	64
3.4.6	Producción de etanol	65
3.4.7	Determinación de la concentración de etanol	65
3.5	Diseño experimental	67
3.6	Análisis estadístico de los resultados	69
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		72
4.1	Determinación de los parámetros cinéticos	72
4.1.1	Determinación del número de levaduras activas y no activas	81
4.2	Determinación de la curva patrón celular	84
4.2.1	Por medición de la densidad óptica	85
4.2.2	Por el método del recuento celular	86
4.3	Determinación de la curva patrón de azúcares reductores (AR)	88

4.4	Determinación de la curva patrón de azúcares reductores totales (ART)	89
4.5	Inmovilización celular	91
4.6	Determinación del grado de actividad de la levadura	92
4.7	Producción continua de etanol	99
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES		109
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES		112
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA		114
ANEXOS		119

RESUMEN

El presente trabajo de tesis, consiste en el estudio de la producción continua de etanol en un biorreactor tipo tanque, usando un sistema de células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en gel de alginato de calcio.

El estudio se inicia con la construcción del biorreactor tipo tanque, de 3 litros de capacidad máxima, el mismo que está provisto de sensores de pH y temperatura, de un sistema de agitación tipo turbina Rushtong y de un serpentín. El sistema de alimentación se realiza por medio de una bomba peristáltica y los productos salen por un sistema de rebose.

El trabajo de tesis continuó con la determinación de los parámetros cinéticos de la fermentación, hallados en un biorreactor discontinuo mediante la ecuación de Monod, para ello primero se determinaron las velocidades específicas de crecimiento en soluciones a diferentes concentraciones de sustrato (sacarosa), obteniéndose al final de las experiencias, una velocidad máxima de crecimiento, μ_m , de $0,4866 \text{ h}^{-1}$ y una constante de equilibrio de disociación, K_s , de $62,9768 \text{ g/l}$

El estudio de la fermentación continua, se realizó utilizando un diseño experimental factorial, siendo las variables, las siguientes: tiempo de residencia, temperatura y pH. Al finalizar las corridas experimentales se obtuvo que el mejor valor de rendimiento para la producción de etanol, fue 45,80 g/l a una temperatura de 32°C, pH de 5 y tiempo de residencia de 5 horas. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza, determinándose que la variable que tuvo mayor influencia durante el proceso de obtención de etanol fue el tiempo de residencia con un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la inmovilización celular es una de las técnicas biotecnológicas más importantes en lo que se refiere a la bioconversión de sustancias por microorganismos; su importancia radica en el aumento de las proporciones de reacción, obteniendo como resultado un aumento en la productividad del proceso.

El uso de un bioreactor continuo ayuda considerablemente en un proceso de fermentación utilizando la técnica de inmovilización, debido a que este equipo permite el ingreso de sustrato en forma continua y de la misma manera la salida del producto obtenido; cabe mencionar que la velocidad de ingreso y salida del equipo son las mismas y que las levaduras inmovilizadas se encontrarán en el interior del tanque.

Como bien se sabe la industria del etanol, se basa en un método de proceso discontinuo, la cual esta subdividida en 4 etapas: carga, fermentación, descarga y limpieza. Esta a su vez viene subdividida en dos fases, una fase aeróbica, en donde las levaduras consumirán parte del sustrato para su mantenimiento y

multiplicación y una segunda fase anaeróbica, donde se realizara el proceso de fermentación, teniendo como resultado la producción del alcohol. La desventaja que presenta este proceso discontinuo es que los sustratos se añaden al principio de la fermentación, por tanto una mejora del proceso discontinuo cerrado es la fermentación alimentada, en donde los sustratos se añadirán escalonadamente a medida que progresa la fermentación, por ello en el presente trabajo de investigación, se utiliza la inmovilización de la *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio en un reactor continuo tipo tanque. La unión de ambas tecnologías permitirá aumentar notablemente la capacidad transformadora, obteniéndose de esta manera el etanol en forma continua.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

- Obtener etanol mediante la fermentación continua utilizando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio en un biorreactor tipo tanque.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Construir un biorreactor continuo tipo tanque.
2. Determinar los parámetros cinéticos de la *Saccharomyces cerevisiae* durante la producción de etanol.
3. Determinar las variables más significativas para la producción continua de etanol, en un biorreactor tipo tanque.
4. Determinar los modelos matemáticos que relacionan el rendimiento y la productividad con las variables independientes del proceso.

1.2 HIPÓTESIS

Mediante la utilización de un biorreactor tipo tanque agitado, se producirá continuamente etanol utilizando como biocatalizador la *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en gel de alginato de calcio.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 ETANOL

El etanol es un líquido incoloro, de un característico y agradable olor. En soluciones diluidas tiene un sabor algo dulce, pero en soluciones más concentradas tiene un sabor ardiente. El etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, pertenece al grupo de los alcoholes, compuestos químicos cuyas moléculas contienen un grupo hydroxyl, $-\text{OH}$, unido a un átomo de carbono, es una molécula muy polar, soluble en toda proporción en agua, su punto de congelación es de $-114,1^\circ\text{C}$ y su punto de ebullición a $78,5^\circ\text{C}$, presenta una densidad de $0,789 \text{ g/ml}$ a 20°C . Y debido a su bajo punto de congelación es utilizado como fluido para los termómetros de temperaturas inferiores a -40°C [16].

2.2 OBTENCIÓN DE ETANOL

El alcohol etílico o etanol, cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, puede obtenerse fundamentalmente de dos maneras: el primero mediante una síntesis

química (por hidratación del etileno) y la segunda mediante un proceso biológico (por fermentación) [2].

El primer método consiste en una reacción de adición del eteno (etileno), en donde se utiliza un ácido mineral (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. El segundo método es biológico, el cual consiste en un proceso de fermentación de mostos azucarados en la que interviene un complejo enzimático (que poseen ciertos microorganismos específicamente levaduras) los cuales serán los encargados de transformar el azúcar en etanol.

2.3 USOS DE ETANOL

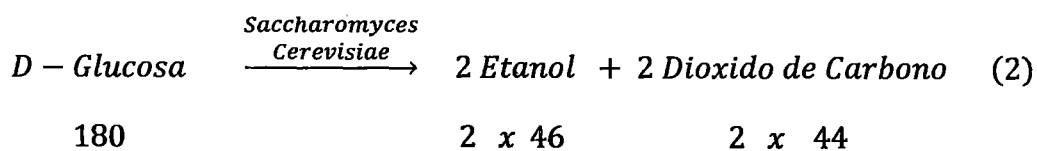
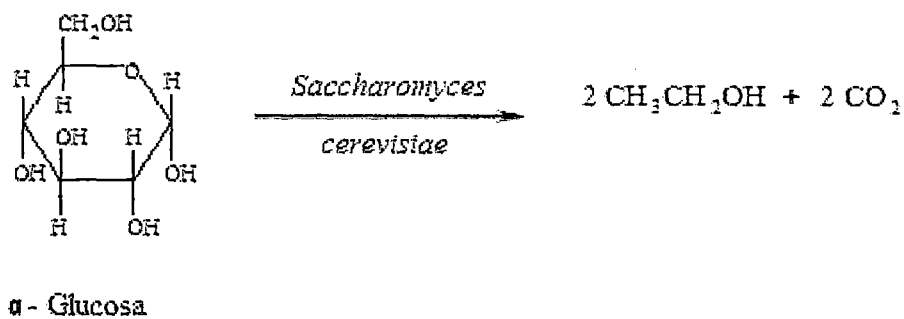
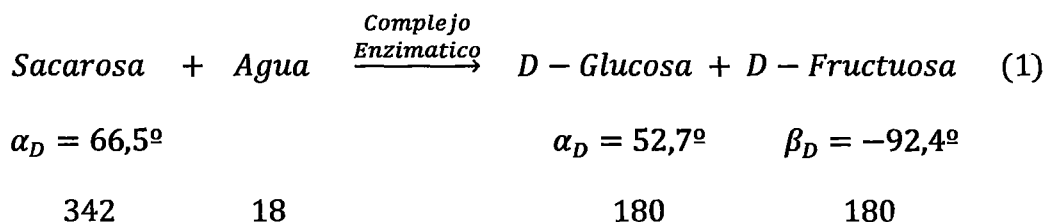
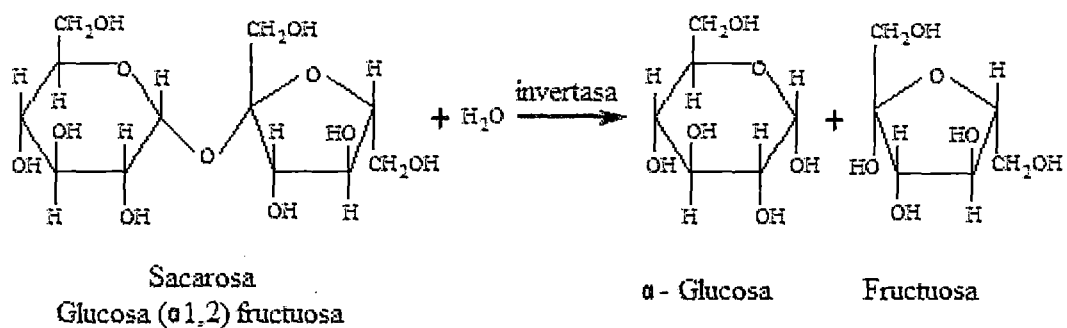
El etanol, no sólo es el producto químico orgánico más antiguo empleado por el hombre, sino también uno de los más importantes. Sus usos más comunes son industriales, domésticos y medicinales. La industria emplea mucho el alcohol etílico como disolvente para lacas, barnices, perfumes y condimentos; como anticoagulante y medio para reacciones químicas y para recristalizaciones. A esto se suma la gran importancia comercial que en los últimos años ha adquirido como combustible y agente extractivo.

A nivel mundial el mercado del etanol puede subdividirse en tres, de acuerdo a sus destinos fundamentales como: combustible, uso industrial y bebidas. El uso como combustible representa el 61% de la producción mundial, ya sea para mezclar o reemplazar petróleo y derivados; alrededor del 23% se destina a la industria procesadora (cosméticos, farmacéutica, química, entre otras), y el 16% restante se destina a la industria de bebidas. La producción de alcohol destinada al uso como combustible, por lo general se encuentra subsidiada por el impacto positivo del uso del etanol carburante sobre el medio ambiente. Al igual que los efectos económicos que se logran en los países pobres: reducción de los déficits comerciales, reducción del consumo de petróleo, ahorro de divisas y reactivación de las economías [19].

2.4 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA A PARTIR DE LA SACAROSA

La fermentación alcohólica es un proceso metabólico que se caracteriza por la degradación incompleta del azúcar a dióxido de carbono y etanol, a través de enzimas de ciertos microorganismos, básicamente levaduras, tal como la *Saccharomyces cerevisiae* que actúa como complejo enzimático para la degeneración de azúcares tales como sacarosa y maltosa [23]. El mecanismo de reacciones producidas durante la fermentación partiendo de la sacarosa se muestra en la Figura 1.

FIGURA 1: Mecanismo de reacción de la fermentación alcohólica de la sacarosa



Fuente: WADE, (1996)

La Figura 1 describe el mecanismo de reacción de la sacarosa, donde los complejos enzimáticos de la célula *Saccharomyces cerevisiae*, primeramente hidrolizan la sacarosa produciendo una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, denominándose también como azúcar invertido, la hidrólisis convierte la rotación positiva (+66,5°) de la sacarosa en rotación negativa, que es promedio de la glucosa (+52,7°) y de la fructosa (-92,4°). Posteriormente, los complejos enzimáticos presentes en la célula establecen una serie de reacciones bioquímicas, metabolizando específicamente a la glucosa [8].

Las vías principales para el metabolismo de la glucosa son dos: La vía EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP) y la vía HEXOSA MONOFOSFATO (HMF), descrito en la Figura 2, de la fermentación alcohólica del etanol, las cuales ocurren normalmente juntas, aunque el 66-85% de la glucosa es metabolizada por la vía EMP [7]. Se detalla a continuación la secuencia de biotransformación:

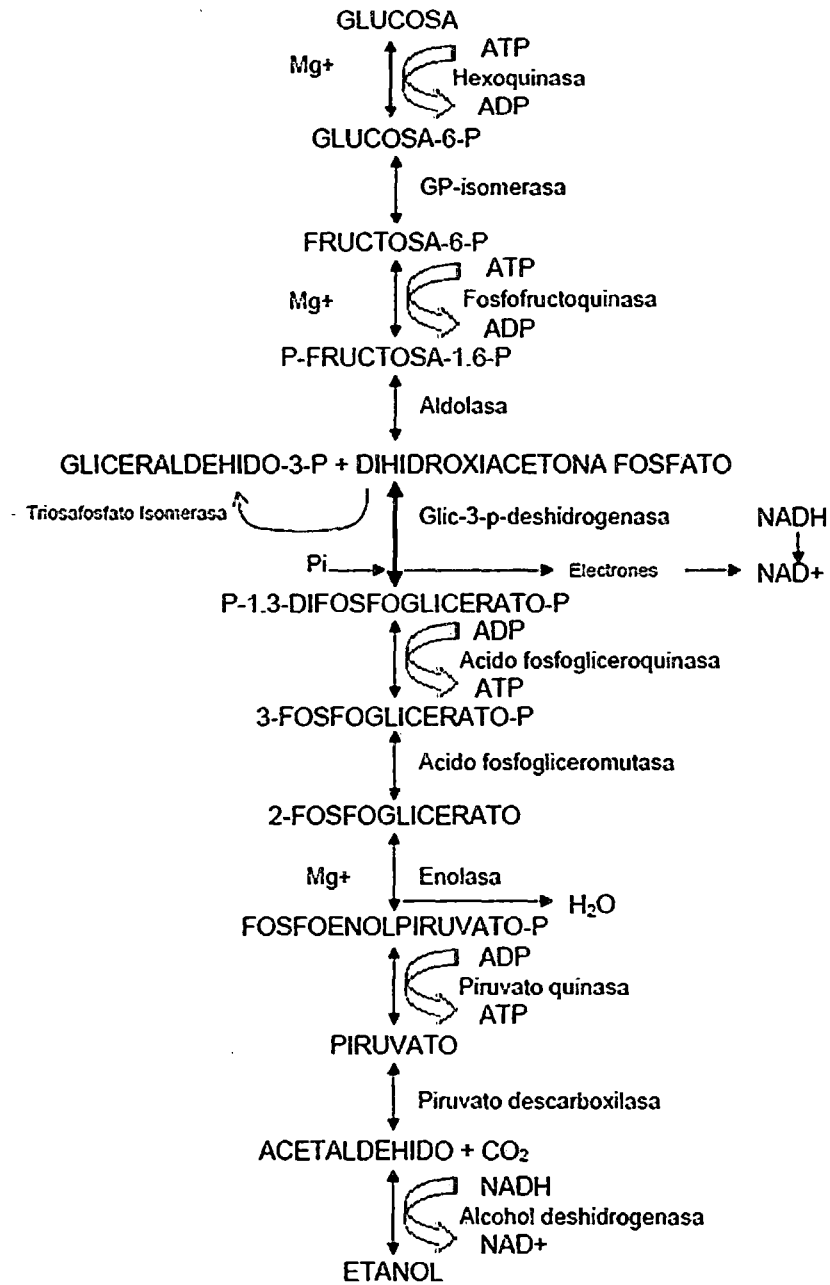
- La sacarosa es hidrolizada por la levadura en sus dos unidades monosacáridos (glucosa y fructuosa). Esta reacción es realizada por enzimas invertasas o sacarosas producidas por la *Saccharomyces cerevisiae*.

- Posteriormente, en presencia de iones de magnesio y por la acción de la enzima hexoquinasa con la colaboración de la coenzima ATP, que contiene fosfato orgánico ligado, la glucosa se transforma en ester ácido fosfórico o glucosa-6-fosfato (fosforilación) y la fructuosa se fosforiliza en fructuosa-6-fosfato.
- Siguiendo el mismo mecanismo de reacción, la glucosa-6-fosfato, bajo la acción de la enzima glucosa-fosfato-isomerasa se transforma en fructuosa-6-fosfato (isomerización) y la fructuosa-6-fosfato, bajo la acción de la enzima fosfofructo-quinasa y de una segunda molécula de ATP como coenzima, en presencia de iones de magnesio, se fosforoliza en el átomo C1 para convertirse en fructuosa-1,6 difosfato.
- La fructuosa-1,6-difosfato se desdoblará bajo la acción de la enzima aldolasa y sin la participación de ninguna coenzima, en dos triosafosfatos: gliceraldehido-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato, formándose el GAP en un 4%. Por la acción de la enzima triosafosfato-isomerasa se genera a partir del dihidroxiacetona-fosfato la gliceraldehido-3-fosfato (GAP) hasta que se instaure un equilibrio entre ambos triosa-fosfatos. Cabe mencionar que 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 de la enzima gliceraldehido fosfato-deshidrogenasa y mediante la captación de fósforo

inorgánico. La enzima ácido fosfoglicérico-fosfo-kinasa trasladará 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. Recuperándose así las moléculas de ATP utilizadas en las etapas 1 y 3.

- Por la acción de la enzima ácido fosfoglicérico-mutasa, el ácido 3-fosfoglicérico se transformará en ácido 2-fosfoglicérico y en presencia de iones de magnesio, la enzima enolasa desprende agua del ácido-2-fosfoglicérico, originándose así el enol del ácido fosfopirúvico. Esta reacción es marcadamente exotérmica, pues por cada mol de hexosa se desprenden 67,2 KJ (16 Kcal) de la cual 29,4 KJ (7 Kcal) por mol se fijan en forma de ATP.
- Por efecto de la enzima piruvato-quinasa se traslada el resto de fosfato al ADP. La energía liberada resultante es aprovechada por la levadura para otros procesos bioquímicos. Cabe mencionar que como producto del desdoblamiento se forma ácido pirúvico, éste ácido pirúvico se desdobra en acetaldehído y dióxido de carbono por la acción de la enzima piruvato-descarboxilasa. Finalmente la enzima alcohol-deshidrogenasa ocasiona la reducción del acetaldehído a alcohol etílico. Como coenzima vuelve a actuar el NAD y el hidrógeno transferido que procede de la etapa 6.

FIGURA 2: Metabolismo de la glucosa vía EMP y HMF



Fuente: VILOCHE, (2004)

2.5 LEVADURAS

Son organismos pertenecientes al reino de los hongos, como tales, son organismos heterotróficos por el hecho de que solo pueden alimentarse de materia ya preformada. Estas se multiplican asexualmente como células individualizadas que se dividen por gemación o por división directa (fisión), hay especies que pueden crecer como filamentos formando el micelio típico de los hongos. En su apartado de reproducción sexual las levaduras producen unas estructuras llamadas ascas, que contienen hasta 8 esporas. Estas ascosporas pueden fusionarse entre sí y originar un nuevo individuo que podrá multiplicarse a través de una división vegetativa [11].

Las levaduras poseen un extraordinario interés económico, pero las más conocidas y comercialmente significativas de las levaduras son las especies y cepas relacionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo ha sido largamente utilizado para fermentar azúcares del arroz, del trigo, de la cebada y del maíz para la producción de bebidas alcohólicas y en la industria de panificación para expandir o aumentar la masa.

