



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

*ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS DE MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51 A PARTIR DE CÉLULAS DE LEVADURA LIBRE E INMOVILIZADAS EN CÁSCARA DE CACAO*

Tesis previa a la obtención del

título de Ingeniero Químico

## **AUTOR**

Fausto Adolfo Castillo Ávila

Email: faisto.castillo@gmail.com

CI:0302576822

## **DIRECTOR**

Jorge Washington Delgado Noboa

CI:0103599411

CUENCA-ECUADOR

25 de Octubre del 2021

## RESUMEN

En la presente investigación se llevó a cabo la inmovilización de células de levadura *“Saccharomyces cerviciae”* en cáscara de cacao mediante el método de adsorción. Previamente se reprodujeron las células en cultivos y pre cultivos utilizando medios de cultivo enriquecidos llegando a identificar  $1,88 \times 10^9$  [cel. /ml]. La microcopia electrónica de barrido (SEM) de los soportes de inmovilización (cáscara de cacao) reveló adsorción de las células en sus poros, en donde se obtuvo una concentración de  $1,77 \times 10^9$  [cel. /ml] aproximadamente. Con las células inmovilizadas en la cáscara de cacao se realizó fermentaciones de tipo discontinuo con mucílago de cacao CCN-51 y también fermentaciones con células libres, con el cual se comparó y se analizó la producción de etanol dejándonos ver que con el sistema de células inmovilizadas se mejora 2,4 veces el rendimiento de etanol en relación al sistema de células libres. Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor de tanque agitado en las mismas condiciones de operación: pH [4], Temperatura 35 °C y una concentración inicial de azúcar [250 g/l]. Durante el proceso de fermentación se consumió casi el 100% del azúcar total generando 60 [g/l] de etanol y 25 [g/L] para el sistema de células inmovilizadas y células libres, respectivamente. Después la cuantificación de biomasa se llevó a cabo mediante el método de liofilización tanto para el sistema de células inmovilizadas como para el sistema de células libres; la concentración final de biomasa que se obtuvo fue de 16 [g/l] después de 50 horas de fermentación y 40 [g/l] después de 44 horas de fermentación tanto para el sistema de células inmovilizadas como para el de células libres, respectivamente.

**Palabras clave:** Medios de cultivo enriquecidos. Cáscara de cacao. Inmovilización. Adsorción. Fermentación por lotes. Etanol.

## ABSTRACT

In the present investigation, the immobilization of yeast cells "Saccharomyces cerviciae" in cocoa shell was carried out by the adsorption method. Cells were previously reproduced in cultures and pre-cultures using enriched culture media, identifying  $1.88 \times 10^9$  [cells / ml]. The scanning electron microscopy (SEM) of the immobilization supports (cocoa shell) revealed the adsorption of the cells in their pores where a concentration of approximately  $1.77 \times 10^9$  cells / ml was obtained. With the cells immobilized in the cocoa shell, discontinuous fermentations were carried out with CCN-51 cocoa mucilage and also fermentations with free cells with which the production of ethanol was compared and analyzed, letting us see that with the immobilized cell system the ethanol yield is improved 2.4 times in relation to the free cell system. The fermentations were carried out in a stirred tank bioreactor under the same operating conditions: pH [4] and Temperature  $35^{\circ}\text{C}$  with an initial concentration of sugar [250 g / l]; During the fermentation process, almost 100% of the total sugar was consumed, generating 60 [g / l] of ethanol and 25 [g / L] for the immobilized cells and free cells, respectively. Simultaneously, biomass quantification was carried out using the lyophilization method for both the immobilized cell system and the free cell system; under these conditions, a final biomass concentration of 16 [g / l] was obtained after 50 hours of fermentation and 40 [g / l] after 44 hours of fermentation in the immobilized cells and free cells, respectively.

**Keywords:** Enriched culture media. cocoa shell. Immobilization. Adsorption. Batch fermentation. Ethanol.

## ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN .....	13
1.1.    Objetivo General .....	15
1.2.    Objetivos Específicos.....	15
2 CONTENIDO TEÓRICO .....	16
2.1. El CACAO .....	16
2.1.1. Generalidades.....	16
2.1.2. Composición química del cacao.....	16
2.1.2.    Tipos de cacao.....	17
2.1.2.1.    El cacao a nivel mundial .....	17
2.1.2.2.    El cacao en el ecuador.....	19
2.1.3.    Mucílago de cacao.....	20
2.2. LEVADURAS .....	21
2.2.1. Generalidades.....	21
2.2.2 Características de las levaduras.....	21
2.2.2.    Características Esenciales de las Levaduras.....	22
2.2.3.    Crecimiento celular .....	23
2.2.4.    LEVADURA <i>“Saccharomyces cereviciae”</i> .....	25
2.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	28
2.3.1. Tipos de medios de cultivo .....	28
2.3.2. Requerimientos de los medios de cultivo.....	30
2.3.3. Conservación de medios de cultivo.....	33
2.3.4. Aislamiento .....	34
2.4. INMOVILIZACIÓN .....	34
2.4.2. MÉTODOS BÁSICOS DE INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS .....	34
2.4.3. MATERIALES DE INMOVILIZACIÓN .....	39
2.4.4. APLICACIONES DE LA INMOVILIZACIÓN .....	40
2.5. BIOETANOL.....	42
2.5.2. Definición.....	42
2.5.3. Fermentación alcohólica .....	42
2.5.4. Fermentación con células libres .....	43
2.5.5. Fermentación con células inmovilizadas.....	43
3. METODOLOGÍA .....	45
3.1. Materia prima .....	45