2.5.1. 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 y de esta forma han sido siempre parte de la dieta del hombre y los animales. 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 5000 – 6000 a.C. dejando germinar la cebada en vasijas de barro, para luego estrujarla, amasarla y finalmente remojarla en agua, obteniendo la bebida. Es importante mencionar que hacia el año 4000 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 conociera 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 para bebidas datan del año 10 000 a.C. en China, es evidente que estas tecnologías tradicionales han ido mejorando gradualmente. El examen microscópico de los sedimentos de las urnas de cerveza excavadas que datan del 3400 al 1440 a.C. demuestra claramente que la mayoría de las veces contienen levaduras, observándose también que en los sedimentos más recientes su pureza es mayor [20].

La primera producción industrial de una levadura con fines nutricionales tuvo lugar en Alemania durante la Primera guerra mundial. Después de la guerra, el interés en Alemania se desvaneció, pero fue reavivado a mitad de los años treinta, y durante la segunda guerra mundial se produjeron aproximadamente 15 000 toneladas al año de levadura que se incorporaron en la dieta de civiles y del ejército. El interés en producir levadura también se desarrolló en Estados Unidos y Gran Bretaña y continuó después de terminar la segunda guerra mundial en forma bastante poco metódica hasta que se produjo un rápido interés en todo el mundo en mitad de los años cincuenta [20].

2.5.2. Características generales

La mayoría de las levaduras son hongos unicelulares sencillos microscópicos que no forman micelo, por lo tanto se presentan como células sencillas, la mayoría se reproducen asexualmente por gemación y otras especies lo hacen por fisión simple. El tiempo de regeneración de la mayoría de las células es de unos 20 a 30 minutos en condiciones ideales. Las levaduras que pueden reproducirse sexualmente se conocen como “verdaderas”, este proceso implica la formación de ascosporas, sirviendo la propia levadura como asca, de aquí que ellas se clasifican como Ascomicetos; Por el contrario las “falsas” que no producen ascosporas, pertenecen a los hongos imperfectos [22].

2.5.3. Características morfológicas

Los caracteres morfológicos de las levaduras se determinan mediante su observación microscópica. Además, los criterios morfológicos se basan en el modo de reproducción vegetativa de la morfología celular, de la formación de pseudomicelio y de micelio. La forma de la levadura puede ser desde esférica a ovoide, en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada formando un verdadero micelio o un falso micelio. También se diferencian en cuanto a su tamaño, miden de 1-10 μm ancho por 2-3 μm de longitud. Son partes observables de su estructura, la pared celular, el citoplasma, las vacuolas, los glóbulos de grasa y los gránulos, los cuales pueden ser metacromáticos, de albúmina o de almidón. Para poder observar el núcleo es preciso utilizar tinciones especiales, la estructura celular es de tipo eucariótico, pero sin sistema fotosintético, la pared rígida, se caracteriza por la presencia, en su composición, de dos polisacáridos: manano y glucano. Algunas levaduras producen una cápsula constituida por fosfomanos, el núcleo está rodeado de una membrana que persiste durante la división celular. El número de cromosomas es variable de unas a otras. Las levaduras en ningún caso son móviles.

2.5.4. Reproducción de las levaduras

La mayoría de las levaduras se reproducen por gemación multicelular o por gemación polar, que es el mecanismo en el cual una porción del protoplasma sobresale de la pared de la célula y forma una protuberancia, la cual aumenta de tamaño y se desprende como una nueva célula de levadura. La reproducción sexual de las levaduras verdaderas (Ascomycotina) da lugar a la producción de ascosporas, desempeñando la función de asca, la propia célula de la levadura. En la mayoría de las especies de levaduras verdaderas, la formación de ascosporas tiene lugar tras la conjugación de dos células, aunque algunas pueden producir ascosporas sin que exista conjugación previa, teniendo lugar después la conjugación de las ascosporas.

2.5.5. Fisiología de las levaduras

Las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiología, la mayoría necesitan más humedad para crecer y desarrollarse. El intervalo de temperatura de crecimiento de las levaduras es en general, parecido al de los hongos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47°C. Una reacción ácida del medio, próxima a un pH de 4 a 4,5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras,

mientras que en medios básicos, no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos, crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis. El metabolismo aerobio, capacita a las levaduras para oxidar completamente una cierta fracción del sustrato y extraer así la máxima energía para convertir el resto del sustrato en masa celular. En el metabolismo anaerobio, sin embargo, no interviene la cadena respiratoria.

2.5.6. Genero *Saccharomyces* (gr. Sakchar, azúcar; hongo del azúcar)

El género *Saccharomyces* incluye muchos tipos diferentes de levaduras y forma parte del reino de los hongos. La incapacidad para utilizar nitratos y la capacidad de fermentar varios carbohidratos son las características típicas de los *Saccharomyces*. Sus colonias pueden crecer y madurar en 3 días y muestran un color amarillo oscuro. Estas levaduras 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. Muchos miembros de este género se consideran muy importantes en la producción de alimentos.

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

Es un hongo unicelular, cuyo ciclo de vida se alterna dos formas, una haploide y otra diploide. Ambas se reproducen de forma asexual por gemación. Las colonias de estas células en agar mosto son blandas y húmedas, de color crema, estas células son 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.

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación; básicamente este proceso se lleva a cabo cuando esta levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares. En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, por tanto no realiza la fermentación. Desde el punto de vista científico, este microorganismo se ha empleado como modelo simple de la célula eucariota; esto se debe a una serie de ventajas como su facilidad de cultivo y su velocidad de división celular (aproximadamente dos horas).

2.5.8. Taxonomía de la *Saccharomyces cerevisiae*

Sub-división:	Eumycetes
Clase:	Ascomicetes
Sub-clase:	Hemiascomicétidas
Orden:	Endomicetales
Familia:	Sacaromicetaceas
Género:	Saccharomyces
Especie:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.6 INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS

2.6.1. Definición de inmovilización

Proceso en el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida por el espacio, 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 que retiene su actividad catalítica y que puedan ser reutilizadas repetidamente [18]. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte. [17]

2.6.2. Importancia de la inmovilización

La importancia del proceso de inmovilización radica en que se produce un aumento en la estabilidad de la enzima, la productividad enzimática aumenta de gran manera por la capacidad de reutilización y junto con ello la facilidad de recuperación y purificación de los productos. Frecuentemente la estabilidad de las enzimas o células aumenta debido a un proceso de inmovilización o elevándose la concentración de la enzima, de forma que hay que emplear un reactor mucho más pequeño para conseguir la misma productividad, que cuando se usan biocatalizadores inmovilizados. La inmovilización hace que las enzimas o las células se distribuyan uniformemente por todo el reactor, asegurando de esta manera el suministro de sustrato para cada enzima o célula [15].

Una ventaja importante a la hora de usar células o enzimas inmovilizadas es que éstas no afrontarán directamente los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, etc. en el seno del solvente; lo que manifestará un aumento de estabilidad. Comparativamente, las células inmovilizadas 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 mismo. Además de que 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 [9]. El uso de células inmovilizadas facilita el lograr las condiciones para que crezcan las células y se optimice la formación del producto, ya que 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 [9].

2.6.3. Métodos generales de inmovilización

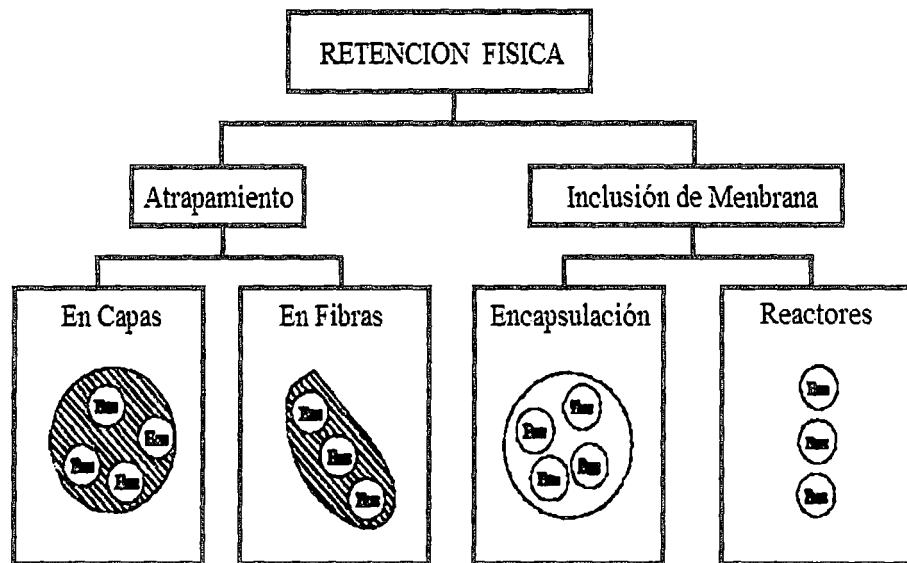
Los criterios que se deben tener en cuenta al momento de seleccionar un método de inmovilización celular es que: *debe ser seguro*, esto implica que se debe evitar el uso de reactivos químicos novedosos y se debe usar materiales aceptables para su aplicación en alimentos; *el proceso no debe ser complicado*, puesto que el uso de soportes caros y procedimientos largos aumentara los costos del proceso; *debe ser suave*, con el fin de mantener la viabilidad celular, la integridad de la membrana o la actividad enzimática; *la actividad celular se debe mantener tanto como sea posible*, esto implica la unión firme de las células, a fin de evitar pérdidas por fuga de células, pero no tan extremas como para provocar restricciones difusionales, y por ultimo *deben ser fuertes mecánicamente*, para que resistan la compactación de las columnas y la abrasión en los reactores con agitación [6].

A continuación se describen los métodos de inmovilización, los que se suelen clasificar en dos grandes categorías: retención física y unión química

2.6.3.1. Métodos de inmovilización de enzimas por retención física

Este método se puede dar de maneras, por atrapamiento e inclusión de membranas, los que a su vez se subdividen en otros dos, los mismos que se muestran en la Figura 3.

FIGURA 3: Métodos de inmovilización mediante retención física



Fuente: ARROYO (1998)

a) Atrapamiento

Se basa en la localización de una célula o una 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. [9]. Entre los polímeros generalmente empleados se encuentran: el colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano [21]. Este proceso se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero, seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles; en el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. Este método, es de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, y como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. No obstante, el atrapamiento igual requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso, no altera los grupos reactivos de la proteína [1].

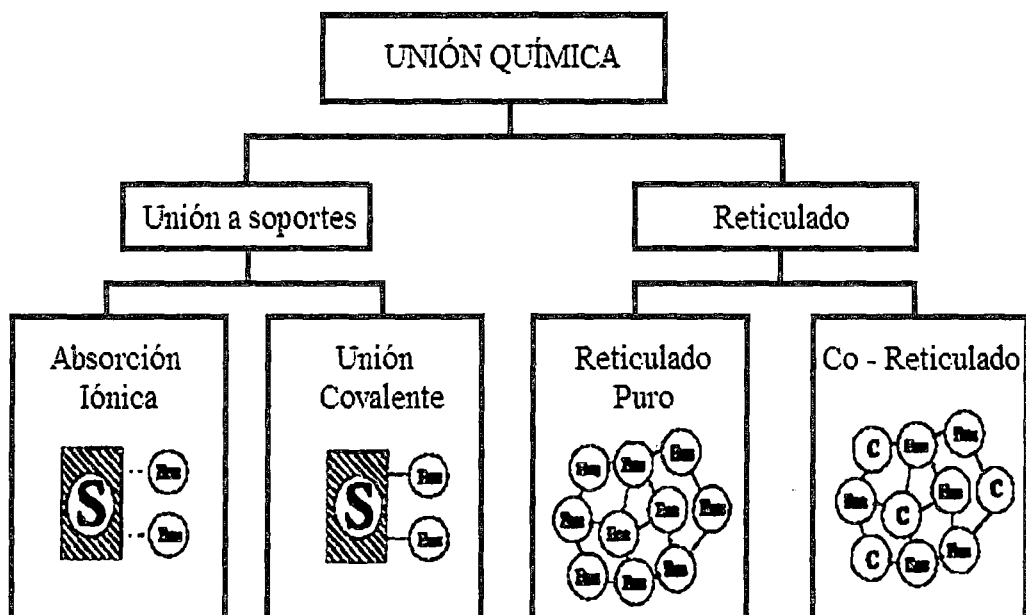
b) Inclusión en membranas, Dividida en dos tipos:

- **Microencapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas “micelas reversas”). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos. [12]
- **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Su funcionamiento se basa en establecer un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor, con la ayuda de una bomba. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas: a) mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana; b) por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana. [1]

2.6.3.2. Métodos de inmovilización de enzimas por unión química

Al igual que en el método anterior, éste método se puede dar de maneras, por unión a soportes y por el reticulado, los mismos que se subdividen en otros dos, la explicación grafica de este método por unión química se encuentra en la Figura 4.

FIGURA 4: Métodos de inmovilización mediante unión química



Fuente ARROYO (1998)

a) Unión a soportes

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador, se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Estos soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos: *Soportes inorgánicos*, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.) y *Soportes orgánicos*, que se clasifican en: 1) Polímeros naturales: a su vez divididos en: polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc.) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.) 2) Polímeros sintéticos: divididos en: poliolefinas (como el poliestireno) polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.) [1]. Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente

- **Adsorción:** En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción, son: *el pH del medio:* pues controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido; *la fuerza iónica:* la misma, que al aumentar produce la desorción de la enzima, puesto que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína; *el diámetro de poro:* debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima; *la presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima,* ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado. Como principales ventajas de este método destacan: su preparación sencilla, su bajo coste, la ausencia de cambios de especificidad enzimática y la estabilidad de los derivados en medios de trabajo con bajo contenido en agua. Los inconvenientes de la adsorción son principalmente: la optimización de las variables que controlan la adsorción, los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico y la unión al soporte es débil [1].
- **Unión covalente:** Se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son

principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina, la histidina y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente. Las ventajas de este método son: manipulación sencilla de los derivados inmovilizados, la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización, los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado y por último presenta una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria. Sin embargo esta inmovilización también presenta una serie de inconvenientes como por ejemplo, es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, donde el proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo [1].

b) Reticulado

También denominado entrecruzamiento o cross-linking, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas. Éste método consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones

intermoleculares entre las moléculas de la enzima. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina. [1].

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína, de esta manera la propia enzima actúa como soporte y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. [14]

2.7 EFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas; en primer lugar se producen cambios en su estabilidad, luego la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores,

cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase, en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno. [1]

2.7.1. Efectos en la estabilidad

El incremento observado en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, se debe principalmente a las siguientes razones [13]:

- Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados.
- Una protección frente a las proteasas en el medio, se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica y evita su autólisis.

- Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
- Existe una alteración del microentorno de la enzima debida a la interacción de la enzima con el soporte. En otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “acuofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la acuofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

2.7.2. Efectos en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que [1]:

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido.

- Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno [1].

a) Efectos difusionales, La difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

- *Resistencias difusionales externas:* Si el soporte es insoluble en el medio de reacción, el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst) que rodea el soporte.
- *Resistencias difusionales internas:* Debido a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, fibra o poro del soporte donde se encuentra la

enzima inmovilizada. Para minimizar estos efectos difusionales se podría aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc.

b) Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato: En un principio, cualquier enzima puede ser inmovilizada sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente. Este “efecto estérico” se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo.

c) Efectos en el microentorno: La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar.

2.8 BIORREACTORES

Un biorreactor, es básicamente, el recipiente en donde se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células ya sean 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. Esta unidad procesadora está constituida por un recipiente cerrado, el cual cuenta con líneas de entrada y salida, 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. [9].

Los reactores tienen como funciones principales:

- Asegurar el tipo de contacto o modo de fluir de los reactantes en el interior del tanque, para conseguir una mezcla deseada con los materiales reactantes.
- Proporcionar el tiempo suficiente de contacto entre las sustancias y con el catalizador, para conseguir la extensión deseada de la reacción.
- Permitir condiciones de presión, temperatura y composición de modo que la reacción tenga lugar en el grado y a la velocidad deseada, atendiendo a los aspectos termodinámicos y cinéticos de la reacción. [4]

Los biorreactores se clasifican según sea la reacción, en forma continua o discontinua o también 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 del 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 [9].

2.8.1. Tipos de biorreactores

2.8.1.1. Biorreactores discontinuos

Son llamados también biorreactores tipo batch o por lotes, se caracterizan por su simpleza, tanto desde el punto de vista del equipo necesario como del de su operación; resultan útiles cuando se emplean enzimas o células libres o cuando se necesita poca cantidad de producto. En este tipo de biorreactores no entra ni sale material durante la reacción, sino más bien, al inicio del proceso se introducen los materiales, luego se lleva a las condiciones de presión y temperatura requeridas y se deja reaccionar por un tiempo preestablecido,

finalmente se descargan los productos de la reacción y los reactantes no convertidos [9]. Las principales limitaciones de un biorreactor discontinuo son:

- Su falta de control sobre importantes parámetros tales como la velocidad específica de crecimiento, la concentración de nutrientes y el hecho de que las células se desarrollen en un estado fisiológico poco definido o cambiante.
- El cese de crecimiento, que es el resultado del agotamiento de un de un nutriente esencial o la acumulación de productos tóxicos.
- Desarrollan un pH desfavorable (en ausencia de una solución tampón) debido a que el microorganismo realiza todo su ciclo de vida.
- Aun durante la fase de crecimiento exponencial, la composición del medio y de las células cambia continuamente, en consecuencia no es posible el crecimiento en estado estacionario que es el crecimiento en un estado sin cambio.
- Acumulan un producto final de metabolismo, por presentar una reacción cerrada.

2.8.1.2. Biorreactores continuos

Los biorreactores 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 equipo. [21] La selección y diseño de estos, se ven influenciados por un gran número de factores, los cuales son esenciales en la definición del sistema de reacción a emplear y en ocasiones predetermina la operación óptima del bioproceso y diseño [10]. Este tipo de equipos permite seleccionar a voluntad la velocidad específica de crecimiento de su cultivo y mantener la población en un estado fisiológico definido, constante y seleccionable. En un cultivo continuo, la población microbiana se mantiene en un estado continuo de crecimiento balanceado, debido a su característica de suministrar sustrato a la misma velocidad con la que se evacua el producto. Además la operación continua es mucho más productiva que una discontinua, puesto que se presta para una operación que entregue productos de calidad constante; aunque presenta algunos puntos adversos tales como la mayor complejidad del equipo y el incompleto aprovechamiento del sustrato [7]. Un proceso de fermentación continua puede realizarse en diversos equipos y modalidades de operación. Los distintos tipos de biorreactores tienen las mismas características generales que los reactores químicos, solo que parcialmente

modificadas y complicadas por la presencia de células. [7]. A continuación se describe dos de los biorreactores más utilizados en los procesos de fermentación:

a) Tipo tanque agitado

Este tipo de biorreactores son versátiles y baratos, particularmente son usados en las reacciones de fase líquida. El volumen dentro de este reactor está tan bien mezclado 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. Este tipo de biorreactores, se denominan así por presentar una 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 [5]. Estos equipos son los más utilizados, su concepción teórica implica la perfecta homogeneidad de su contenido; debido a ello las células están en todo momento en contacto con la composición de la salida y nunca con la de la alimentación [7].

b) Biorreactores tubulares de flujo pistón

El fermentador tubular tiene un comportamiento similar a un tanque agitado operado por lotes, la sucesión de acontecimientos respecto al tiempo se reemplaza por los diversos estados a lo largo del fermentador tubular. Su elección se da cuando se desea operar de forma continua pero sin mezcla de retroceso de reaccionantes y productos [7].