3.2.    Métodos.....	46
3.2.1.    Método de preparación de los soportes de inmovilización (cáscara de cacao) ...	46
3.2.2.    Método de inmovilización.....	46
3.2.3.    Método de fermentación .....	48
3.2.4.    Método para la determinación de contenido de etanol (micro difusión de Conway) 49	
3.2.6.    Método de Liofilización.....	54
3.2.7.    MÉTODO FENOL-ÁCIDO SULFÚRICO (Método de Dubois) .....	56
4.    RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.1.    Resultados de reproducción de células en medios de cultivo enriquecidos .....	59
4.2.    Análisis de los datos obtenidos por inmovilización de células de levadura en cáscara de cacao.....	59
4.3.    Análisis obtenido por resultados de microscopía electrónica de barrido para verificación de inmovilización.....	61
4.4.    Análisis de los resultados obtenidos por fermentación con células inmovilizadas ....	63
4.5.    Análisis de los resultados obtenidos en la fermentación de células libres .....	65
4.6.    Comparación de la fermentación Batch mediante el sistema de células libres y sistema de células inmovilizadas .....	67
4.7.    Análisis de los resultados obtenidos por cuantificación de biomasa mediante el sistema de células inmovilizadas .....	68
4.8.    Análisis de los resultados obtenidos por cuantificación de biomasa mediante el sistema de células libres .....	70
5.    CONCLUSIONES .....	71
6.    RECOMENDACIONES .....	72
7.    REFERENCIAS.....	73
8.    ANEXOS .....	79
8.1.    Resultados obtenidos en la fermentación de todos los experimentos. ....	79
8.2.    Registro de fotografías de cada etapa del proyecto realizado. ....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química del cacao .....	16
Tabla 2 Composición química del mucilago (theobroma cacao). .....	20
Tabla 3 Composición química de la levadura “ <i>saccharomyces cereviciae</i> ”.....	26
Tabla 4 Medios de cultivo de acuerdo a su consistencia física. ....	28
Tabla 5 Medios de cultivo de acuerdo a su origen. ....	29
Tabla 6 Clasificación de los microorganismos en función de la temperatura en que se desarrollan.....	31
Tabla 7 Tipos de microorganismos en función de los requerimientos de Oxígeno.....	32
Tabla 8 Los principales factores que influyen en la adsorción.....	35
Tabla 9 Soportes sólidos para adsorción.....	39
Tabla 10 Soportes para métodos de atrapamiento .....	39
Tabla 11 Materiales de floculación.....	39
Tabla 12 Material de membrana.....	40
Tabla 13 Equipo para preparar los soportes de inmovilización .....	46
Tabla 14 Condiciones óptimas de operación durante la fermentación. ....	48
Tabla 15 Equipos y reactivos para cuantificación de etanol por el método de micro difusión de Conway. ....	49
Tabla 16 Materiales y reactivos para preparación de las muestras para análisis MEB. .	53
Tabla 17 Resultados del conteo de células presentes en el proceso de inmovilización..	59
Tabla 18 Concentración de etanol generado en varios experimentos.....	64
Tabla 19 Concentración de biomasa a partir del método de Liofilización. ....	68
Tabla 20 Resultados del experimento 1, en condiciones de operación de pH [4], T °C [35] y velocidad de agitación 100 rpm. ....	80
Tabla 21 Resultados obtenidos del experimento 2, en condiciones de operación de pH [4], T°C [35] y velocidad de agitación 100 rpm. ....	81
Tabla 22 Resultados obtenidos obtenido del experimento 3, en condiciones de operación de pH [4], T°C [35] y velocidad de agitación 100 rpm. ....	82



Tabla 23 Resultados del experimento 4, en condiciones de operación de pH [4], T°C [35] y velocidad de agitación 100 rpm. ....	83
---	----

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Reacción del dicromato en medio ácido y el etanol .....	51
Ecuación 2 Reacción entre el dicromato de potasio sobrante y el yoduro de potasio ....	51
Ecuación 3 Reacción de cuantificación del yodo molecular mediante tiosulfato de sodio .....	51
Ecuación 4 Ecuación para cálculo de la concentración de etanol.....	52
Ecuación 5 expresión para el cálculo de la concentración de biomasa .....	56
Ecuación 6 Ecuación lineal para la curva de calibración.....	58
Ecuación 7 Formula para conteo total de células de levadura en una cámara Neubauer .....	60
Ecuación 8 Formula para conocer el factor de dilución .....	60

## TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Tipos de cacao .....	17
Ilustración 2 Variedad de cacao en Ecuador.....	19
Ilustración 3 Fases de crecimiento celular de las levaduras “ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ” .....	24
Ilustración 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en microscopia electrónica de barrido .....	26
Ilustración 5. Métodos básicos inmovilización de células.....	38
Ilustración 6 Proceso de conversión de glucosa a etanol.....	43
Ilustración 7 Diagrama de punto triple del agua.....	55
Ilustración 8 Técnica de conteo de células de levadura.....	60
Ilustración 9 curva del proceso de inmovilización de células de levadura.....	61
Ilustración 10 Microscopia electrónica de barrido de células inmovilizadas.....	62
Ilustración 11Producción de etanol en sistema de células inmovilizadas. ....	64
Ilustración 12 Producción de etanol en sistema de células libres. ....	66
Ilustración 13 Concentración de biomasa en sistema de celulas inmovilizadas con las condiciones de operación pH (4), temperatura (35°C) y 100 rpm.....	69
Ilustración 14 Producción de biomasa mediante sistema de células libres bajo las mismas condiciones de operación pH (4), temperatura (35°C) y 100 rpm.....	70
Ilustración 15 Serie de diluciones .....	79
Ilustración 16 Cultivo de la cepa de levadura usado en el desarrollo de los experimentos .....	84
Ilustración 17 Preparación e incubación de pre-cultivo.....	84
Ilustración 18 preparación de los soportes de inmovilización.....	85
Ilustración 19 Cosecha de células. ....	85
Ilustración 20 Visualización y conteo de células en cámara Neubauer.....	86
Ilustración 21 Secado de los soportes de inmovilización. ....	87
Ilustración 22 Adsorción y fijación de las células de levadura.....	87
Ilustración 23 Retención de humedad.....	88

Ilustración 24 Medición de parámetros del mucílago de cacao .....	88
Ilustración 25 Adición del mucílago de cacao en el reactor y ajuste parámetros de fermentación .....	89
Ilustración 26 Proceso de fermentación con células inmovilizadas .....	89
Ilustración 27 Preparación de las muestras para análisis de etanol. ....	90
Ilustración 28 Proceso de micro difusión del etanol.....	90
Ilustración 29 Proceso de titulación de muestras con tiosulfato de sodio. ....	91
Ilustración 30 Preparación y análisis de muestras para glucosa. ....	91
Ilustración 31 Análisis de biomasa por Liofilización. ....	92

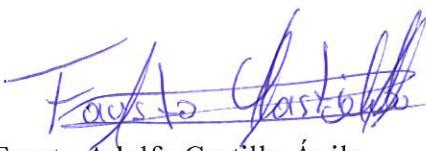


## CLAUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Fausto Adolfo Castillo Ávila en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación *ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS DE MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51 A PARTIR DE CÉLULAS DE LEVADURA LIBRE E INMOVILIZADAS EN CÁSCARA DE CACAO* de conformidad con el ART. 114 del código orgánico de la economía social de los conocimientos, creatividad e innovación reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice una publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 114 de la ley orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 25 de Octubre del 2021.



Fausto Adolfo Castillo Ávila  
0302576822



### CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Fausto Adolfo Castillo Ávila autor del trabajo de titulación *ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS DE MUCÍLAGO DE CACAO CCN-51 A PARTIR DE CÉLULAS DE LEVADURA LIBRE E INMOVILIZADAS EN CÁSCARA DE CACAO* certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 25 de Octubre del 2021.

Fausto Adolfo Castillo Ávila  
0302576822

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primeramente a Dios por permitirme culminar esta etapa de vida, llegar a este punto fue muy difícil fruto de mucho esfuerzo, trabajo y sobre todo dedicación a lo largo de toda mi formación académica.; también quiero agradecer a Dios por haberme brindado la bendición de tener a mi familia apoyándome incondicionalmente. Agradezco hoy y siempre a mis papas por todo su apoyo económico, ya que sin ellos este proceso no habría sido posible; agradezco también a mis compañeros que me tendieron la mano en los momentos que más he necesitado.

De igual manera, mi más sincero y profundo agradecimiento a mi director de Tesis, Mgst. Jorge Washington Delgado Noboa, quien me condujo en este este proyecto con esmero y paciencia, a través de sus conocimientos y experiencia me ha cuidado y transmitido conceptos fundamentales para desempeñar mi papel como profesional. Finalmente, quiero hacer un agradecimiento especial a mi compañero Esteban Cabrera quien me ha abierto la puerta de su casa en tiempos difíciles, ya que sin ello no habría llegado a culminar este proceso.

## **DEDICATORIA**

Lleno de regocijo, amor y esperanza, dedico este proyecto a mi padre, Fausto Román Castillo Herrera y a mi madre María Zoila Ávila Ludizaca por todo el apoyo brindado en cada momento, por sus consejos, por su amor incondicional, por la motivación y por los valores inculcados que me han permitido alcanzar mis metas y ser una persona de bien.

A mi compañero Jhonny Ponce con mucho cariño, por su compañía y motivación en el inicio de esta carrera. A mi compañera Daniela Cabrera por su apoyo incondicional en momentos de vulnerabilidad y a mi compañero Esteban Cabrera por su solidaridad en tiempos difíciles; deseándoles lo mejor en sus vidas y éxitos en su vida profesional

## 1 INTRODUCCIÓN

El sector energético a nivel del mundo según Sevilla B., 2020 hasta la actualidad transforma y comercializa los compuestos fósiles como lo es el petróleo 35 %, carbón 25 %, gas natural 21%. De acuerdo al informe de la asociación para el estudio del cenit petrolero (ASPO) en la actualidad se consume 4 veces petróleo de lo que se descubre y las petroleras se encuentran en una situación muy difícil para encontrar nuevos yacimientos. Si no se contara con las reservas que según Exxon Móvil es previsible descubrir se debería disminuir el consumo de petróleo a un orden de 4 a 6 % anual (Shell, 2016). Sin embargo, la demanda del consumo de energía sigue creciendo; por tal razón las principales petroleras en todo el mundo se encuentran investigando e incrementando sus inversiones en energías que son renovables, entre las energías alternativas que existen son eólica, solar, eléctrica, biomasa, biocombustibles, entre otras.(Rogtheer, 2018)