En los biorreactores de flujo pistón el sustrato pasa a través del lecho de células inmovilizadas y el producto se obtiene a la salida, se debe señalar que en este tipo de biorreactor no se hace ningún intento por inducir al mezclado, 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. Es importante mencionar que 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 [9].

2.9 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

El crecimiento de una población bacteriana puede ser representado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu x \quad (3)$$

Donde X es la concentración celular y μ es la velocidad específica de crecimiento siendo constante durante la fase de crecimiento exponencial. Es importante conocer que el valor de μ depende del microorganismo y de los parámetros ambientales del cultivo. Entre estos cabe mencionar la composición del medio de cultivo, la temperatura, pH, etc.

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

$$U = U_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (4)$$

La ecuación (4) describe adecuadamente la cinética de fermentación en condiciones ambientales bajas de inhibición; se debe precisar que cuando existen altas concentraciones de un inhibidor (que puede ser el mismo sustrato o el producto), se tiene que utilizar otros modelos de crecimiento.

2.9.1. Cinética de fermentación discontinua

En una fermentación discontinua primero se carga el fermentador con el medio de cultivo (sustrato) previamente esterilizado, después de regular la temperatura, pH, caudal de aire, etc. Se realiza el inóculo, los balances de una fermentación discontinua son los siguientes:

a) Balance de células

$$F \cdot X_0 - F \cdot X + \mu XV = V \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Donde F , es el caudal de alimentación; X_0 y X es la concentración inicial y final de biomasa, respectivamente y V es el volumen del fermentador; como se sabe en una fermentación discontinua no existe corriente de entrada o salida, por tanto la ecuación (5) queda de la siguiente manera:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (6)$$

b) Balance de sustrato

$$F \cdot S_0 - F \cdot S - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} V = V \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

Simplificando se tiene:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{x/s}} \quad (8)$$

c) Balance de producto

$$F \cdot P_0 - F \cdot P + \frac{\mu X}{Y_{x/p}} V = V \frac{dP}{dt} \quad (9)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{x/p}} \quad (10)$$

Para el modelo de Monod resulta:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S} \quad (11)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \cdot \frac{S \cdot X}{K_s + S} \quad (12)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu_m}{Y_{x/p}} \cdot \frac{S \cdot X}{K_s + S} \quad (13)$$

El sistema de ecuaciones diferenciales (11), (12) y (13) se resuelve en forma simultánea o se utiliza la ecuación que describe el rendimiento celular, la cual es la siguiente:

$$X = X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S) \quad (14)$$

Por tanto, reemplazando la ecuación (14) en la ecuación (12), se obtiene la siguiente ecuación:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \cdot \frac{S \cdot (X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S))}{K_s + S} \quad (15)$$

Donde la única incógnita es S , puesto que μ_m , K_s , X_0 y $Y_{x/s}$ son constantes cinéticas, por lo tanto se puede resolver numérica y analíticamente.

2.9.2. Cinética de fermentación continua

Haciendo un balance a cualquier régimen en un reactor tipo tanque completamente agitado se obtiene:

$$\text{Acumulación} = \text{flujo de entrada} - \text{flujo de salida} + \text{generación} \quad (16)$$

a) Balance de células

$$F \cdot X_0 - F \cdot X + \mu X V = V \frac{dX}{dt} \quad (17)$$

b) Balance del sustrato

$$F \cdot S_0 - F \cdot S - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} V = V \frac{dS}{dt} \quad (18)$$

c) Balance del producto

$$F \cdot P_0 - F \cdot P + \frac{\mu X}{Y_{x/p}} V = V \frac{dP}{dt} \quad (19)$$

Donde V es el volumen del fermentador, F , es el caudal y X , S y P con la concentración de células, sustrato y el producto respectivamente.

2.9.2.1. Cinética del fermentador continuo tipo tanque

Como la alimentación por lo general es estéril, la ecuación (17) que describe el balance de células, se puede simplificar de la siguiente manera:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} \cdot X \quad (20)$$

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu - D) \quad (21)$$

Donde:

F/V = Se denomina velocidad de dilución, (D), que es el número de volúmenes de medio que pasa por el fermentador (h^{-1}) y es el recíproco del tiempo de residencia ($\tau = VF$)

F = Caudal volumétrico (L/h).

V = volumen de trabajo constante (L)

X_o = Concentración de células en el medio alimentado (g/l).

X = Rapidez específica del crecimiento (h^{-1})

La ecuación de balance del sustrato (18) quedaría de la simplificada de la siguiente manera:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_o - S) - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \quad (22)$$

De la misma manera la ecuación de balance del producto (19) queda expresada de la siguiente manera:

$$\frac{dP}{dt} = -D.P + \frac{\mu X}{Y_{x/p}} \quad (23)$$

$$\frac{dP}{dt} = -D.P + Q_p \quad (24)$$

Por tanto, se tienen 3 ecuaciones (de alimentación, sustrato y producto) y se tienen 4 incógnitas, por lo que se requiere de una ecuación más. Para completar se usa una ecuación cinética del tipo $\mu = f(S, I)$, donde S es el sustrato e I un inhibidor. En el caso más simple, en ausencia de inhibición, se utiliza la ecuación de Monod. Las ecuaciones (21), (22) y (24), describen la operación de un biorreactor tipo tanque operado bajo cualquier régimen. Pero si se centra en un régimen estacionario, las derivadas con respecto al tiempo de estas ecuaciones serán nulas, por tanto:

$$\mu = D \quad (25)$$

$$X = Y_{x/s}(S_0 - S) \quad (26)$$

$$Q_p = D \cdot P \quad (27)$$

Las ecuaciones (25), (26) y (27) representan la operación de un biorreactor tipo tanque en estado estacionario, cuya solución, utilizando la ecuación de Monod es:

$$S = \frac{D \cdot K_s}{(\mu_m - D)} \quad (28)$$

$$X = Y_{x/s} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D} \right) \quad (29)$$

2.10 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

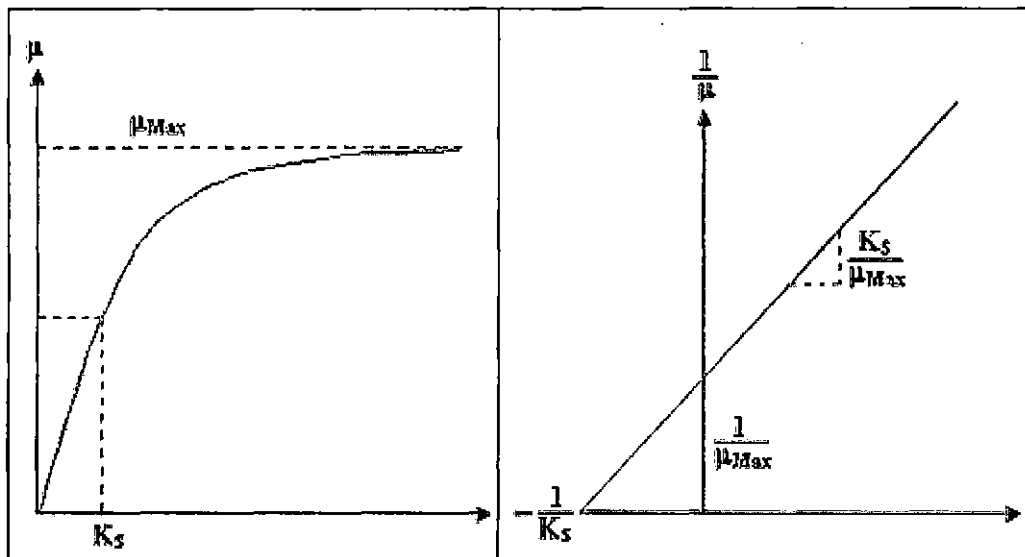
Para determinar los parámetros de crecimiento tales como K_s y μ_m se debe obtener datos de varios estados estacionarios, lo que permite construir un gráfico tipo Monod μ vs S , luego tomar sus recíprocos $1/\mu$ vs $1/S$, obteniendo μ_m del

intercepto de la recta con $1/\mu$ y K_s de la pendiente K_s/μ_m , por tanto reordenando la ecuación (28) se obtiene:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S} \quad (30)$$

Graficando $1/\mu$ en función de $1/S$, los puntos se ajustan a una recta, tal como se observa en la Figura 5.

FIGURA 5: Determinación de los parámetros cinéticos



Fuente: VILOCHE, (2004)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. Materia prima

- Sacarosa (azúcar de mesa blanca).

3.1.2. Reactivos Biológicos

- Levadura seca: *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann)
- Urea Q.P. (DIFCO)
- Infusión de papa
- Glucosa Q.P. (DIFCO)
- Sacarosa Q.P. DIFCO)
- Fosfato ácido de potasio Q.P (Merck)
- Sulfato de magnesio heptahidratado Q.P (Merck)
- Alginato de sodio Q.P. (Fluka)
- Azul de metileno

3.1.3. Reactivos químicos

- Agua destilada
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico Q.P.(SIGMA)
- Acetato de sodio (Merck)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Ácido clorhídrico Q.P. (Merck)
- Cloruro de calcio Q.P. (Merck)
- Hidróxido de sodio Q.P (Merck)

3.1.4. Materiales y equipos

- Matraces erlenmeyer PYREX 100, 250 y 500 ml
- Pipetas PYREX 1,2, 5 y 10 ml
- Tubos de Ensayo PYREX 5, 10 y 15 ml
- Vasos de precipitación PYREX de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml
- Equipo de destilación de pequeña escala con balón de vidrio de 100 ml
- Envases con tapa de vidrio de 20 ml
- Tanque de alimentación de 6 L de capacidad PYREX
- Peras de decantación PIREX de 500 ml
- Picnómetro de 25 ml

- Balanza Adventurer de OHAUS. Model (AR2140)
- Balanza analítica
- Microscopio electrónico
- Cocina electrónica
- Bomba peristáltica HEIDOLPH Pump Drive 5201
- Fuente de poder ALINCO DM – 130 MVZ
- Refrigerador
- Estabilizador automático High Technology POWER 600 VA
- Autoclave Electric Pressure Steam Sterilizee, Model 25X
- Termostato
- Gradilla metálica
- Cámara de Neubauer
- Agitador Magnético HW - KESSEL, Limarec 2
- Barras giratorias marca SPI, modelo octagonal
- Equipo para la producción de perlas de diámetro uniforme, hipodérmico
20 ml, aguja N° 21 G
- Espectrofotómetro JENWAY escala 6405 UV/Vis.
- pH meter Accumet Model 10
- Registrador de datos gráficos Xplorer GLX PS-2002 PASCO data online
con sensor de de temperatura

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Determinación de los parámetros cinéticos de la levadura

Saccharomyces cerevisiae

Para determinar los parámetros cinéticos (K_m , K_i y μ_m) de la célula se realiza la bioconversión de la sacarosa en solución a diferentes concentraciones (2, 4, 6 % m/v), determinándose la velocidad inicial de reacción de cada una de las soluciones a diferentes concentraciones de sustrato; la concentración de las células (masa seca de levadura inmovilizada en la solución de sacarosa), es la misma para todos los tratamientos. El ajuste realizado es por el método de mostrado en la Figura 5 y aplicando la ecuación (30).

a) Determinación de la velocidad específica de crecimiento a diferentes concentraciones de sacarosa

Para este proceso lo primero que se hizo fue activar el inóculo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, disolviendo 0,066 g de la levadura granulada en 10 ml de caldo sacarosado previamente esterilizado, dejándolo reposar por 24 horas. Activado el inóculo se procedió a depositarlo en el reactor discontinuo de 1000 ml, conteniendo 590 ml del medio de propagación de caldo

sacarosado (sacarosa 40 g/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 4,5). Una vez cargado el reactor, con las levaduras y el sustrato, se da inicio a la incubación a 30°C con una agitación constante con la ayuda de un agitador magnético. La toma de muestra se realizó cada hora, evaluándose el número de levaduras activas/ml con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio a 400 aumentos. Con los datos obtenidos, se grafica el tiempo vs \ln (levaduras activas), con lo que se determina la velocidad específica de crecimiento.

3.2.2 Determinación de la curva patrón celular

a) 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 0,9; luego se llevó los tubos con las diluciones de levaduras al espectrofotómetro y se realizaron las lecturas a 650 nm. Con los datos obtenidos de concentración celular y absorbancia se elaboró la curva de calibración absorbancia vs concentración (g/l).

b) Determinación de la concentración de levadura por el método del recuento celular

Paralelamente a las lecturas de absorbancia, de las diluciones de levadura que se encontraban en diferentes tubos de ensayo 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 estos datos se trazó la curva de calibración; concentración (g/l) vs levadura (lev/ml).

3.2.3 Determinación de la curva patrón de azúcares reductores

Para esta determinación se prepara una solución patrón de glucosa al 2% p/v y a partir de ésta, se hace diluciones de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,50 y 1,75 g/l; luego se toma 1 ml de las diluciones y se las lleva a un tubo de ensayo que posea tapa rosca, a este mismo tubo se le agrega 1 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se tapan los tubos, se agita y se lleva la mezcla a ebullición durante 5 minutos, luego, los tubos son llevados a un proceso de enfriamiento colocándolos en agua con hielo; una vez que los tubos estén fríos, se le agrega 10 ml de agua destilada a cada una de las diluciones. Paralelamente a este proceso se prepara una muestra en blanco que contiene 1 ml de agua destilada y 1 ml de DNS la cual sigue el mismo proceso que siguieron las

diluciones. Finalmente todas las soluciones incluyendo la muestra en blanco, se dejan en reposo durante 15 minutos, para finalmente proceder con las lecturas de absorbancia a 540 nm, tomando como referencia el blanco. Este proceso se realizó para poder relacionar la concentración de la glucosa en función de la absorbancia

3.2.4 Determinación de la curva patrón de azúcares reductores totales

Para esta determinación, primero se realiza la inversión de la sacarosa mediante una hidrólisis ácida, para ello, lo primero que se hace es preparar una solución de sacarosa al 6% y a partir de esta se realizan diluciones obteniendo soluciones sacarosadas de 0,75; 1,5; 2,25; 3; 3,75; 4,5 y 5,25 g/l; luego se extrae 1 ml de cada una de las soluciones anteriores y se las coloca en un tubo de ensayo que posea tapa rosca, seguidamente se le agrega a todas las diluciones 1 ml de HCl 2N, se tapan los tubos y se lleva la mezcla a ebullición durante 5 minutos; al término de esto, se procede a enfriar las soluciones, colocando los tubos en agua bien fría, una vez enfriadas las soluciones se les añade 1 ml de NaOH 2N con el fin de neutralizar el ácido. A continuación, se extrae 1 ml de la muestra del tubo y se lo coloca en otro tubo que también posee tapa rosca; a este mismo tubo se le agrega 1 ml de DNS, se tapa, se agita y se lleva a ebullición durante 5 minutos; finalmente

se deja enfriar en un baño de agua fría y posteriormente a cada una de las diluciones se agrega 10 ml de agua destilada. Paralelo a este proceso se prepara un tubo de muestra en blanco, conteniendo 1 ml de agua destilada y se sigue el mismo tratamiento que las otras diluciones. Las lecturas de absorbancia se dan a 540 nm se realizan al cabo de 15 minutos, tomando como referencia el blanco; esto con el fin de relacionar la concentración del azúcar en función de la absorbancia.

3.2.5 Inmovilización celular

El proceso de inmovilización celular se llevó a cabo utilizando el método de atrapamiento en gel usando como soporte el alginato de sodio, en donde las células quedaron inmersas en la matriz del soporte; para ello, lo primero que se realizó fue disolver 2,5 g de alginato de sodio en un vaso precipitado con 60 ml de agua destilada en ebullición; homogenizada la solución, se dejó enfriar hasta los 38°C; luego, se disolvió 3 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en 40 ml de agua destilada; es importante precisar que ésta solución fue llevada a baño maría hasta que alcanzó una temperatura de 38°C, luego fue mezclada con la solución de alginato de sodio preparada anteriormente. Se debe precisar, que ésta última solución fue homogenizada manteniendo la temperatura de 38°C. Finalmente, con una jeringa de 25 ml de capacidad y una aguja N° 21 a la cual se le cortó el largo,

se hizo gotear la solución levaduras – alginato sobre 250 ml de una solución fría de CaCl₂ al 1,5% la cual, con la ayuda de un magneto, se mantuvo en constante agitación. Las esferas producidas fueron almacenadas por dos horas en la misma solución de CaCl₂ al 1,5 % a una temperatura de 4°C para darle mayor consistencia, y luego de ello se lavaron con agua destilada y se almacenaron a 4°C en un buffer acetato con un pH de 4,5 y una concentración de sacarosa al 2%.

a) Determinación del volumen y diámetro de la esfera

Para determinar el volumen de las esferas se tomó una muestra de las mismas de la solución levaduras-alginato y se las llevó a una probeta que contenía un volumen conocido de agua destilada, se anotó el volumen desplazado y se retiró el líquido de la probeta, seguidamente se procedió a contar el número total de esferas que se introdujeron en la probeta y se realizaron los cálculos para determinar el volumen promedio y el diámetro de cada una de las esferas, para ello se hizo uso de la ecuación de volumen de la esfera, la cual es la siguiente:

$$V_e = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (31)$$

3.2.6 Determinación del grado de actividad de la *Saccharomyces cerevisiae*

Para la determinación del grado de actividad, es necesario realizar pruebas donde se observe la producción de CO₂ de la levadura, para ello esta prueba se dividió en dos partes:

a) Producción de CO₂ de las levaduras libres e inmovilizadas

En dos matraces de 250 ml, se colocó la misma cantidad de levaduras libres, en uno eran levaduras inmovilizadas y en el otro fueron levaduras libres, ambos matraces contenían una solución buffer de pH 4,5 con una concentración de sacarosa al 15%, una vez hecha la mezcla, se agitó y se procedió a pesar cada uno de los matraces, anotado su peso; se introdujeron en una cámara térmica que se encontraba a una temperatura de 30°C, luego de 30 min se volvió a pesarlos, previa agitación (la agitación debe ser suave); éstas mediciones se realizaron sucesivamente cada media hora por un tiempo determinado.

b) Producción de CO₂ con levaduras inmovilizadas a diferentes concentraciones

En tres matraces de 250 ml, conteniendo una solución buffer de pH 4,5 con una concentración de sacarosa al 15% se colocaron diferentes concentraciones de levaduras inmovilizadas, una vez hecha la mezcla, se agitó y se procedió a pesar cada uno de los matraces, anotado su peso, se introdujeron en a una cámara térmica que se encontraba a una temperatura de 30°C, luego de 30 min se volvió a pesarlos, previa agitación suave, estas mediciones se realizaron sucesivamente cada media hora por un tiempo determinado.