El sector energético tiene un gran desafío en la actualidad y para las nuevas generaciones, es hacer y proporcionar energía económicamente viable. La bioenergía moderna es una alternativa ya que esta puede brindar oportunidades para repotenciar el sector agrícola y fortalecer la economía. Para los países que se encuentran en vías de desarrollo la bioenergía consumida de forma sostenible lograría a que muchos sectores de la sociedad lleguen a tener acceso al beneficio energético. Países latinoamericanos como Brasil, Argentina, Chile, Costa rica, Colombia, Ecuador, México, Paraguay, Perú, Uruguay de acuerdo a la Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) son países en vías de desarrollo por ende aquellos que lograrían adquirir gran impacto económico y social gracias a las cadenas productivas de los biocombustibles. (FAO, 2015)

En el año 2005 la producción en el mundo de biocombustibles líquidos adscrito al transporte incremento a 16 mil millones de litros y para el 2015 ascendió a más de 100 mil millones. Hasta la fecha presente alrededor del 10 por ciento en combustible mundial deriva de los biocombustibles para el transporte, en países como Brasil la escala de estos es considerablemente más eminente ya que alcanza hasta un 23%. Según la agencia internacional de energía estima que en 2050 hasta el 27 por ciento del total mundial del combustible llegaría a derivar de los biocombustibles. Por otro lado, la misma agencia

internacional de energía prevee que en relación con los niveles de 2005, en el 2050 el consumo de biocombustibles en el sector del transporte lograría alcanzar un cinco por ciento en reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub> gracias al aprovechamiento energético. El efecto invernadero también se lograría minimizar si se consumiera la bioenergía, tales como energía Eólica, Solar tanto en la industria como en la construcción, etc. (FAO, 2015).

En el Ecuador la posibilidad de producir biocombustibles ha sido bien vista tanto por el sector público y privado, desde la óptica de rentabilidad económica lo han visto como una oportunidad que brindará importantes beneficios. En el Ecuador existen varias iniciativas para el desarrollo de biocombustibles, entre las que se puede contar: bioetanol, biodiesel, biomasa, entre los más importantes. Para la producción de bioetanol se puede usar como principales fuentes de materia prima a varios productos agrícolas cuyo rendimiento en litros por hectárea alcanzaría: a) Cebada 1000; b) Trigo 2750; c) Maíz 3250; d) Remolacha 5150; e) Caña de Azúcar 6000. Sin embargo, a primera vista el nivel de desarrollo es limitado ya que apenas una importante producción en materia de bioetanol es a base de caña de azúcar y biodiesel a base de palma africana (Martínez H., 2008).

Desde el 2008 se ha venido anunciando ejecutar un plan piloto de bioetanol, en la ciudad de Guayaquil en el año 2010 halló la luz el estudio de Impacto Ambiental y Plan de Manejo Ambiental del Plan Piloto de Formulación y uso de Gasolina Extra con Etanol Anhídrido por parte de la subsecretaría de Protección Ambiental y Ministerio de Minas-Petróleo (Juan & Morales, 2010). Con esto en el Ecuador una porción de los cultivos de caña que se destina para producir azúcar son procesados para obtener alcohol etílico, luego transformado por algunas empresas en alcohol anhídrido. Las empresas que tienen tecnología para producir alcohol anhídrido son: Producargo, Soderal, Codana; aquellas empresas muestran una capacidad de producción entre 120000 – 150000 mil litros de bioetanol diarios durante la época de zafra. Además de la caña de azúcar, se puede obtener alcohol del aprovechamiento de algunos subproductos derivados de la producción principal de azúcar y también de otros cultivos energéticos tales como la remolacha, el maíz y todo lo que sea material lignoceluloso (mucílago de cacao) (Juan & Morales, 2010).

El proyecto busca mejorar la productividad del bioetanol y estandarizar una técnica efectiva y viable de inmovilización de células en cáscara de cacao como soportes, con el

fin de lograr una mayor productividad y especificidad en la producción de bioetanol a base de mucílago de cacao. Para esto se plantea realizar la inmovilización de células de levadura en la cáscara de cacao empleando el método de adsorción, ya que estos materiales presentan como ventaja gran superficie específica (altamente poroso), material altamente fibroso y con buena capacidad de retención.

### **1.1. Objetivo General**

Comparar el tiempo de fermentación, rendimiento y productividad de etanol usando células libres e inmovilizadas en un birreactor bajo las mismas condiciones de operación en la fermentación de mucilago de cacao.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Determinar el tiempo de fermentación y productividad del etanol usando células libres.
- Inmovilizar células de *Saccharomyces cereviciae* en soportes sólidos porosos (cáscara de cacao)
- Determinar el tiempo de fermentación y productividad del etanol usando células inmovilizadas.

## 2 CONTENIDO TEÓRICO

### 2.1. El CACAO

#### 2.1.1. Generalidades

El cacao es una planta nativa, agrícola tropical de América cultivado inicialmente por pequeños productores “se da comúnmente en los territorios de Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, México entre otros, su origen no es preciso ya que existe una tesis de dispersión acerca de su génesis” (Rizzuto, 2015). Su utilización se remonta a la época de los mayas, aztecas e incas; desde aquel tiempo se ha consumido para fines medicinales y nutricionales. Como uso principal que se da es en la elaboración de chocolate, el cacao brinda aportes nutritivos como la vitamina A, vitamina B, el calcio, el hierro o el cobre ( Sanchez L., 2018).