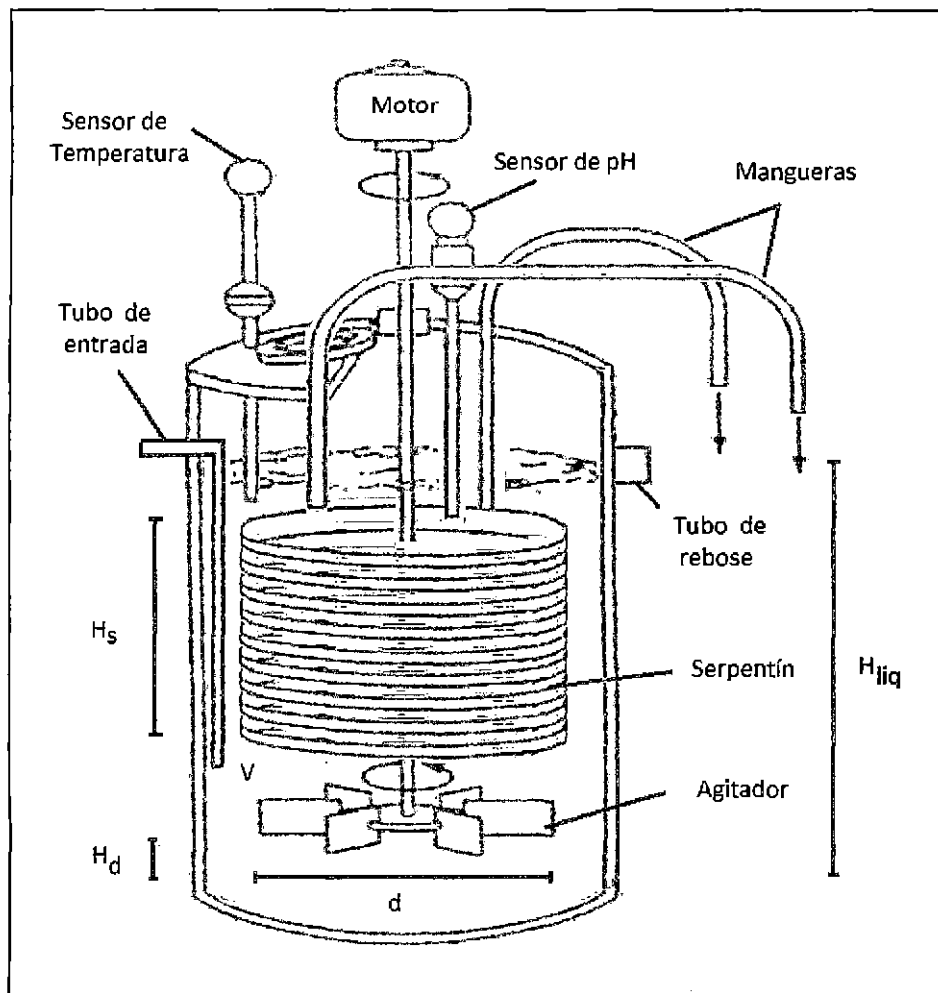
3.3 CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR

Para el presente trabajo se diseñó y construyó un reactor tipo tanque de material acrílico transparente con una capacidad máxima de 3 litros, este equipo está provisto de un serpentín y un agitador Rushtong de 6 paletas, ambos de material de acero inoxidable, este equipo cuenta con una tapa hermética, la cual posee dos orificios para el ingreso de los dos sensores con los que se controlará el pH y la temperatura del medio de fermentación.

La función que cumple el serpentín será de ayudar a mantener una determinada temperatura en el interior del biorreactor, esto se logrará con la ayuda de un termostato, el cual estará conectado al serpentín mediante unas mangueras por las que circulará el agua, a la temperatura que el operador disponga en el termostato. El agitador, en cambio cumplirá la función de mantener la uniformidad de la temperatura y pH del medio de fermentación; éste agitador será accionado por medio de un motor, el cual a su vez, está enlazado a una fuente de poder; la velocidad del agitador varía conforme la potencia de la fuente, de ésta manera se controla la agitación del interior del biorreactor. Como se había mencionado antes, éste biorreactor cuenta con dos sensores; uno de pH y otro de temperatura, ambos unidos a sus respectivos equipos analógicos, para un correcto control de las variables de estudio.

El ingreso del sustrato es controlado con la ayuda de una bomba peristáltica, la cual variara su flujo según el tiempo de residencia al que se opere; la salida del producto se da por rebose, y se almacena en una pera de decantación, en donde se produce la separación del etanol y del CO₂. Para finalmente ser almacenado en sus respectivos recipientes para su posterior análisis.

FIGURA 6: Biorreactor continuo de tanque agitado



FUENTE: Elaboración propia

TABLA 1: Características de construcción del biorreactor

Características	Símbolo	Medida
Volumen	V	3 l
Altura del líquido	H_{liq}	16,5 cm
Altura del serpentín	H_s	9,0 cm
Altura del agitador respecto al fondo	H_d	4,0 cm
Diámetro del agitador	d	8,0 cm

FUENTE: Elaboración propia

3.4 PRODUCCIÓN DE ETANOL

3.4.1. Esterilización del reactor y del medio de fermentación

Para cada una de las experiencias de producción de etanol, se realizó una esterilización del reactor con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, seguido de varios lavados con agua destilada, para que no queden residuos de hipoclorito en el reactor. El medio de fermentación (sacarosa, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y KH_2PO_4), se esterilizó con la ayuda de una autoclave, durante 15 minutos a una temperatura de 121°C.

3.4.2. Fermentación discontinua

Para el inicio de esta fermentación primero se carga el reactor con 2000 ml del medio de fermentación, luego se adiciona 1000 ml de las levaduras inmovilizadas (esferas de alginato de calcio conteniendo levaduras). Seguidamente se tapa el reactor, se insertan los sensores de pH y de temperatura y se enciende el agitador a una velocidad lenta con la finalidad de mantener una concentración uniforme en el reactor y que las levaduras inmovilizadas tengan mayor contacto con la solución buffer - sacarosa. La fermentación discontinua culmina cuando se origina un gran desprendimiento de CO₂; en este momento se da por terminado el tiempo de inducción o activación, y se inicia el proceso de fermentación continua.

3.4.3. Fermentación continua

Esta fermentación se inicia con la alimentación continua del medio de fermentación por la parte inferior del tanque y con la salida del producto por rebose. Es importante mencionar que solo cuando la concentración del producto (etanol) llegue al estado estacionario, es decir, cuando esta concentración se estabilice, se procederá a tomar la muestra para proceder a la determinación de la concentración de etanol por el método del picnómetro.

3.4.4. Control de temperatura

El control de la temperatura en el reactor tipo tanque se realizó por medio de un termómetro digital, que cuenta con un sensor de temperatura, este sensor es ubicado en el interior del reactor, de tal modo que se encuentre en contacto con la solución de fermentación, es importante precisar este reactor cuenta con un serpentín interior de acero inoxidable, por el cual se hace circular agua fría o caliente, según convenga, para lograr mantener estable la temperatura.

3.4.5. Control de pH

Para este control se utiliza un equipo medidor de pH, donde su sensor se encontrará en contacto con la solución de fermentación durante toda la experiencia; se debe precisar que la solución que se encuentra en el tanque de alimentación, y la que se encuentra en el interior del tanque, junto con las levaduras, son las mismas y, éstas son reguladas antes de la experiencia a un pH fijo con una solución de buffer acetato. Esta solución buffer permite que el pH se mantenga invariable durante todo el proceso de fermentación.

3.4.6. Producción de etanol

La producción de etanol por fermentación continua en un biorreactor tipo tanque con agitación utilizando células inmovilizadas, se realizó poniendo en contacto continuo un flujo de medio de fermentación con las levaduras inmovilizadas. En el cual, el sustrato se difunde hacia el interior de la esfera y de la levadura, produciéndose la conversión del azúcar en etanol, para luego difundirse hacia el medio de fermentación. La producción de etanol se realizó variando la temperatura (°C), tiempo de residencia (h) y el pH, mediante un diseño experimental, manteniendo constante el volumen de sustrato y del biocatalizador.

3.4.7. Determinación de la concentración de etanol

Se tomó una muestra de 50 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, el cual se realiza de la siguiente manera:

Con un picnómetro de 25 ml de capacidad, se calcula el volumen real del picnómetro, esto se realiza pesándolo vacío y luego pesándolo con una muestra de agua destilada a una temperatura fija, seguidamente mediante unos cálculos

sencillos mostrados en el anexo 4 se halla el volumen real, una vez hallado este volumen se procede en llenar el picnómetro esta vez con la muestra del producto obtenido de la fermentación continua, ésta cantidad es vaciada en un balón de vidrio de 100 ml de capacidad. A éste mismo balón se le agrega 12,5 ml de agua destilada, se lo une a un equipo de destilación y se da inicio al proceso, hasta obtener 22,5 ml de destilado, esta solución recogida, se la lleva al picnómetro y el resto se afora con agua destilada; por último se lleva la solución del picnómetro a la misma temperatura con la que se lo calibró inicialmente y se procede a pesarlo, de esta forma se obtiene la masa de la muestra de destilado y como anteriormente se había calculado el volumen real del picnómetro, podemos hallar la densidad de la muestra mediante la siguiente ecuación $\rho = m/v$; A partir de este resultado se determina la concentración de etanol en gramos por litro, según el anexo de "determinación del contenido de etanol". Es importante precisar que el picnómetro debe estar seco por fuera para el momento del pesado y se debe utilizar una balanza analítica que posea por lo menos 4 cifras para mejor exactitud de las masas.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Teniendo como objetivo obtener etanol mediante fermentación continua utilizando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio en un biorreactor tipo tanque, fueron realizados dos planeamientos experimentales, técnica que está ampliamente discutida en la literatura [3].

En el planteamiento factorial experimental I, (2k-p), se estudió cuatro (4) variables: temperatura (X_1), concentración de sustrato (X_2), tiempo de residencia (X_3) y pH (X_4) con el objetivo de identificar las variables más significativas del proceso. En el planteamiento factorial II, (2k), se procedió a realizar un diseño experimental 2k (con tres puntos centrales) cuyas variables son: temperatura (X_1), tiempo de residencia (X_2) y pH (X_3), manteniendo constante la concentración del sustrato.

Todas las variables fueron estudiadas a dos niveles, codificados con -1 y +1 y los valores reales correspondientes a esos niveles se presentan en la tabla (2) y (3).

TABLA 2.- Planteamiento experimental factorial I

VARIABLES		NIVEL (-)	NIVEL (+)
X ₁ = Temperatura	(°C)	24	32
X ₂ = Concentración de sustrato	(g/l)	100	200
X ₃ = Tiempo de residencia	(h)	3,0	5,0
X ₄ = pH		4,0	5,0
Y ₁ = Rendimiento			
Y ₂ = Productividad			

FUENTE: Elaboración Propia**TABLA 3.- Planteamiento experimental factorial II**

VARIABLES		NIVEL (-)	NIVEL (+)
X ₁ = Temperatura	(°C)	24	32
X ₂ = Tiempo de residencia	(h)	3,0	5,0
X ₃ = pH		4,0	5,0
Y ₁ = Rendimiento			
Y ₂ = Productividad			

FUENTE: Elaboración Propia

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico se realiza a través de un análisis de regresión, el mismo que puede ser ajustado para la variable dependiente (Y_i) obteniendo un polinomio de primer orden:

$$Y_i = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i$$

Donde:

Y_i = Valor de la variable dependiente

X_i = Valor de la variable independiente

B_0, B_i = Coeficientes

Tal como se observa en la tabla (2) y (3), existen dos variables dependientes (Y_i), por tanto se obtendrá dos ecuaciones de primer orden, la primera correspondiente al rendimiento y la segunda, a la productividad.

La matriz del planteamiento experimental factorial I y II, es mostrada en la tabla (4) y (5) respectivamente; todas las estas experiencias se realizaron en forma aleatoria, con el fin de evitar la introducción de sesgos en el experimento.

TABLA 4.- Matriz experimental del diseño experimental factorial I, 2^{k-p}

N	VARIABLES CODIFICADAS				VARIABLES NATURALES			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	T	S	Tr	pH
1	-1	-1	-1	-1	24	100	3,0	4,0
2	+1	-1	-1	+1	32	100	3,0	5,0
3	-1	+1	-1	+1	24	200	3,0	5,0
4	+1	+1	-1	-1	32	200	3,0	4,0
5	-1	-1	+1	+1	24	100	5,0	5,0
6	+1	-1	+1	-1	32	100	5,0	4,0
7	-1	+1	+1	-1	24	200	5,0	4,0
8	+1	+1	+1	+1	32	200	5,0	5,0

FUENTE: Elaboración propia

TABLA 5.- Matriz experimental del diseño experimental factorial II, 2^k

N	VARIABLES CODIFICADAS			VARIABLES NATURALES		
	X ₁	X ₂	X ₃	T	Tr	pH
1	-1	-1	-1	24	3,0	4,0
2	+1	-1	+1	32	3,0	5,0
3	-1	-1	+1	24	3,0	5,0
4	+1	-1	-1	32	3,0	4,0
5	-1	+1	+1	24	5,0	5,0
6	+1	+1	-1	32	5,0	4,0
7	-1	+1	-1	24	5,0	4,0
8	+1	+1	+1	32	5,0	5,0
9	0	0	0	28	4	4.5
10	0	0	0	28	4	4.5
11	0	0	0	28	4	4.5

FUENTE: Elaboración propia

Los modelos hallados fueron testados por el análisis de variancia (Teste F) y el coeficiente de correlación. El procesamiento de los datos y el análisis estadístico, así como los gráficos fueron elaborados mediante un paquete estadístico Statgraphics Centurion.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

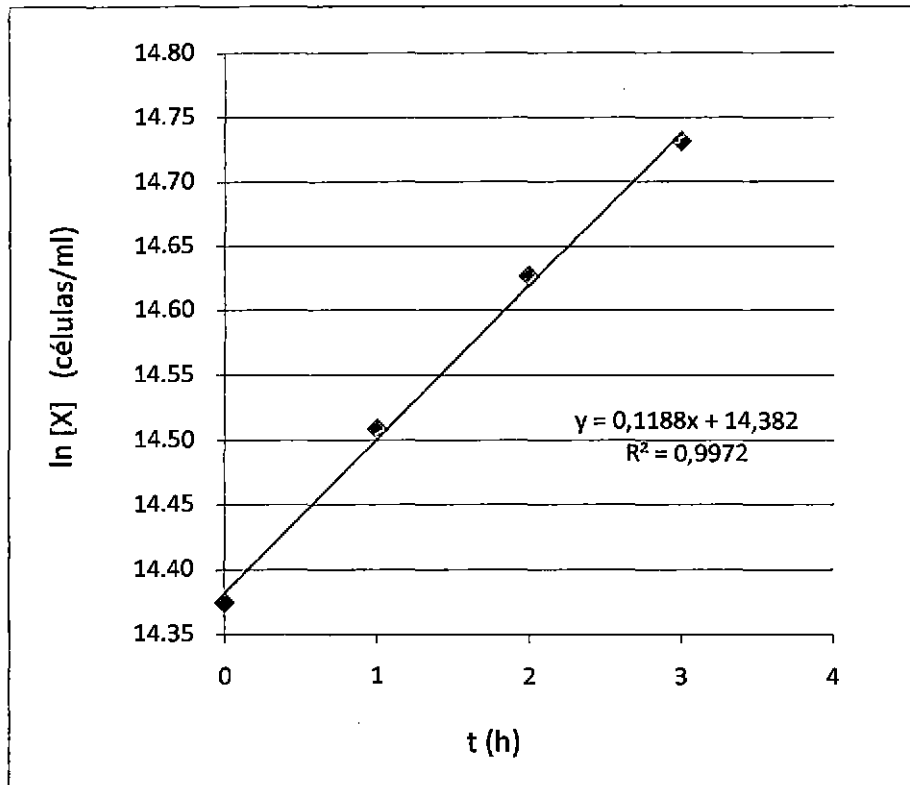
4.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Las siguientes tablas y gráficos muestran los datos con lo que se determinará la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones.

FIGURA 7: Crecimiento celular al 2% de sacarosa

Tiempo (h)	X (células/ml)	Ln [X] (células/ml)
0	18 E+5	14,38
1	20 E+5	14,51
2	23 E+5	14,63
3	25 E+5	14,73
4	25 E+5	14,71
5	23 E+5	14,63

FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia

La ecuación que expresa el crecimiento celular al 2% de sacarosa es:

$$\ln[X] = 0,1188(t) + 14,382$$

Cuya pendiente es la velocidad específica de crecimiento (μ), por tanto:

$$\mu = 0,1188 \text{ h}^{-1}$$

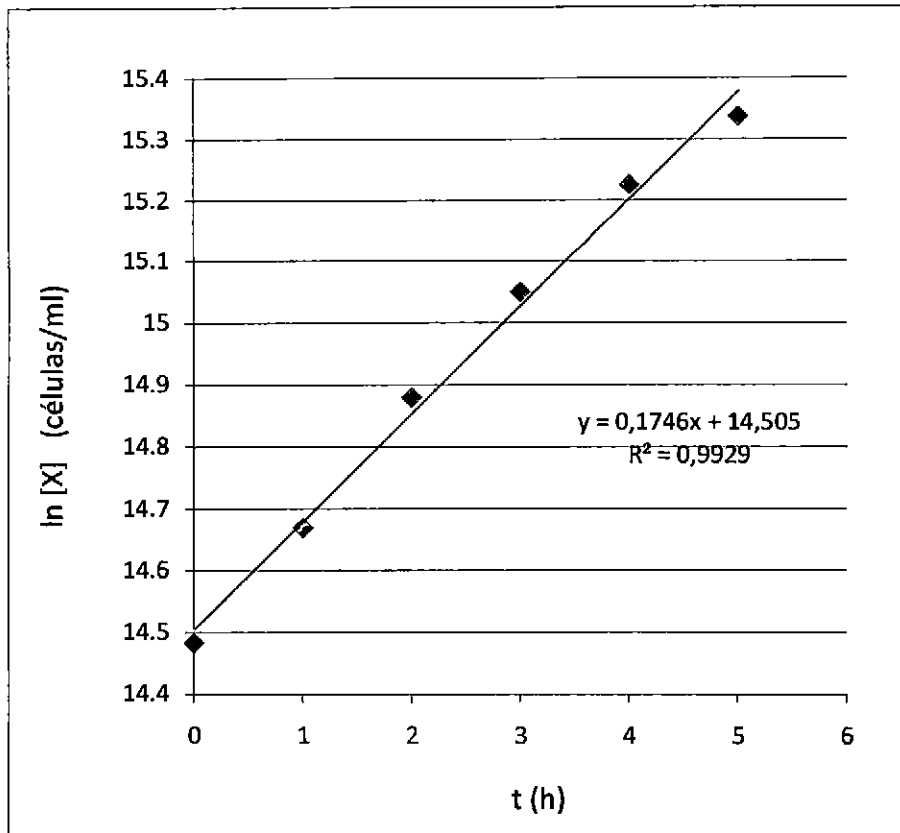
El tiempo de generación de la levadura para una solución al 2% de sacarosa se determina de la siguiente manera:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0,1188} = 5,83 \text{ h} = 350 \text{ min}$$

FIGURA 8: Crecimiento celular al 4% de sacarosa

Tiempo (h)	X (células/ml)	Ln (X) (células/ml)
0	20 E+5	14,48
1	24 E+5	14,67
2	29 E+5	14,88
3	34 E+5	15,05
4	41 E+5	15,23
5	46 E+5	15,34
6	45 E+5	15,32
7	36 E+5	15,10
8	26 E+5	14,76
9	25 E+5	14,73

FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia

La ecuación que expresa el crecimiento celular al 4% de sacarosa es:

$$\ln[X] = 0,1746(t) + 14,505$$

Por tanto la velocidad específica de crecimiento (μ) es:

$$\mu = 0,1746 \text{ h}^{-1}$$

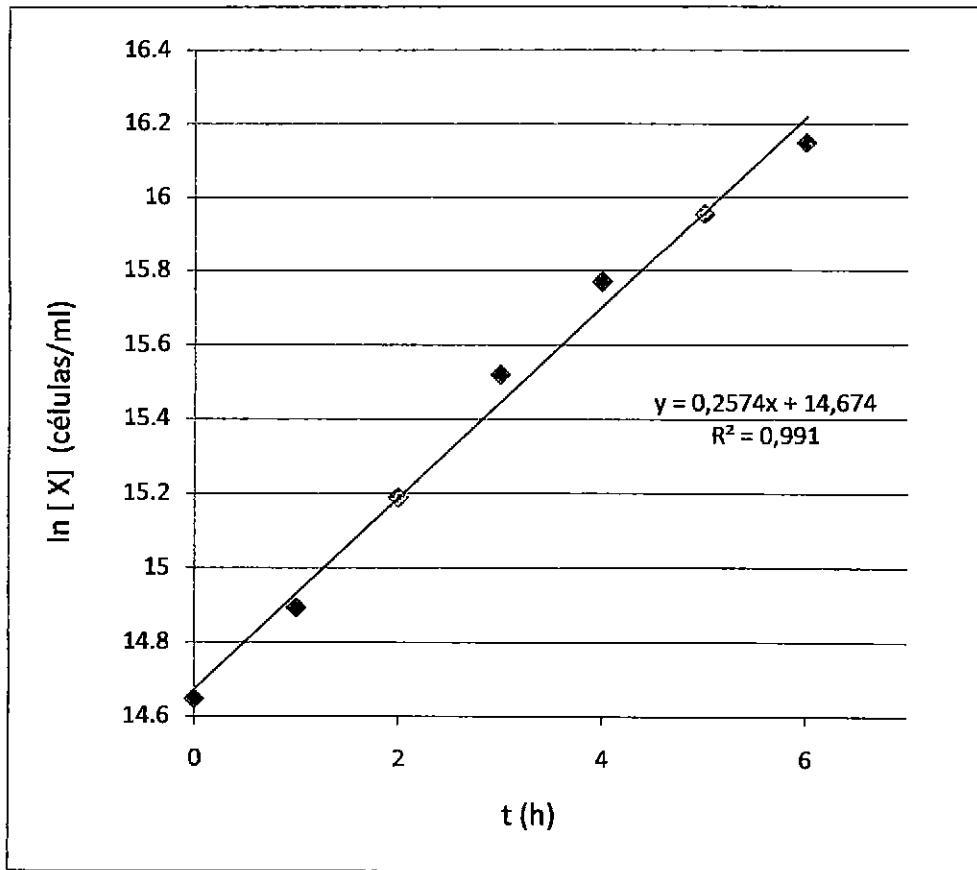
Y el tiempo de generación de la levadura para una solución al 4% de sacarosa es:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0,1746} = 3,97 \text{ h} = 238 \text{ min}$$

FIGURA 9: Crecimiento celular al 6% de sacarosa

Tiempo (h)	X (células/ml)	Ln (X) (células/ml)
0	23 E+5	14,65
1	29 E+5	14,89
2	40 E+5	15,19
3	55 E+5	15,52
4	71 E+5	15,77
5	85 E+5	15,96
6	103 E+5	16,15
7	118 E+5	16,28
8	124 E+5	16,33
9	128 E+5	16,36

FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia

La ecuación que expresa el crecimiento celular al 6% de sacarosa es:

$$\ln[X] = 0,2574(t) + 14,674$$

Por tanto la velocidad específica de crecimiento (μ) es:

$$\mu = 0,2574 \text{ h}^{-1}$$

Y el tiempo de generación de la levadura para una solución al 6% de sacarosa es:

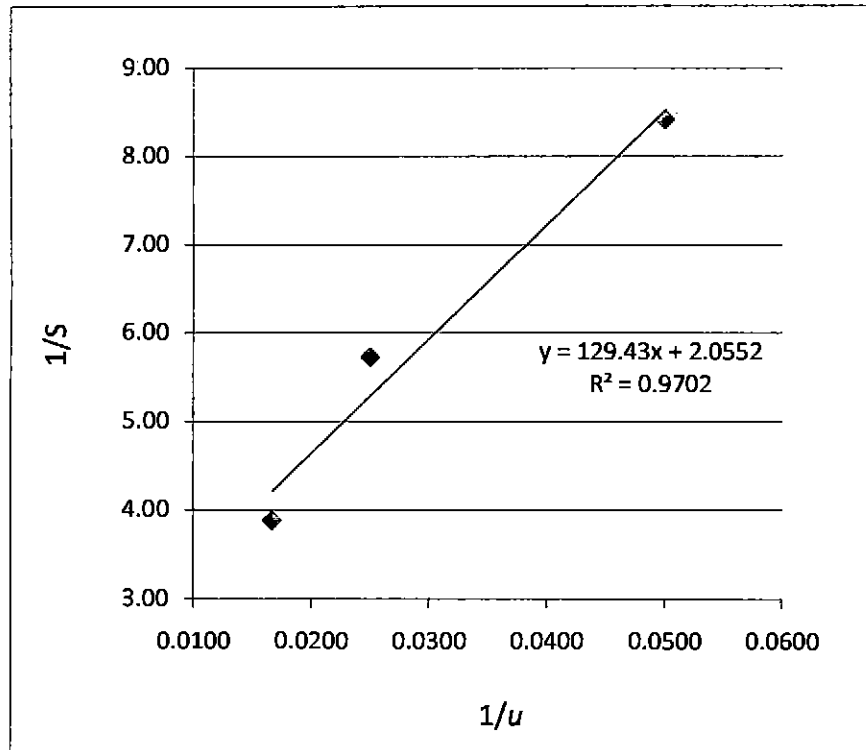
$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0,2574} = 2,69 \text{ h} = 161 \text{ min}$$

Halladas las velocidades de crecimiento a diferentes concentraciones, se realiza el grafico $1/S$ vs $1/\mu$, con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae*

FIGURA 10: Determinación de los parámetros cinéticos

[S]	[μ]	1/S	1/ μ
20	0,1188	0,0500	8,4175
40	0,1746	0,0250	5,7274
60	0,2574	0,0167	3,8850

FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia

La ecuación que expresa la Figura 10 es:

$$\frac{1}{\mu} = 129,43 \frac{1}{S} + 2,0552$$

Aplicando la ecuación (30), se obtiene lo siguiente:

$$\frac{1}{\mu_m} = 2,0552 \quad y \quad \frac{K_s}{\mu_m} = 129,43$$

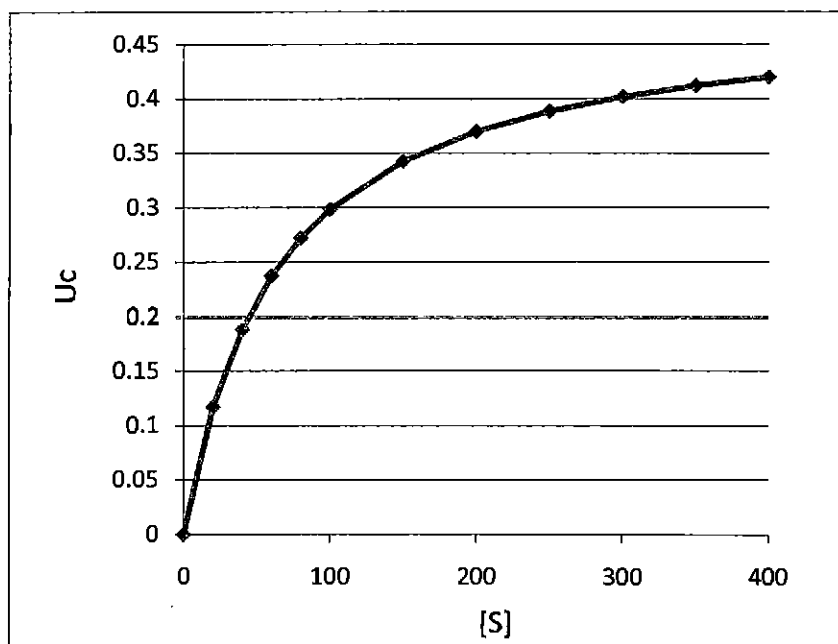
Por tanto los parámetros cinéticos son:

$$\mu_m = \frac{1}{2,0552 \text{ h}} = 0,4866 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = 129,43 \frac{\text{g}}{\text{L.h}} \times 0,4866 \text{ h} = 62,9768 \text{ g/L}$$

Teniendo estos datos, podemos calcular las velocidades de crecimiento a diferentes concentraciones, tal como se muestra en el siguiente gráfico.

FIGURA 11: Velocidad de crecimiento a diferentes concentraciones

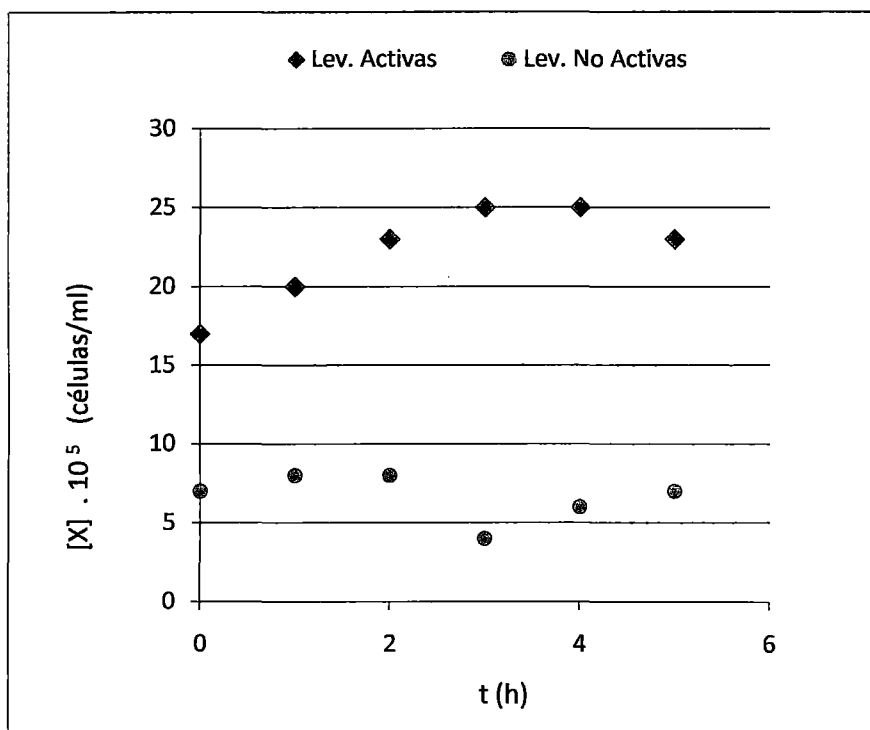


FUENTE: Elaboración propia

4.1.1. Determinación del número de levaduras activas y no activas

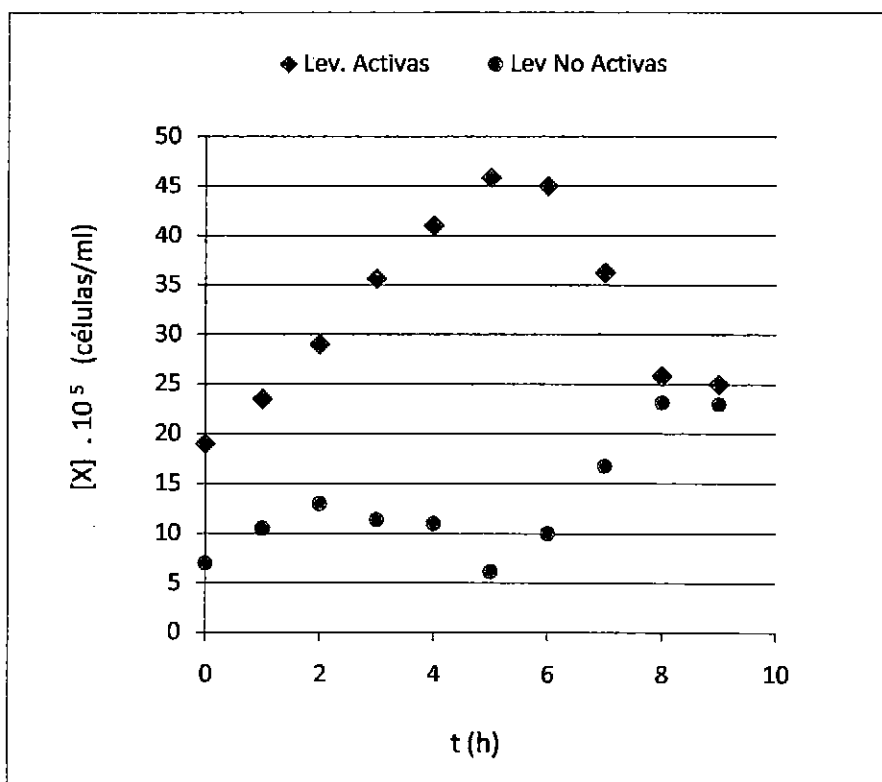
Los siguientes gráficos muestran el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, durante la producción de etanol a diferentes concentraciones de sacarosa.

FIGURA 12: Levaduras activas y no activas en una solución al 2% de sacarosa



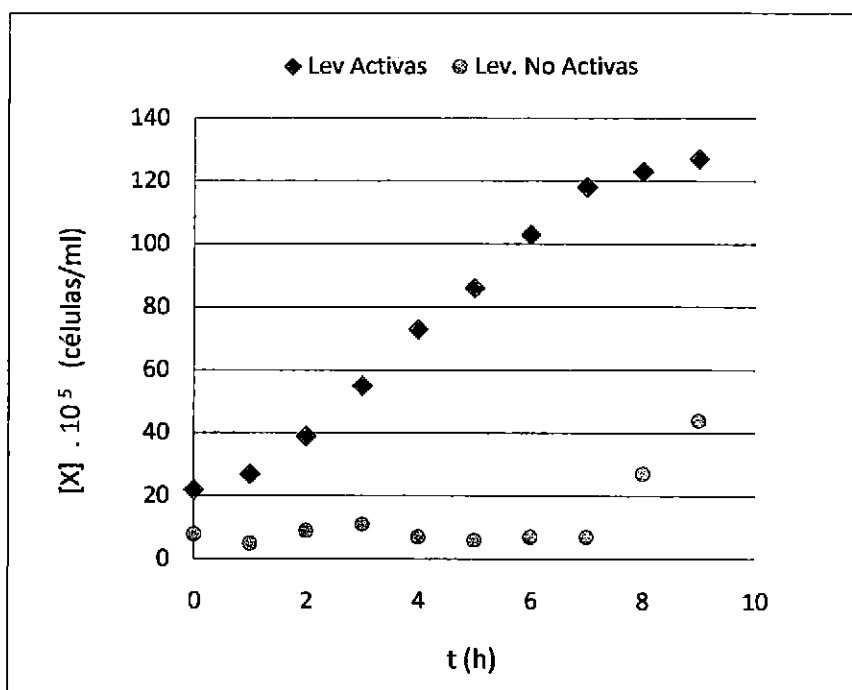
FUENTE: Elaboración propia

FIGURA 13: Levaduras activas y no activas en una solución al 4% de sacarosa



FUENTE: Elaboración propia

FIGURA 14: Levaduras activas y no activas en una solución al 6% de sacarosa.



FUENTE: Elaboración propia

En los tres gráficos mostrados se demuestra la tendencia que tienen las levaduras activas y no activas, donde podemos afirmar que conforme al tiempo, ambas tendencias en algún momento se interceptarán, debido a que las levaduras activas irán disminuyendo su capacidad de reproducción, aumentando la cantidad de levaduras no activas, sin embargo hay que señalar que a mayor concentración de sacarosa, mayor es el tiempo que demorará la intercepción, debido a la cantidad de sustrato existente.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CURVA PATRÓN CELULAR

A continuación se mostrará la tabla donde se expresa la concentración de cada una de las muestras a evaluar, con sus respectivos resultados expresados en absorbancia, cantidad de levaduras activas y levaduras totales; asimismo se presentará el conjunto de gráficos obtenidos a partir de la misma tabla, de donde se obtendrán diferentes ecuaciones que servirán para hallar ciertos datos.

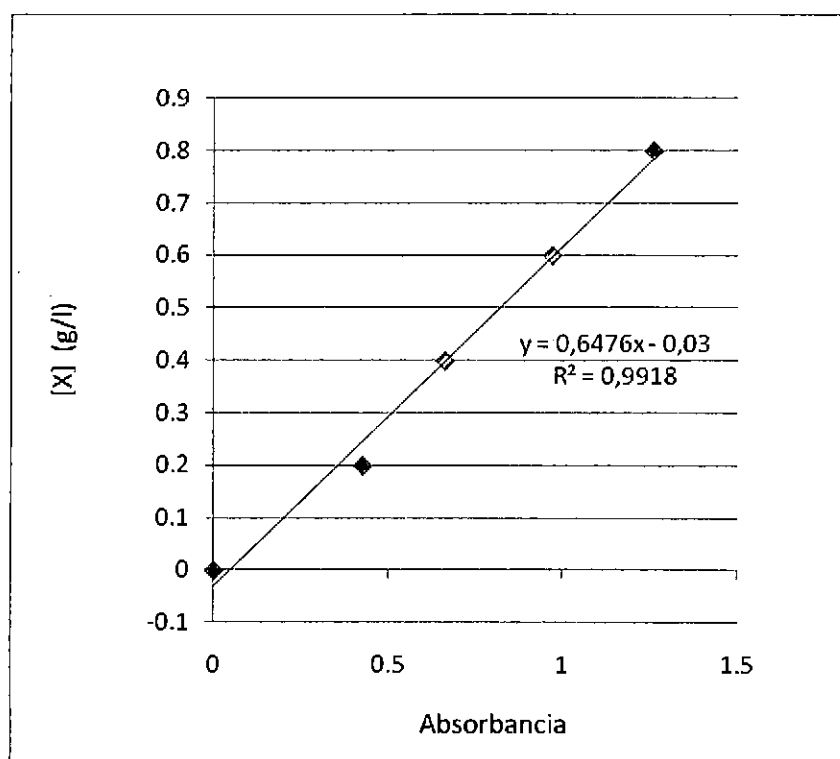
TABLA 6: Determinación de la curva patrón celular

Muestra	Levadura (g)	[X] (g/L)	Absorbancia	Lev. activas (célula/ml)	Lev. totales (célula/ml)
0	0,000	0,00	0	0	0
1	0,002	0,20	0,4270	5 E+6	5 E+6
2	0,004	0,40	0,663	8 E+6	9 E+6
3	0,006	0,60	0,970	12 E+6	15 E+6
4	0,008	0,80	1,260	17 E+6	20 E+6
5	0,010	1,00	--	20 E+6	23 E+6