Generalmente un árbol empieza a producir frutos aproximadamente a los cuatro o cinco años de vida. El fruto del árbol de cacao se llama “mazorca”, la cual es una baya grande ovalada y carnosa con una coloración que varía desde el amarillo al púrpura y tiene una medida de 30 cm de largo. Dentro de cada mazorca se encuentran incrustadas entre 30 y 40 semillas en una pulpa. El fruto al madurar llega a pesar unos 450 gramos; las cosechas de cacao se dan por lo general dos veces al año en climas tropicales sin estaciones, al final de la época lluviosa hasta el inicio de sequía y otra al principio del siguiente período de lluvias. Cada cosecha demora entre cinco a seis meses (CONAVIO, 2012).

#### 2.1.2. Composición química del cacao

La composición química del cacao se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 1 Composición química del cacao.

Parámetros	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Cenizas (%)	Acidez (meq. De NaOH/g de muestra)	pH
Granos frescos	32.5+-0.42	14.42+-0.50	4.3+-0.04	1.72+-0.07	6.48+-0.09
Granos fermentados	46.32+-0.28	13.03+-0.12	3.46+-0.17	1.83+-0.06	5.3+-0.09
Granos fermentados y secados al sol	6.68+-0.13	12.89+-0.14	3.02+-0.07	1.55+-0.04	5.04+-0.02

Granos fermentados, secados al sol y tostados	2.96+-0.01	12.53+-0.01	3.68+-0.01	1.30+-0.01	5.18+-0.01
---	------------	-------------	------------	------------	------------

Fuente: (Lares, Pérez, Álvarez, Perozo, 2013)

### 2.1.2. Tipos de cacao

#### 2.1.2.1. El cacao a nivel mundial

De acuerdo a Merchan & Flores (2017) existen diferentes variedades de cacao a nivel del mundo entre ellos tenemos: criollo, forastero, trinitario, fino de aroma (arriba) y con ajustes genéticos.



Ilustración 1 Tipos de cacao  
Fuente (Merchan & Flores, 2017)

##### 2.1.2.1.1. Criollo

Este cacao es el más antiguo antes de la llegada de los españoles ya brindaba frutos en centro América. Son árboles pequeños, delgados, de forma redonda tanto sus ramas como su follaje. Esta variedad de fruto es considerada “*fino de aroma*”; la mazorca es de semillas redondeadas y corteza suave, son de color verdes rojizos cuando están inmaduros y amarillo tendientes a rojos al lograr el estado maduro. Se caracteriza por poseer el contenido en taninos más bajo (compuestos fenólicos), esta es la razón por la cual esta variedad es muy producida para la elaboración de productos a base de cacao. La siembra se realiza en Países de América Central y del Sur como: México, Ecuador, Colombia, Brasil, el Caribe también en Indonesia, y Nueva Guinea. (Middleton, 2019; Tapia, 2019)

#### 2.1.2.1.2. Forastero amazónico

Este tipo de cacao es muy conocido como Amazónico por lo que se encuentra distribuido en la Cuenca del Amazonas y en sus afluentes. Este tipo de cacao al madurar es de color amarillo y al estar inmaduros son de color verde; forman un pequeño cuello de botella en su base, esta especie tiene un color violeta o morado y su almendra es aplanada. De la producción mundial esta variedad ocupa el 80% e incluye el denominado Cacao Nacional de Ecuador. Cabe mencionar que estos cultivos también se encuentran en África occidental y al este de Asia. (Villagómez García & Argüello Moreta, 2013)

#### 2.1.2.1.3. Trinitario

Esta variedad es heterogéneo y resulta del cruzamiento del criollo con el forastero siendo de calidad intermedia, sin embargo, posee un mejor rendimiento que éstas. Se seleccionó en Trinidad de ahí su nombre; sus frutos son rojos y verdes cuando están inmaduros, mientras que al madurar son anaranjados y amarillos. Las mazorcas de esta variedad pueden contener más de 30 semillas en su interior y almendras de un tono verde variable; representan el 10-15% de la producción mundial. (Oballe, 2016)

#### 2.1.2.1.4. Variedades con ajustes genéticos

Los ajustes genéticos que se realiza al cacao son con la finalidad de incrementar el nivel de ingresos de los productores, combatir ciertas enfermedades de forma económica amigable con el medio ambiente y contribuir a su vez, con un suministro estable de cacao para la industria; situación que favorecerá a familias productoras, fabricantes de chocolates y a los ecosistemas (Niels Hidalgo, 2015).

A partir de experimentos y análisis de campo llevados a cabo durante los últimos 15 años, el Programa de Mejoramiento Genético del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) desarrolló y seleccionó un grupo de “seis clones trinitarios en el 2007 de gran producción y tolerancia a enfermedades como Moniliasis los cuales son: CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1 y PMCT-58” (Phillips-mora, Arciniegas-leal, Mata-quirós, Motamayor-arias, & Motamayor-arias, 2012). También en Ecuador el agrónomo Homero Castro Zurita desarrolló la variedad CCN-51 con las siguientes características: tolerante a las enfermedades, de alta producción y buena calidad.