FUENTE: Elaboración Propia

4.2.1. Por medición de la densidad óptica.

FIGURA 15: Curva patrón celular mediante la densidad óptica



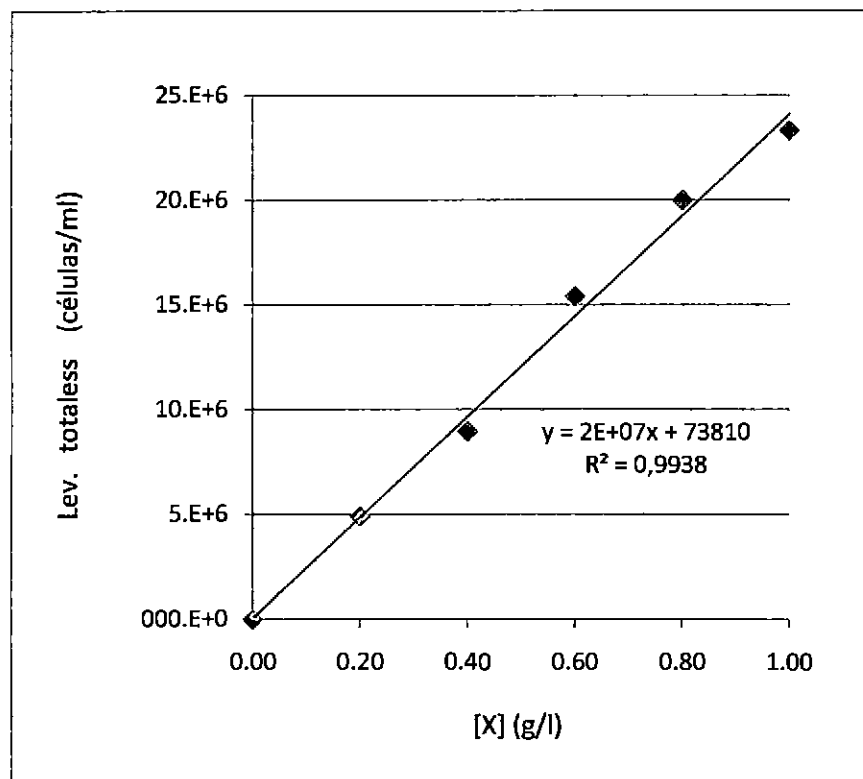
FUENTE: Elaboración propia

Por tanto:

$$[X] = 0,6476 (\text{absorbancia}) - 0,03$$

4.2.2. Por el método del recuento celular

FIGURA 16: Cantidad de levaduras totales a diferentes concentraciones

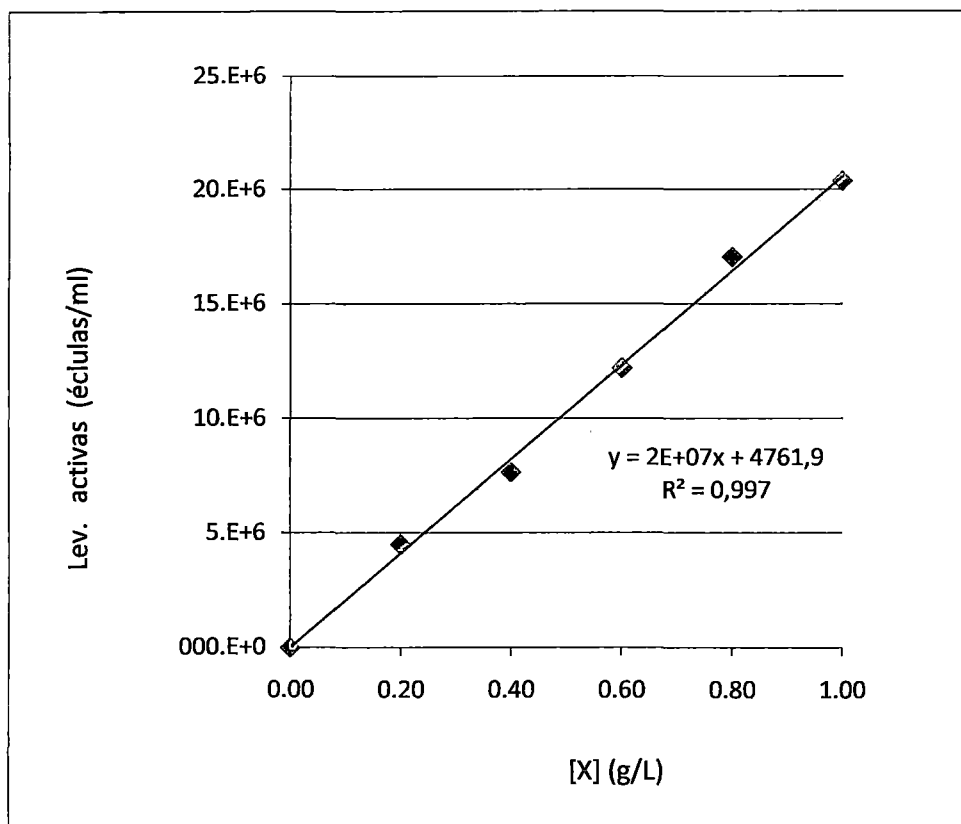


FUENTE: Elaboración propia

Por tanto:

$$Lev. \text{ totales} = 2 \times 10^7 (X) + 73810$$

FIGURA 17: Cantidad de levaduras activas a diferentes concentraciones



FUENTE: Elaboración propia

Por tanto:

$$Lev. activas = 2 \times 10^7 (X) + 4761,9$$

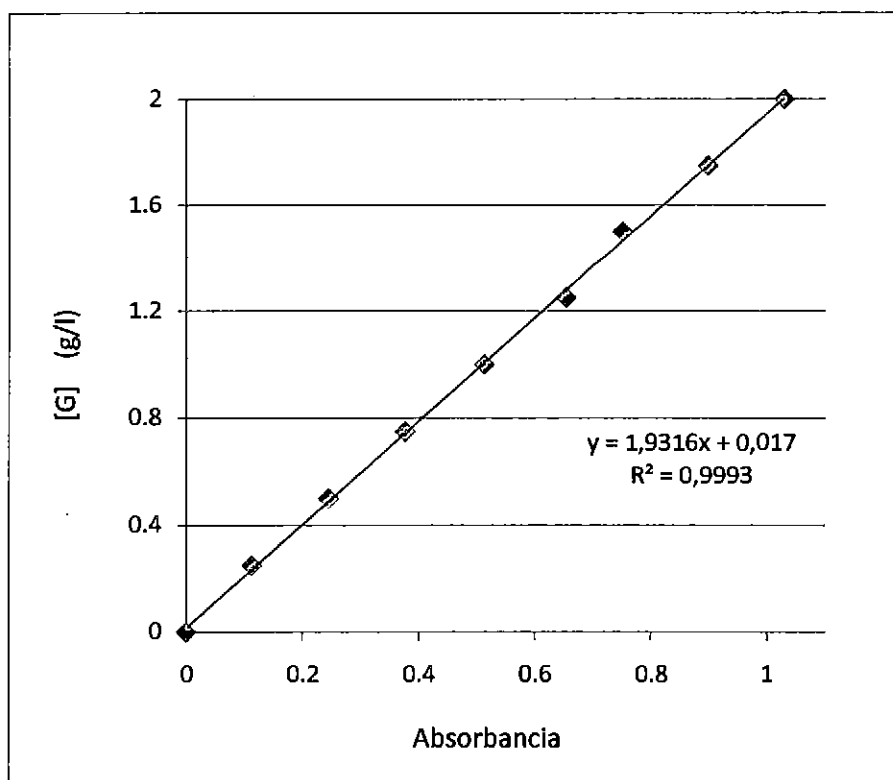
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (AR)

La tabla y grafico mostrados a continuación establecen la relación entre concentración de glucosa [G] y su absorbancia, las cuales servirán de referencia cuando queramos hallar la concentración de glucosa presente en una solución de la cual conozcamos su absorbancia.

FIGURA 18: Curva patrón de azures reductores

[G]	Absorbancia
0	0
0,25	0,113
0,50	0,245
0,75	0,377
1,00	0,513
1,25	0,654
1,50	0,751
1,75	0,898
2,00	1,029

FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia

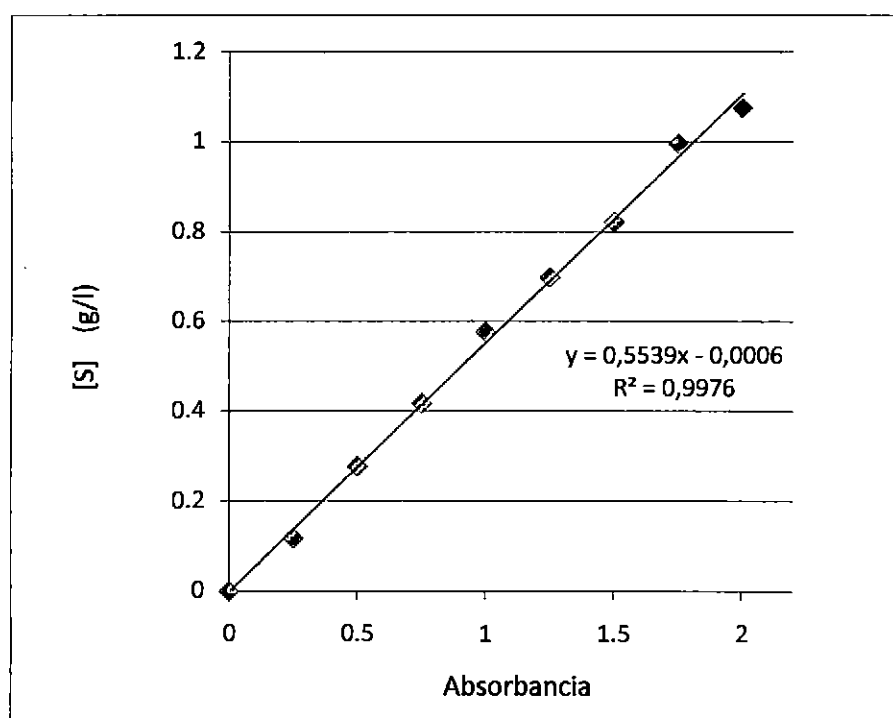
4.4 DETERMINACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART)

La tabla y gráfico mostrados a continuación establecen la relación entre concentración de sacarosa [S] y su absorbancia, las cuales servirán de referencia cuando queramos hallar la concentración de sacarosa presente en una solución de la cual conozcamos su absorbancia.

FIGURA 19: Curva patrón de azúcares reductores totales

[S]	Absorbancia	[S]	Absorbancia
0	0	1,25	0,698
0,25	0,118	1,50	0,822
0,50	0,277	1,75	0,996
0,75	0,417	2,00	1,76
1,00	0,576	-	-

FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia

4.5 INMOVILIZACIÓN CELULAR

Determinación del volumen de la esfera (V_e)

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

$$V_e = \frac{1 \text{ ml}}{80 \text{ esferas}}$$

$$V_e = 0,0125 \text{ ml}$$

Determinación del diámetro de la esfera (D_e)

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

$$r_e^3 = \frac{3 * 0,0125 \text{ ml} * (10^3 \text{ mm}^3 / 1 \text{ ml})}{4\pi}$$

$$r_e^3 = 2,9841 \text{ mm}^3$$

$$r_e = 1,44 \text{ mm}$$

Por tanto:

$$D_e = 2r_e^3 = 2 * 1,44 \text{ mm}$$

$$D_e = 2,88 \text{ mm}$$

4.6 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACTIVIDAD DE LA LEVADURA

Para determinar el grado de actividad de la levadura es necesario realizar las mediciones de la producción de CO₂; en la siguiente tabla se expresa los resultados obtenidos a partir de la comparación de producción de CO₂ entre las levaduras libres e inmovilizadas.

TABLA 7: Producción de CO₂ utilizando levaduras libres e inmovilizadas

TIEMPO (h)	M₀ (g)	M₁ (g)	W₀ (g/L)	W₁ (g/L)
0	122,863	126,709	0	0
1,0	122,853	126,700	0,010	0,009
1,5	122,850	126,695	0,013	0,014
2,0	122,847	126,691	0,016	0,018
2,5	122,842	126,685	0,021	0,024
3,0	122,839	126,680	0,024	0,029
3,5	122,837	126,673	0,026	0,036
4,0	122,832	126,666	0,031	0,043
4,5	122,829	126,660	0,034	0,049
5,0	122,826	126,654	0,037	0,055
5,5	122,822	126,646	0,041	0,063
6,0	122,818	126,639	0,045	0,070
6,5	122,812	126,632	0,051	0,077
7,0	122,810	126,625	0,053	0,084
7,5	122,807	126,619	0,056	0,090
8,0	122,803	126,611	0,060	0,098

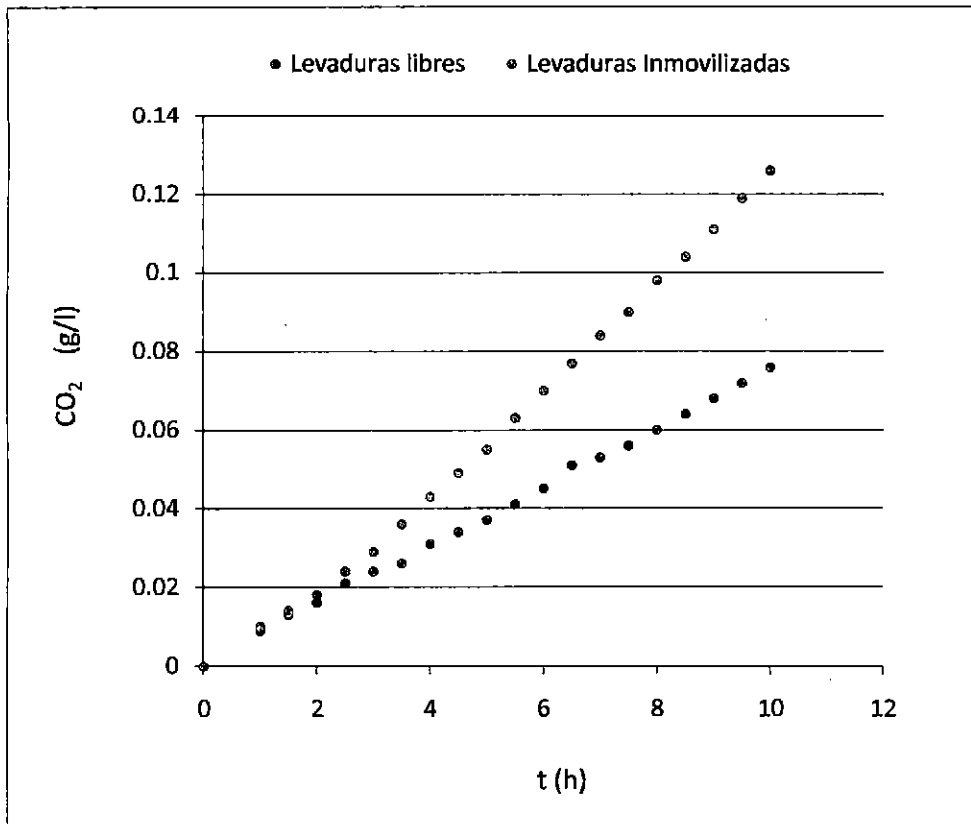
TIEMPO	M₀	M₁	W₀	W₁
(h)	(g)	(g)	(g/L)	(g/L)
8,5	122,799	126,605	0,064	0,104
9,0	122,795	126,598	0,068	0,111
9,5	122,791	126,590	0,072	0,119
10	122,787	126,583	0,076	0,126

FUENTE: Elaboración propia

Donde M_0 es el peso de la solución con las levaduras libres y M_1 el peso de la solución con las levaduras inmovilizadas, es importante mencionar que ambas soluciones se encuentran a la misma concentración de sacarosa y de levaduras; Asimismo W_0 y W_1 es el peso de CO_2 producido por las soluciones conteniendo las levaduras libres e inmovilizadas respectivamente.

El siguiente gráfico pretende realizar una comparación acerca de la producción de CO_2 durante una fermentación utilizando levaduras libres e inmovilizadas, concluyendo que la producción de CO_2 es más eficiente cuando se trabaja con las levaduras inmovilizadas, debido a la propia inmovilización que origina un aumento en su estabilidad y productividad, afirmando con ello que asimismo la producción de etanol es mucho más eficiente cuando se trabaja con levaduras inmovilizadas que con levaduras libres.

FIGURA 20: Producción de CO₂ utilizando levaduras libres e inmovilizadas



FUENTE: Elaboración propia

La tabla 8, nos da a conocer los resultados de la producción de CO₂ en las levaduras inmovilizadas a diferentes concentraciones. Donde M₀, M₁, M₂ es el peso de las soluciones a concentraciones de 5, 10 y 15% respectivamente de levaduras inmovilizadas, todas inmersas en un solución de sacarosa al 15%. Asimismo W₀, W₁, y W₂ es el peso de CO₂ producido durante la fermentación

TABLA 8: Producción de CO₂ a diferentes concentraciones de levaduras inmovilizadas

TIEMPO (h)	M₀ (g)	M₁ (g)	M₂ (g)	W₀ (g/l)	W₁ (g/l)	W₂ (g/l)
0	123,362	122,781	121,824	0,000	0,000	0,000
1	123,347	122,770	121,808	0,015	0,011	0,016
2	123,343	122,763	121,796	0,019	0,018	0,028
3	123,337	122,753	121,780	0,025	0,028	0,044
4	123,333	122,743	121,753	0,029	0,038	0,071
5	123,330	122,730	121,733	0,032	0,051	0,091
6	123,328	122,715	121,708	0,034	0,066	0,116
7	123,325	122,701	121,680	0,037	0,080	0,144
8	123,320	122,676	121,632	0,042	0,105	0,192
9	123,318	122,666	121,612	0,044	0,115	0,212
10	123,315	122,651	121,582	0,047	0,130	0,242
11	123,313	122,636	121,549	0,049	0,145	0,275
12	123,310	122,616	121,518	0,052	0,165	0,306
13	123,307	122,596	121,488	0,055	0,185	0,336
14	123,305	122,578	121,451	0,057	0,203	0,373

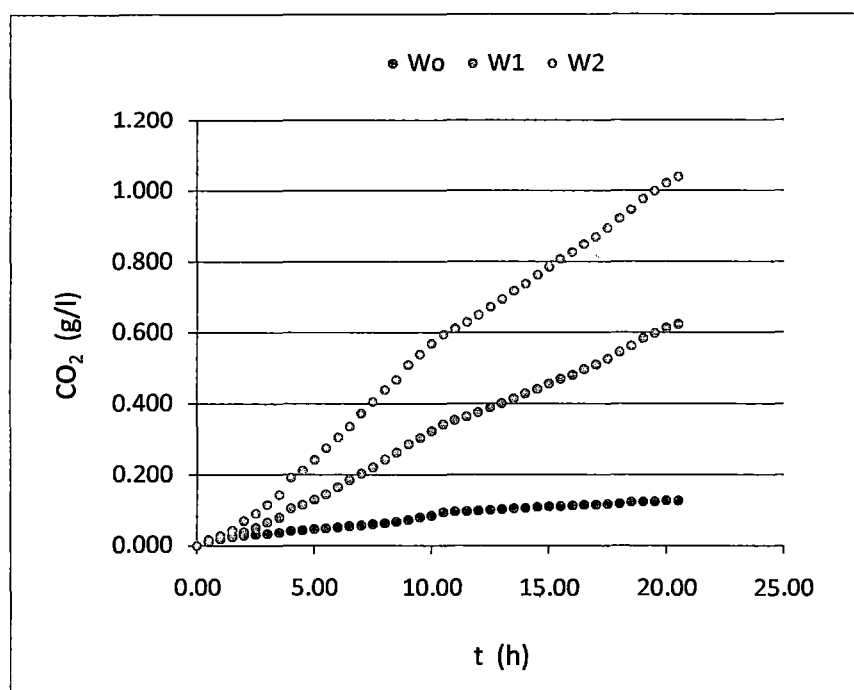
TIEMPO	M₀	M₁	M₂	W₀	W₁	W₂
(h)	(g)	(g)	(g)	(g/l)	(g/l)	(g/l)
15	123,301	122,560	121,418	0,061	0,221	0,406
16	123,298	122,538	121,386	0,064	0,243	0,438
17	123,295	122,518	121,357	0,067	0,263	0,467
18	123,289	122,494	121,315	0,073	0,287	0,509
19	123,282	122,477	121,285	0,080	0,304	0,539
20	123,278	122,458	121,255	0,084	0,323	0,569
21	123,268	122,439	121,229	0,094	0,342	0,595
22	123,266	122,427	121,212	0,096	0,354	0,612
23	123,265	122,417	121,194	0,097	0,364	0,630
24	123,263	122,405	121,174	0,099	0,376	0,650
25	123,261	122,392	121,152	0,101	0,389	0,672
26	123,259	122,380	121,130	0,103	0,401	0,694
27	123,257	122,367	121,106	0,105	0,414	0,718
28	123,256	122,353	121,087	0,106	0,428	0,737
29	123,253	122,340	121,062	0,109	0,441	0,762
30	123,251	122,325	121,039	0,111	0,456	0,785
31	123,250	122,311	121,016	0,112	0,470	0,808
32	123,249	122,300	120,997	0,113	0,481	0,827

TIEMPO (h)	M₀ (g)	M₁ (g)	M₂ (g)	W₀ (g/l)	W₁ (g/l)	W₂ (g/l)
33	123,247	122,284	120,975	0,115	0,497	0,849
34	123,246	122,271	120,955	0,116	0,510	0,869
35	123,244	122,255	120,929	0,118	0,526	0,895
36	123,243	122,236	120,902	0,119	0,545	0,922
37	123,239	122,218	120,878	0,123	0,563	0,946
38	123,238	122,198	120,848	0,124	0,583	0,976
39	123,238	122,183	120,825	0,124	0,598	0,999
40	123,235	122,168	120,802	0,127	0,613	1,022
41	123,235	122,158	120,784	0,127	0,623	1,040

FUENTE: Elaboración propia

La Figura 21 nos indica que a mayor concentración de levaduras, mayor es la producción de CO₂, sin embargo también se observa que las tendencias de las rectas no son lineales, sino más bien presentan una tendencia a declinar en algún momento, esto debido a que las levaduras se desgastan como cualquier microorganismo y dejaran de producir CO₂.

FIGURA 21: Producción de CO₂ a diferentes concentraciones de sacarosa



FUENTE: Elaboración propia

4.7 PRODUCCIÓN CONTINUA DE ETANOL

Inicialmente se realizó el análisis 2^{K-p} , de donde se obtuvo que de las 4 variables de estudio, solo tres son significativas para el proceso, las cuales son: temperatura, tiempo de residencia y pH. Siendo la concentración eliminada del estudio debido a que durante el proceso, la variación de su parámetro no influyó en los resultados del proceso de fermentación., lo cual se presume que se debió a que el parámetro escogido fue demasiado alto.

Identificadas las variables más significantes, se procedió a realizar el análisis con un diseño factorial 2^k , con la adición de tres puntos centrales, la matriz de respuesta es mostrada en el tabla 9.

TABLA 9.- Matriz experimental - Diseño Factorial 2^k

N	VARIABLES CODIFICADAS			VARIABLES NATURALES			VARIABLE RESPUESTA	
	X ₁	X ₂	X ₃	T	Tr	pH	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	-1	24	3,0	4,0	12,08	4,03
2	+1	-1	+1	32	3,0	5,0	33,54	11,18
3	-1	-1	+1	24	3,0	5,0	14,68	4,89
4	+1	-1	-1	32	3,0	4,0	26,58	8,86
5	-1	+1	+1	24	5,0	5,0	31,24	6,25
6	+1	+1	-1	32	5,0	4,0	40,34	8,07
7	-1	+1	-1	24	5,0	4,0	33,27	6,65
8	+1	+1	+1	32	5,0	5,0	45,80	9,16
9	0	0	0	28	4	4.5	24,38	6,10
10	0	0	0	28	4	4.5	24,96	6,24
11	0	0	0	28	4	4.5	23,42	5,86

FUENTE: Elaboración propia

Donde:

T = Temperatura (°C)

Tr = Tiempo de residencia (h)

pH = Medición de acidez.

Y₁ = Rendimiento (g/l)

Y₂ = Productividad (g/l.h)

El análisis de varianza para el estudio del rendimiento y productividad es mostrado en la Tabla (10) y (11) respectivamente, este análisis se logra mediante la descomposición de la variabilidad de la variable dependiente Y en un modelo de suma de cuadrados y un residuo o suma de errores cuadráticos. De interés particular es el F-prueba y su asociado P-valor, el cual evalúa la significancia estadística del modelo ajustado. Un P-valor pequeño (menor a 0,05 si se opera a un nivel de significancia de 5%) indica que existe una relación significativa de la forma especificada entre Y y las variables independientes.

TABLA 10.- Análisis de varianza para el rendimiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad (G.l)	Cuadrado Medio	F – Prueba	P – Valor
Modelo	907,407	3	302,469	19,90	0,0008
Residuo	106,402	7	15,2003		
Total (Corr.)	1013,81	10			

FUENTE: Elaboración propia

$$R^2 = 89,5047 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustado para g.l.)} = 85,0068 \%$$

$$F_{99, 3, 7} = 8,45$$

El valor del R^2 es muy importante para nuestro estudio, pues representa el porcentaje de variabilidad de Y_1 (rendimiento) durante su análisis, oscilando de 0% a 100%. Para los datos experimentales, la regresión ha logrado alrededor de 89,5% de la variabilidad en g/l. El restante 10,5% es atribuido a las desviaciones del modelo, las cuales pueden aparecer debido a otros factores, errores de medición o fallas del modelo actual para ajustar los datos adecuadamente. Por otra parte el valor estadístico del R^2 ajustado para el número de coeficientes en el

modelo, es regularmente usado para comparar modelos con diferentes números de coeficientes. Puesto que el F-Prueba es menor que la razón F-Tabla, con un nivel de confianza del 95,0%. Se presenta la ecuación del modelo ajustado que establece la relación entre el rendimiento y las tres variables independientes:

$$\text{Rendimiento} = -66,4068 + 7,97125 (\text{TR}) + 1,71844(\text{T}) + 3,247 (\text{pH})$$

TABLA 11.- Análisis de varianza para la productividad

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad (G.l.)	Cuadrado Medio	F-Prueba	P-Valor
Modelo	31,881	3	10,627	6,47	0,0199
Residuo	11,499	7	1,64272		
Total (Corr.)	43,3801	10			

FUENTE: Elaboración propia

$$R^2 = 73,4924 \%$$

$$R^2 (\text{ajustado para g.l.}) = 62,132 \%$$

$$F_{95, 3, 7} = 4,35$$

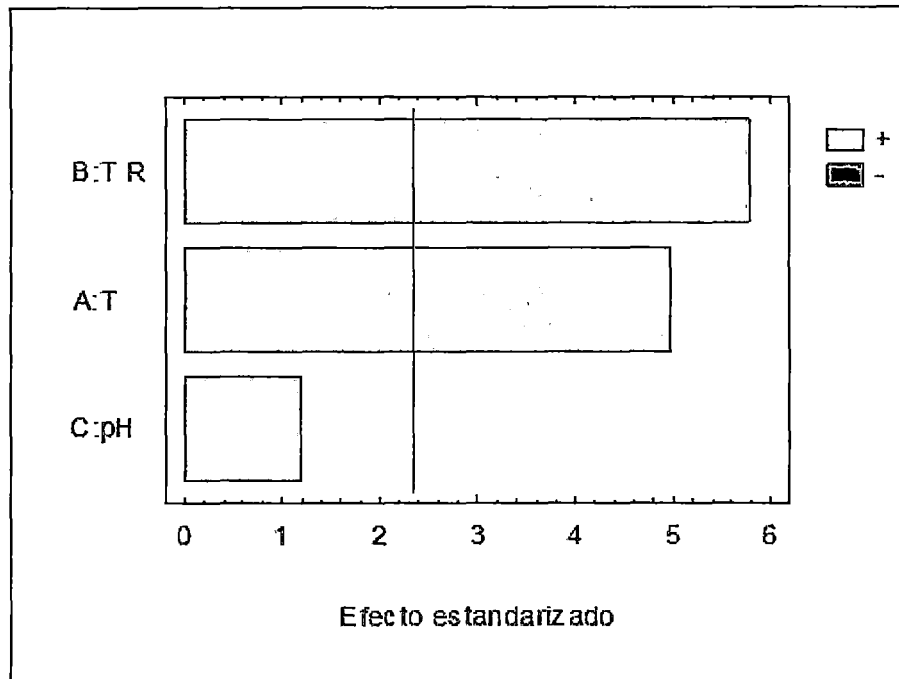
Para el caso de la productividad se observa en la tabla 8 que el P-Valor es menor que 0.05, por tanto se puede afirmar que existe una relación significativa de la forma especificada entre Y_2 (productividad) y las variables independientes con un nivel de confianza del 95%. Así mismo el R^2 nos indica que el análisis realizado expresa un 73,5% de la variabilidad de Y_2 en g/l.h.

El modelo ajustado que permite describir la relación entre productividad y 3 variables independientes es el siguiente:

$$\text{Productividad} = -11,4311 + 0,14625 (\text{TR}) + 0,482812 (\text{T}) + 0,9675 (\text{pH})$$

Obtenido los modelos, se procede a realizar un conjunto de gráficos, en el que se nos muestre el grado de significancia de cada una de las variables durante el proceso, para ello se utilizará el diagrama de Pareto, Figura 22, un gráfico de efectos principales, Figura 23 y un grafico de superficie de respuesta, Figura 24.

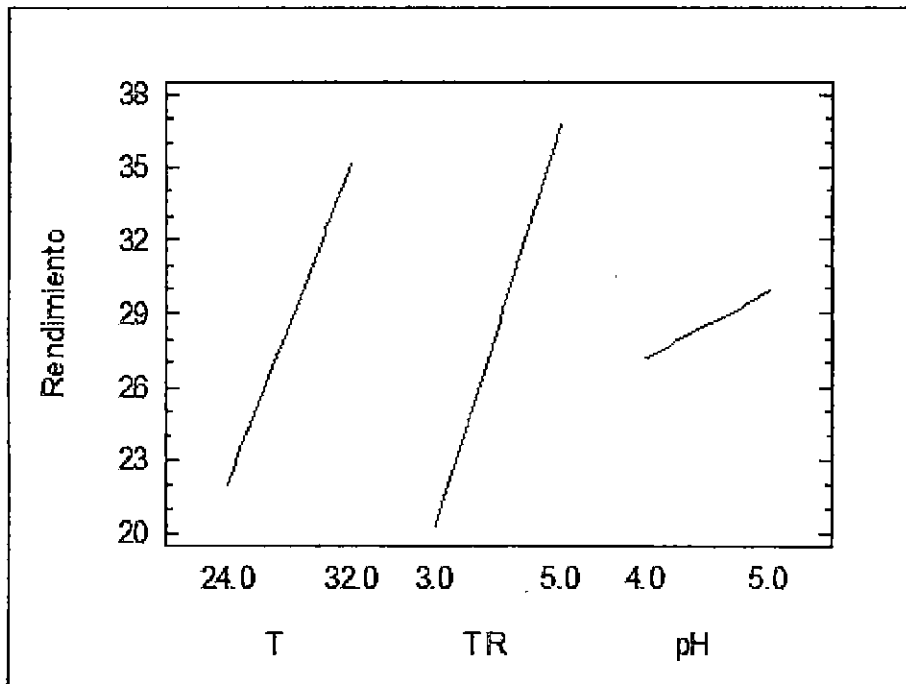
FIGURA 22: Diagrama de Pareto para el rendimiento



FUENTE: Elaboración propia

El principio de Pareto afirma que en todo grupo de elementos que contribuyen a un mismo efecto, solo algunos son responsables de la mayor parte de dicho efecto, en la Figura 22 se muestra un diagrama de barras horizontales, y la existencia de una línea vertical, la cual indica que las barras que pasen esa línea son aquellas variables que son realmente significantes para el proceso, concluyendo en este caso, que el pH no es estadísticamente significativo, esto se puede atribuir a la cercanía que existe en su rango de operación, lo cual dificultó, observar su efecto durante el proceso.

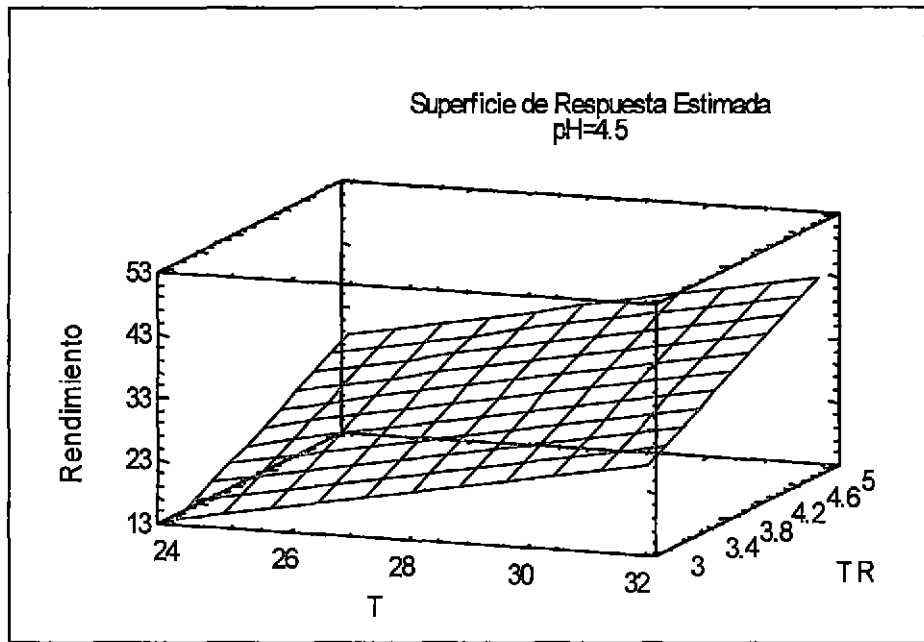
FIGURA 23: Grafico de efectos principales



FUENTE: Elaboración propia

El diagrama de efectos principales, muestra un conjunto de líneas de diferentes pendientes, estas significan la importancia del efecto que estas tienen en el proceso de estudio, la Figura 23 indica que tanto la temperatura como el tiempo de residencia tienen una tendencia positiva sobre el rendimiento, es decir que mayor temperatura (considerando que la *Saccharomyces cerevisiae* tiene un desarrollo óptimo hasta los 35°C) y mayor tiempo de residencia, se obtiene un mejor rendimiento.

FIGURA 24: Superficie de respuesta estimada con un pH de 4,5



FUENTE: Elaboración propia

La Figura 24 nos muestra el efecto de la temperatura y el tiempo de residencia a un pH constante, donde se verifica al igual que en las dos graficas anteriores que el tiempo de residencia es la variable de mayor grado de significancia para el proceso, pues al aumentar esta variable se observa que el rendimiento mejora notoriamente, de la misma forma la temperatura también posee influencia en el proceso, pero en menor grado en comparación la el tiempo de residencia.

Finalizada la experiencia y sus análisis, se observa que las mayores concentraciones de etanol fueron de 45,80 g/l y 40,34 g/l, ambas obtenidas a una temperatura de 32°C, con un tiempo de residencia de 5 horas y con pH de 5 y 4 respectivamente, asimismo las concentraciones menores de etanol fueron de 14,68 g/l y 12,08 g/l, obtenidas a una temperatura de 24°C, tiempo de residencia de 3 horas y pH de 5 y 4 respectivamente.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se logró la construcción de un biorreactor tipo tanque de material acrílico transparente con una capacidad máxima de 3 litros, provisto de un serpentín y un agitador Rushtong de 6 paletas, el equipo cuenta con una tapa hermética que a su vez posee dos orificios para el ingreso de los sensores de pH y temperatura.
2. Se obtuvo los parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae* durante la producción de etanol, donde la velocidad máxima de crecimiento (μ_m) es de $0,4866 \text{ h}^{-1}$ y la constante de equilibrio (K_s) es de $62,9768 \text{ g/l}$
3. Se comprobó mediante análisis previos que el grado de actividad de la levadura sin inmovilizar es menor en comparación a una levadura inmovilizada.

4. Los parámetros de control del biorreactor continuo, utilizados durante la fermentación fueron de 11,10 ml/min y de 6,67 ml/min, los cuales al recorrer un volumen de 2 l, dieron un tiempo de residencia de 3 y 5 horas respectivamente, obteniéndose resultados óptimos de obtención de etanol.
5. La mejor producción de etanol, en un biorreactor continuo de tanque agitado, utilizando levaduras inmovilizadas fue de 45,80 g/l a las condiciones de 32°C, con un tiempo de residencia de 5 horas y con pH de 5.
6. Durante la producción de etanol, según el análisis de varianza y los gráficos mostrados, se estableció que las variables que fueron de mayor significancia para el proceso, fue el tiempo de residencia y la temperatura, siendo el tiempo de residencia la de mayor grado de significancia, los resultados fueron calculados con un 95% de confianza.
7. Durante el análisis realizado al estudio de fermentación, se observó que el pH, no ocasionó una variabilidad significativa para la obtención de etanol, esto se puede atribuir a la cercanía existente en su rango de operación, dificultándose observar su verdadero efecto durante el proceso,

8. Se determino los modelos matemáticos para este diseño preliminar, tanto para el rendimiento como para la productividad son modelos de primer orden, los cuales son:

$$\text{Rendimiento} = -66,4068 + 7,97125 (\text{TR}) + 1,71844(\text{T}) + 3,247 (\text{pH})$$

$$\text{Productividad} = -11,4311 + 0,14625 (\text{TR}) + 0,482812 (\text{T}) + 0,9675 (\text{pH})$$

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

1. Incluir en trabajos posteriores nuevas variables de estudio tales como concentración del sustrato, diámetro de la esfera y concentración de levaduras inmovilizadas
2. Realizar estudios de fermentación alcohólica con mayores tiempos de residencia hidráulica en el reactor tipo tanque, con el fin de mejorar el rendimiento para la obtención de etanol.
3. Realizar estudios de fermentación alcohólica ampliando el rango del pH, con el fin de determinar el verdadero efecto que tiene sobre el proceso de fermentación.
4. Mejorar el diseño del fermentador, como por ejemplo se podría incorporar baffles al equipo, de esta manera la agitación mejorará y como consecuencia la salida de CO₂ también, evitando de esta forma se den lecturas falsas de pH.

5. Implementar sistemas de control que permitan monitorear mejor el proceso de fermentación de la sacarosa.
6. Propiciar un nuevo trabajo de optimización de producción continua de etanol.
7. Propiciar la obtención de etanol a partir de otra materia prima utilizando el biorreactor continuo tipo tanque construido en la presente tesis.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

Libros

- [1] ARROYO S. Miguel (1998); “*Inmovilización de enzimas, fundamentos, métodos y aplicaciones*”, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid - España.
- [2] BURNS, R. (1996), “*Fundamentos de química*”, Segunda Edición, Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. Mexico.
- [3] COCHRAN, G & COX, M., “*Diseños experimentales*”, 2da. New York, John Wiley, 1964.
- [4] DENBIGH G. & TURNER, R (1990). “*Introducción a la teoría de los reactores químicos*”. Limusa. México.

- [5] LEVENSPIEL, O. (1995), "*Ingeniería de las reacciones químicas*", Segunda Edición, Editorial Reverté S.A Barcelona – España.
- [6] SCRAGG, Alan (2004), "*Biotecnología para ingenieros*", Editorial Limusa S.A. – Mexico.
- [7] VILOCHE B. Juan (2004), "*Ingeniería Bioquímica*", Facultad de Ciencias, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman, Tacna – Perú.
- [8] WADE, (1996), "*Principios de Química Orgánica*", Editorial Ph. Mc Graw Hill, 3° Edición, México
- [9] WISEMAN, A. (1986), "*Principios de Biotecnología*", Editorial Acribia, Zaragoza - España.