### 2.1.2.2. El cacao en el ecuador

En el Ecuador de acuerdo a Miranda (2015) se produce y se comercializan dos tipos de cacao: fino de aroma conocido como nacional y el CCN-51 el cual es una variedad con ajuste genético.



Fino de aroma



CCN-51

*Ilustración 2 Variedad de cacao en Ecuador*

*Fuente (Anecacao, 2015; Miranda, 2015)*

#### 2.1.2.2.1. Fino de aroma

El cacao fino de aroma es un producto emblemático del Ecuador el mismo que se caracteriza por su aroma y sabor que son muy aceptados por los productores de chocolate nacionales y extranjeros. El Ecuador es uno de los mejores productores de cacao en este caso el fino de aroma, produce el 63 % de la producción mundial debido a las condiciones geográficas y recursos biológicos que posee. (Miranda, 2015)

Este tipo de cacao es proveniente de la variedad nacional que lo promueve Anecacao destinado para el mercado internacional; con fines de producción de chocolates muy refinados. Este tipo de chocolate fino de Ecuador se caracteriza por su pureza, el sabor y fragancia que el cacao tiene seguido de lejos por México, Panamá y Venezuela. Ecuador se posiciona como un país que más compite de América Latina en este sector aunque de a poco se ha incrementado la participación de los otros países en el mercado mundial del cacao fino en grano. (Miranda, 2015)

#### 2.1.2.2.2. CCN-51

El cacao CCN-51 es una variedad de cacao que se produce en gran cantidad en Ecuador. Se puede decir que esta variedad es un clon producido por el hombre con la finalidad de mejorar la productividad y calidad y además que sea tolerante a enfermedades. Después de su investigación ha sido bautizado con letras y números como lo es **CCN-51**. En cuanto

a los colores estos varían dependiendo si están tiernas, tienen color rojizo-morado y si están maduras rojizo anaranjadas (Aguilar D., 2018).

### 2.1.3. Mucílago de cacao

El mucílago es un elemento viscoso que contiene el cacao. Es una materia orgánica de origen vegetal, es desconocida su estructura molecular completa pero tienen un peso molecular elevado  $> 200000$  g/mol. “Los mucílagos están conformados por polisacáridos celulósicos que comprende el mismo número de azúcares que las gomas y pectinas, se pueden diferenciar solo con la propiedad física de las gomas y la pectina además, generan coloides muy poco viscosos que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados” (Puerari C. et al., 2012). “El mucílago que acompaña a las semillas de cacao contiene entre 82 y 87% de agua, es rico en azúcares entre el 10 y 15% de su peso conformada de la siguiente manera: 60% sacarosa, 39 % de una mezcla entre glucosa y fructosa, de 2 al 3% de pentosas, ácido cítrico 1-3% y pectina de 1-1,5%. Además vitaminas entre la más importante la vitamina C (25 mg/100 ml), aminoácido y proteínas siendo un medio favorable para el crecimiento microbiano” (Puerari C. et al., 2012).

Tabla 2 Composición química del mucilago (theobroma cacao).

Parámetro	Cantidad
Total de sólidos soluble (°Brix)	16.17±0.74
Azúcares Reductores Totales (g/L)	235.31±6.42
Humedad %	85+- 8.60
Glucosa (g/L)	214.24±6.42
Sacarosa (g/L)	21.31±21.31
pH	3.75±0.81
Acidez Titulable [meq/l]	170±6.28
Ácido cítrico [mg/l]	9.14±0.64
Ácido málico [mg/l]	3.7±0.50
Ácido acético [mg/l]	2.28±0.70
Ácido oxálico [mg/l]	1.27±0.72
Ácido láctico [mg/l]	1.23±0.01
Ácido fumárico [mg/l]	0.02±0.01
Fosforo total [mg/l]	62.47±3.43
Calcio [mg/l]	171.5 ±34.01
Sodio [mg/l]	30.5±3.77
Potasio [mg/l]	950±16.32
Magnesio [mg/l]	82.5+-0.81
Grasa %	3.54±0.2
Proteína total [g/l]	7.2±0.21

Fuente: (Anvoh, Zoro, & Gnakri, 2009)

## 2.2. LEVADURAS

### 2.2.1. Generalidades

“Las levaduras son microorganismos que producen sobre los medios de cultivo colonias pastosas, en la mayor parte compuesto por células aisladas que varían en su forma desde alargadas, ovoideas, elipsoides o esféricas” (Espinoza Ordoñez, 2015). “Las dimensiones de las levaduras suelen oscilar de 1 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y 2 a más de 20  $\mu\text{m}$  de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores” (Carlile M. et. al., 2001). En el sector industrial y biotecnológico las levaduras son de gran importancia ya que son esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas, tales como sidra, pan, cerveza, y vino. Además suelen estar relacionados en la degradación de algunos alimentos por contaminación en la cosecha y por procesos de fermentación (Senses-Ergul, Ágoston, Belák, & Deák, 2006).

### 2.2.2 Características de las levaduras

Entre las características importantes se puede nombrar lo siguiente.

- 1) Estos organismos constan de una célula, su estructura varía entre 3 a 30 micrones de diámetro los mismos que son ovaladas o redondas.
- 2) Forman colonias, esto sucede ya que son de reproducción rápida, además son organismos pequeños es decir que para poder verse a simple vista se debe esperar tres días, en donde sus colonias alcanzan un aproximado de siete milímetros con una consistencia cremosa.
- 3) Es capaz de vivir con oxígeno o sin él; esto se debe a que son microorganismos anaerobios facultativos.
- 4) Son capaces de desgastar alimentos ácidos o de baja humedad ya que en el proceso usan algunas sustancias que son un tanto complejas tal como el almidón.
- 5) Su reproducción es muy rápida. Aproximadamente dos horas se toman para reproducirse y no son tan exigentes en cuanto a la nutrición.
- 6) Reproducción sexual o asexual; debida a esto la levadura puede manifestarse en dos estados, haploide y estado diploide.
- 7) Son organismos eucariotas, es decir que contienen su material genético dentro de un núcleo.

- 8) Se pueden transformar genéticamente de manera frecuentemente, son usadas como modelos biológicos en diferentes estudios de procesos metabólicos (Degrossi. C. & Wachsman. M., 2005).

### 2.2.2. Características Esenciales de las Levaduras

#### 2.2.2.1. Temperatura

Los valores de temperatura en que se desarrollan muchas de las levaduras comprenden entre 5 y 37 °C. La temperatura óptima esta entre los 28°C sin embargo, en algunos casos el desarrollo se da cerca de 0°C o hasta por debajo pero con crecimiento lento. Cabe mencionar que las levaduras no son microorganismos termófilos pero si requieren de un poco más de temperatura que la óptima cuando se encuentran en sus fases de crecimiento ya sea en su fase exponencial o estacionaria (A. Uribe, Cortes, & Alexader, 2007).

#### 2.2.2.2. pH

Las levaduras para su crecimiento necesitan de un pH óptimo el cual varía entre 4,5 a 6,5 sin embargo hay muchas especies que toleran grandes variaciones de pH; de 2,8 a 8,5. El pH tiene gran incidencia en la susceptibilidad de una célula por ejemplo: la sensibilidad a un ácido orgánico es dependiente del pH y también de la facultad de la levadura para metabolizar o eliminar el ácido si este penetra la célula. Cuando un ácido esta disociado en forma de ion H<sup>+</sup> este no penetra la célula, por lo que tiene efecto inhibidor, y por el contrario un ácido no disociado RCOOH si puede hacerlo. Por esta razón los ácidos sorbico, propionico son más inhibidores que los ácidos acéticos, cítricos y lácticos (Uribe et al., 2007).

#### 2.2.2.3. Oxígeno

Las levaduras por lo general son aeróbicas, cuando el oxígeno está presente y existen los suficientes carbohidratos en el medio estas crecen para producir la biomasa y CO<sub>2</sub>. Sin embargo, cuando esta disminuido el oxígeno o no hay en su totalidad, las levaduras se transforman y realizan metabolismo anaerobio o fermentativo, esto genera producción de alcohol y transformación de menor cantidad de biomasa ( Brock, 1997; Uribe et al., 2007).

#### 2.2.2.4. Elementos de Nutrición de las levaduras

Las células de levadura para su desarrollo necesitan de fuentes de nitrógeno mineral, orgánico entre los cuales se puede usar urea, peptona entre otros derivados proteicos solubles además carbono orgánico como fuente de energía (D-glucosa, la D-fructosa y

la D- manosa) que se lo puede suministrar a través de azucres. Otras fuentes de nitrógeno como ion amonio; el nitrato amónico, el cloruro amónico, el fosfato amónico también, el sulfato amónico, ya que es un compuesto de buena utilidad debido a que aporta al medio azufre para la formación de varios aminoácidos. (Manzanos, 2014)

Uno de los elementos importantes en la nutrición es el fosforo, el cual es un alimento frecuentemente valioso en el desarrollo de las levaduras y es de gran importancia en la generación de etanol. Es materia prima en la generación de fosfatos, hexosa y triosa; se encuentra en los ácidos nucleicos, también en la lecitina y en ciertos componentes de las células de la levadura. (Uribe et al., 2007) además del fosforo se necesitan de minerales, y un elemento cualitativamente importante es el Potasio ya que ejerce funciones fisiológicas interesantes en la levadura. Actúa como Catión Regulador también, estimula la fermentación y la respiración. Por otro lado el Potasio está presente en algunas vitaminas, el 60% está incorporado en las proteínas y el 5% está en forma de sulfato inorgánico libre y el resto en forma de aminoácidos sulfatados libres y enlace bisulfito. (Uribe et al., 2007)

Para el buen funcionamiento de muchos microorganismos en el metabolismo es necesario el magnesio; juega el papel de regulador de las ATPasas de las membranas, estimulador en la síntesis de los ácidos grasos y activador de las células glicolíticas, participa con el potasio en la penetración del fosfato y es incorporado a los medios de cultivo en forma de cloruro de magnesio o de sulfato. (Uribe et al., 2007) un elemento que no es indispensable es el calcio sin embargo, es utilizado durante la fase de crecimiento para favorecer el mantenimiento de la integridad celular en entornos hostiles. Por ultimo otra de las vitaminas importantes es el zinc el cual es un cofactor de células como la aldosa y es fundamental en la glicolisis. Además se requiere este elemento en la síntesis de vitaminas como la riboflavina y por otro lado estimula la acción del magnesio. ( Buoix, 2003)

### 2.2.3. Crecimiento celular

Las levaduras, para que se produzca su crecimiento celular deben cumplir con un protocolo llamado ciclo de crecimiento, el cual consta de diferentes fases. Las mismas se presentan en la siguiente ilustración.