Artículos

- [10] CHAMY, R. (1996), "*V Curso Latinoamericano de biotecnología: reactores enzimáticos*", Escuela de Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- [11] FRANCESCH F. Xavier (2004), "*Las levaduras*", Artículo, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Argentina de Rugby.
- [12] KLEI, E.; SUNDSTROM, W.; SHIM, D. (1985) "*Immobilization of enzymes by microencapsulation en immobilized cells and enzymes: a practical approach*" J. Woodward, ed. IRL.
- [13] KLIBANOV, M. (1983) "*Immobilized enzymes and cells as practical catalysts*", Science 219: 722-727.
- [14] MARGOLIN, A.L. (1996) "*Novel crystalline catalysts*", Trends Biotechnol. 14: 223-230.
- [15] SANCHEZ M. (2004), "*Inmovilización de Enzimas*", Facultad de Farmacia - UCM, Madrid España.

- [16] SHAKHASHIRI (2009), "*Ethanol*", Chemical Of The Week, General Chemistry.
- [17] TAYLOR, F. (1991) "*Protein Immobilization: fundamentals and applications*", Marcel Dekker, New York.
- [18] WINGARD, B. (1972) "*Enzyme Engineering*", Interscience Publishers, New York.

Revistas

- [19] Cadena Agroindustrial Del Etanol (2004), "*Etanol*", Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura, Nicaragua.

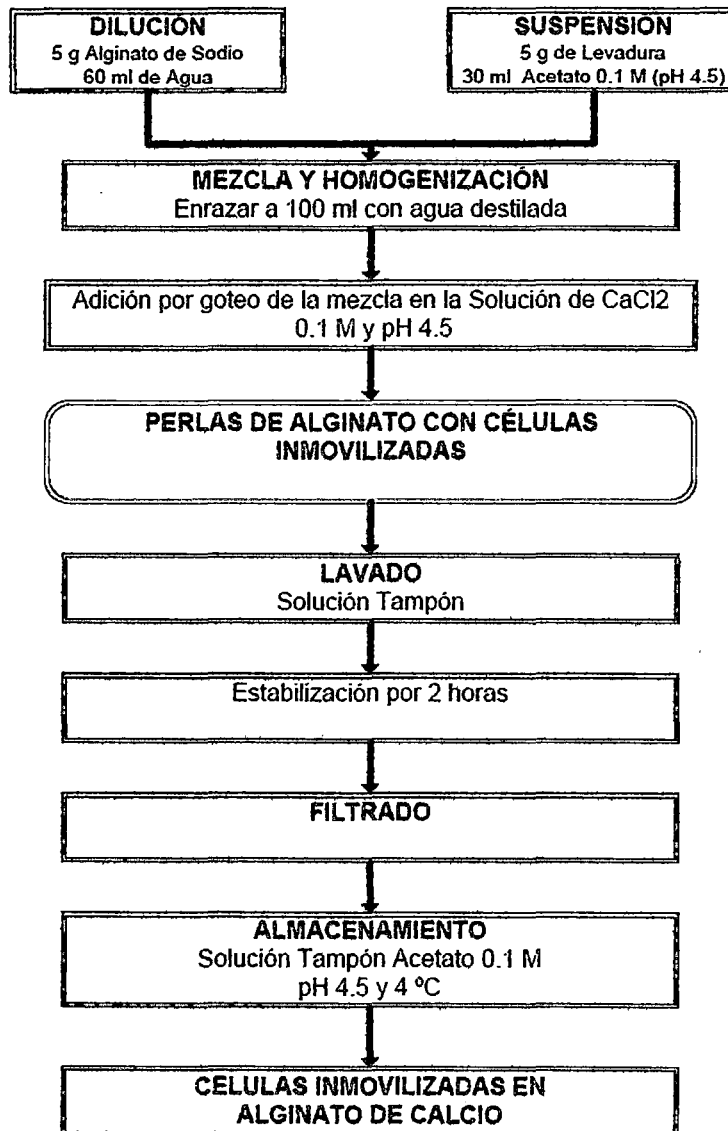
Trabajos de Investigación y/o Tesis

- [20] MARTÍNEZ U. María De Los Ángeles (2004), "*Producción de Saccharomycés cerevisiae bajo condiciones de estrés oxidativo*", trabajo de investigación realizado en el Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

- [21] TITO V. Carlos, (2004), "*Producción continua de etanol en un reactor de lecho fijo usando células inmovilizadas Saccharomyces cerevisae en alginato de calcio*", Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Groohman, Tacna-Perú.
- [22] YABAR V. Emilio (2005), "*Principios Fundamentales De La Microbiología*", Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo – Perú.
- [23] YARLEQUE J. (1993), "*Producción De Etanol Por Bioconversión De Pericarpio De Cacao Theobroma Cacao Utilizando Células Inmovilizadas De Saccharomyces Cerevisae Atcc 4126*", Investigación Anual UNSCH, pp. 34-38, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho – Perú.

ANEXOS

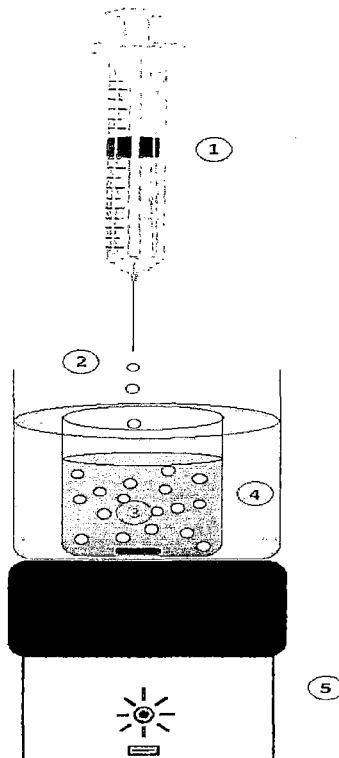
ANEXO 1



Esquema para la inmovilización de levaduras

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 2



1. Jeringa
2. Esferas de células inmovilizadas
3. Solución de CaCl_2
4. Agua con hielo
5. Agitador magnético

Inmovilización de Levaduras

ANEXO 3

MUESTRA



25 ml
(capacidad del picnómetro)



Balón de 100 ml con
25 ml de muestra
+
12,5 ml de H₂O
de lavado del picnómetro



Destilar



Recoger el destilado



Llevar a baño maria
por 30 minutos y completar
hasta el aforo



Pesar y determinar la densidad
y el contenido alcohólico

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

ANEXO 4

<i>Densidad</i>	<i>4º decimal de la escala del destilado</i>									
	<i>9</i>	<i>8</i>	<i>7</i>	<i>6</i>	<i>5</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>0</i>
<i>del</i>										
<i>destilado</i>	<i>Gramos por litro</i>									
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	5,10	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	105,70	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

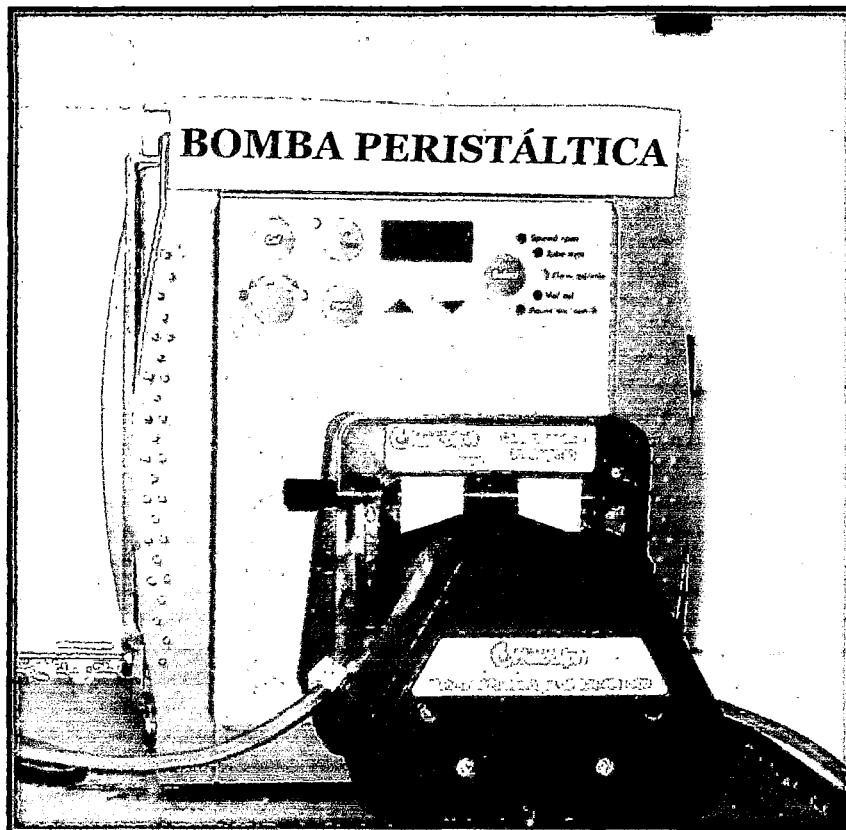
FUENTE: *Bundesanzeiger* 1960 N^o 86, pág. 17

ANEXO 5



**Tanque de alimentación utilizado durante la
producción continua de etanol**

ANEXO 6



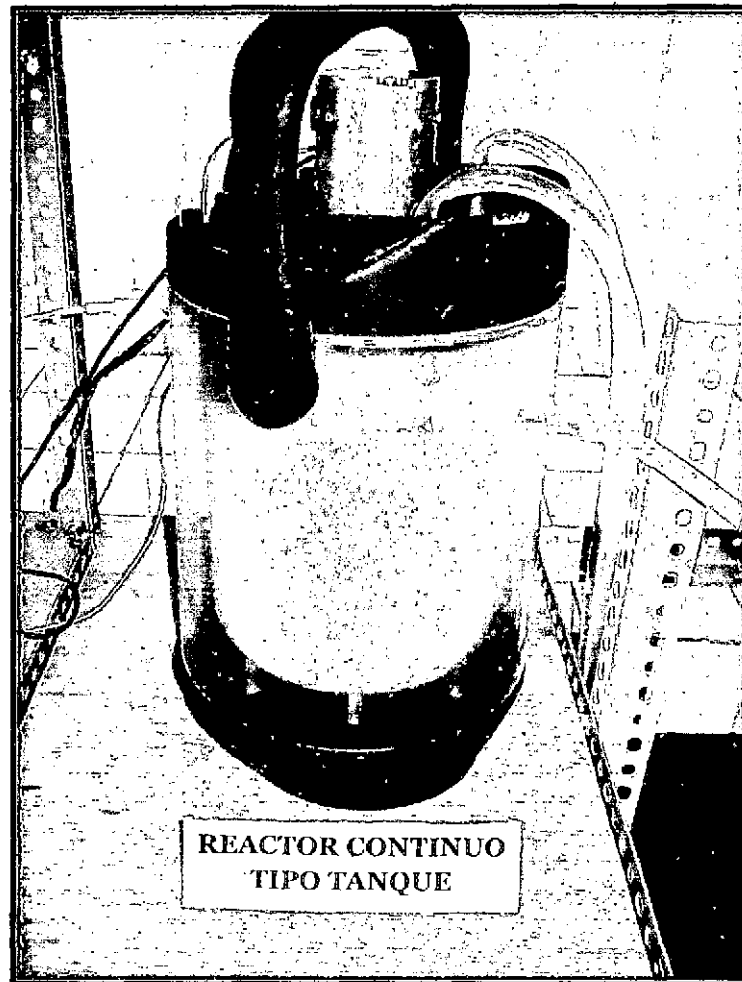
**Bomba Peristáltica utilizada durante la
producción continua de etanol**

ANEXO 7



**Equipo de lectura de medición del pH y temperatura utilizados durante la
producción continua de etanol**

ANEXO 8



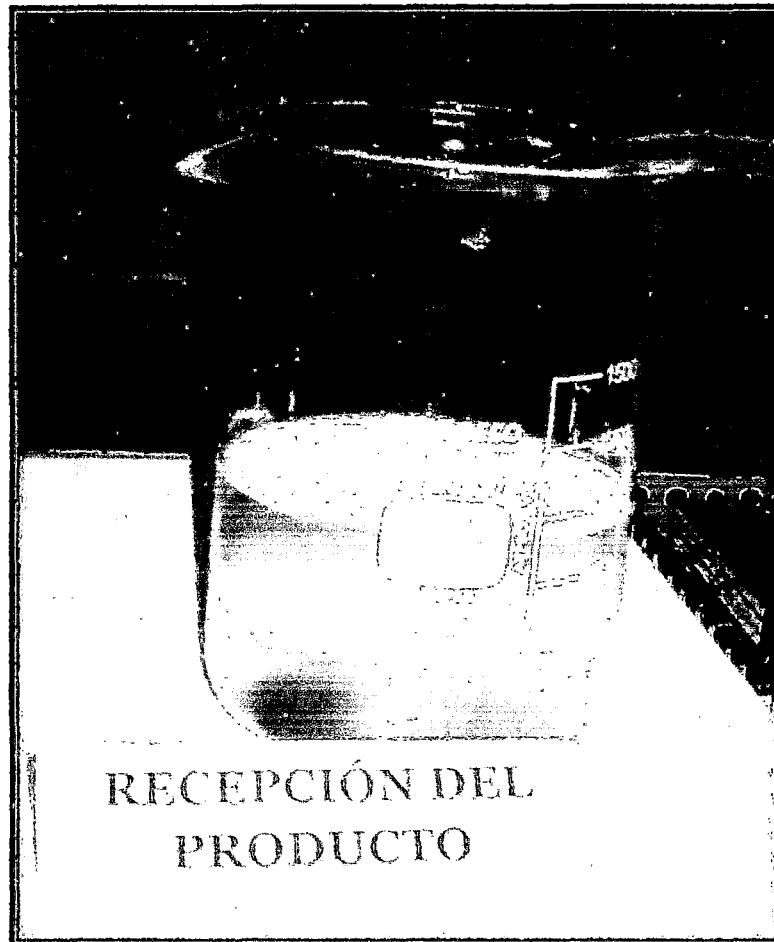
Reactor continuo tipo tanque conteniendo las levaduras inmovilizadas y el medio de fermentación

ANEXO 9



Sistema de separación del CO₂ del producto obtenido

ANEXO 10



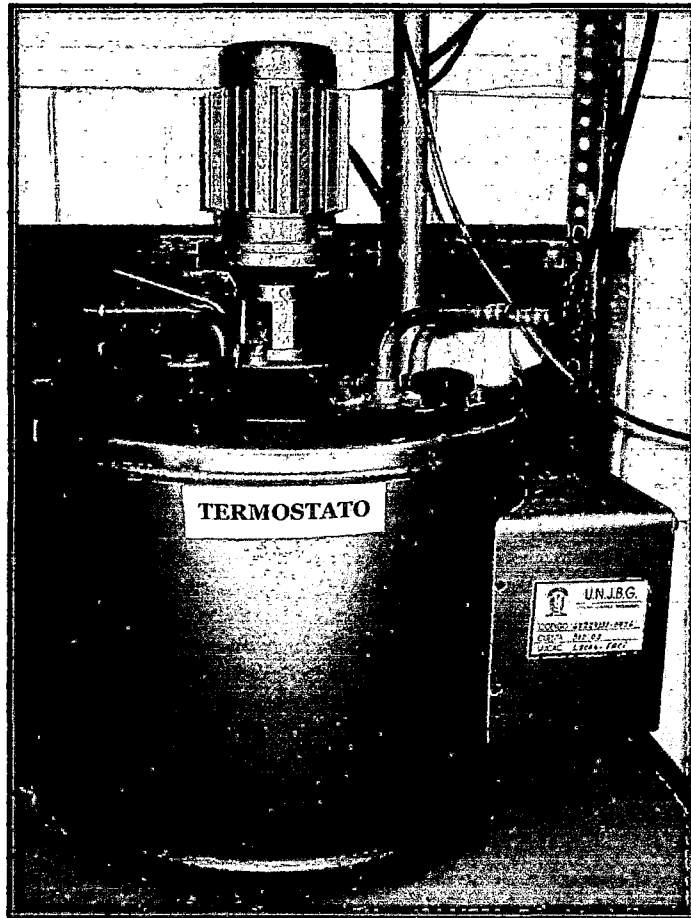
Frasco de recepción del producto

ANEXO 11



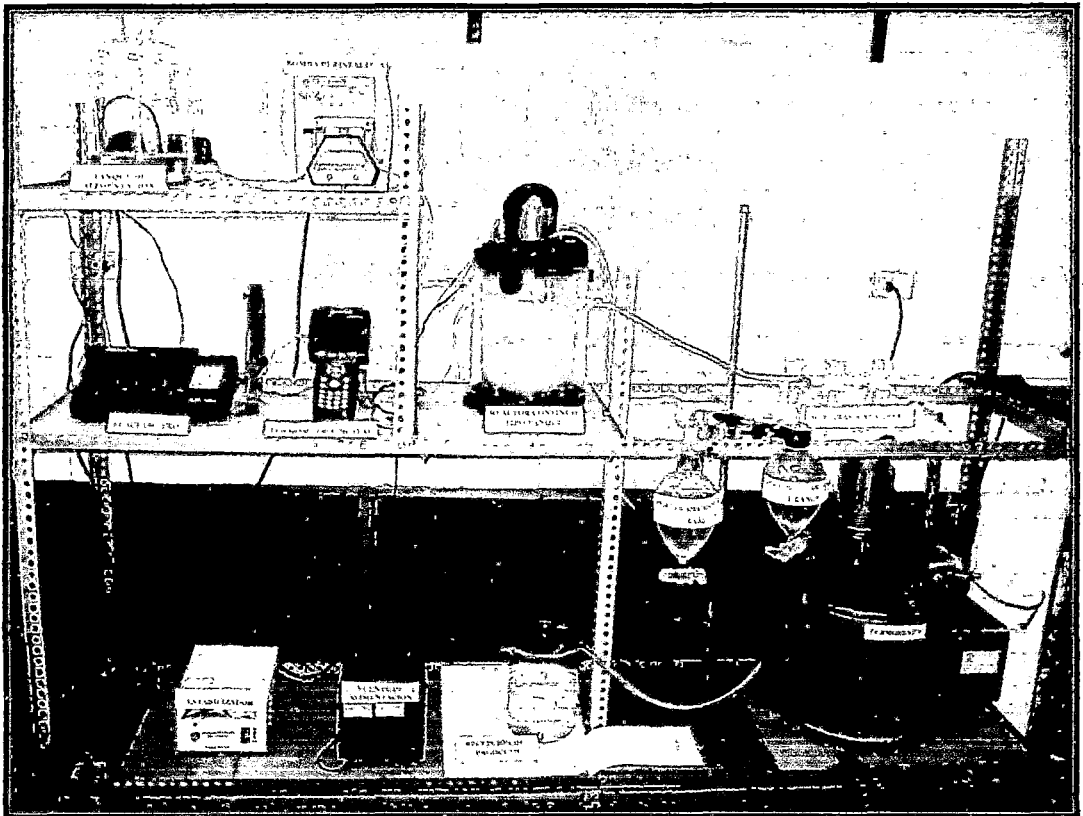
Frascos en los que se recogió las muestras conteniendo etanol

ANEXO 12



**Termostato utilizado para el control de la temperatura
dentro del reactor continuo**

ANEXO 13



Equipo utilizado para la producción continua de etanol a partir de la sacarosa utilizando el método de inmovilización