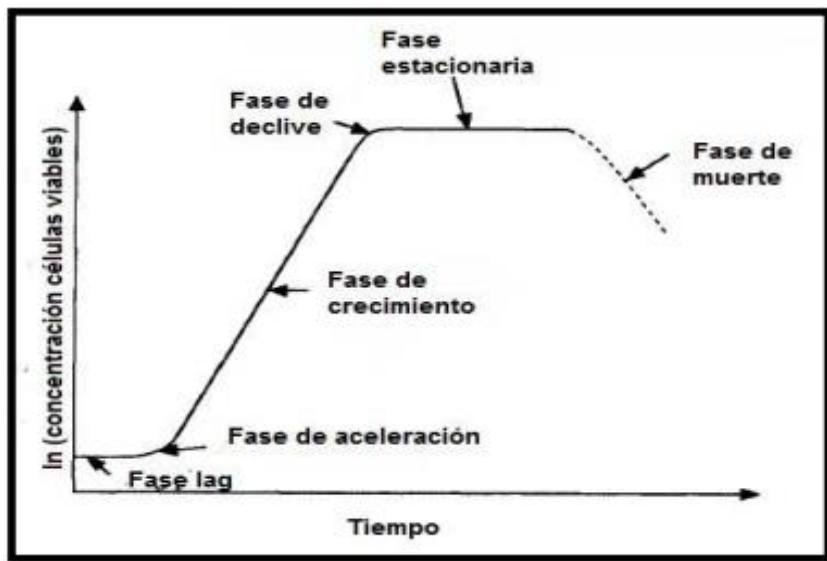


Ilustración 3 Fases de crecimiento celular de las levaduras “*Saccharomyces cerevisiae*”

Fuente: (Shuler T., 2015)

#### 2.2.3.1. Fase de latencia (lag) (1)

Se la conoce como fase de adaptación o fase lag, durante esta fase las levaduras adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales, los nutrientes, pH, Temperatura, etc.; para posteriormente iniciar la multiplicación. (Viteri A. et al., 2017) En esta fase la velocidad específica de crecimiento es cero ( $\mu = 0$ ) (Plata A., 2013).

#### 2.2.3.2. Fase de aceleración (2)

La fase de aceleración es la parte en donde aumentan los compuestos estructurales como el ácido ribonucleico, proteínas y el peso individual y por último aumenta la concentración celular. La velocidad específica de crecimiento incrementa pero aun es menor a la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu < \mu_{max}$ ) (Plata, 2013).

#### 2.2.3.3. Fase de crecimiento exponencial (3)

Esta fase es donde la velocidad de crecimiento es la máxima y permanece constante; durante esta fase, las levaduras metabolizan los nutrientes a mayor velocidad y aumenta la población (Viteri et al., 2017). La velocidad específica de crecimiento es aproximadamente igual a la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu \approx \mu_{max}$ ) (Plata, 2013).

#### 2.2.3.4. Fase de declive (4)

A esta fase se conoce como desaceleración, por lo que el crecimiento celular empieza a disminuir ya que disminuye la cantidad de nutrientes que regulan el crecimiento.

Entonces la consecuencia es que el incremento de la población ya no es constante; pero es la fase en donde se encuentra el máximo valor en concentración celular. (Viteri A. et al., 2017)

#### 2.2.3.5. Fase estacionaria (5)

En la fase estacionaria, no crece el número de levaduras; a esta fase las levaduras entran debido a que existe insuficiencia de un cierto nutriente esencial (glucosa, sacarosa), y porque se han creado durante la fase exponencial ciertos productos residuales que provocan que el sistema se vuelva inhóspito o también porque están presentes competidores que no permiten su crecimiento (Viteri A. et al., 2017). La velocidad específica de crecimiento es menor a la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu < \mu_{max}$ ) (Plata A., 2013).

#### 2.2.3.6. Fase de muerte (6)

La fase de muerte, es aquella en donde se genera una reducción del número de levaduras viables del cultivo por la ausencia de nutrientes, ya que no hay azúcares y además porque la concentración de etanol es muy alto lo que conlleva a la muerte de las células. (Viteri A. et al., 2017) La velocidad específica de crecimiento es menor a cero ( $\mu < 0$ ) (Plata A., 2013).

### 2.2.4. LEVADURA “*Saccharomyces cereviciae*”

Estas especies son hongos unicelulares alargadas, esféricas o elipsoidales que pueden encontrarse agrupadas de dos, en cortas cadenas, también en racimos o simplemente solas. Son capaces de formar colonias que son muy diversas, pueden mostrar un color crema o levemente café, de aspecto liso a rugoso, brillante u opacas. (Calzada A. & Bueno A., 2000)

Es un microorganismo anaeróbico con la capacidad de metabolizar azúcares como: glucosa, fructosa, manosa presentes en un mosto, asimila galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, no metabolizan lactosa. Además los parámetros óptimos de temperatura y pH para el crecimiento de este microorganismo son entre 25 – 35 grados centígrados con pH ácidos, respectivamente, con la presencia de oxígeno tienen la capacidad de metabolizar oxidativamente sustratos como etanol, glicerol y lactato. (Petrenko, 2005; Sánchez, 2011)



Ilustración 4. *Saccharomyces cerevisiae* en microscopía electrónica de barrido

Fuente: (Calzada A. & Bueno A., 2000)

#### 2.2.4.1. Composición química

“La levadura *Saccharomyces cerevisiae* está constituida aproximadamente un 75% de agua y un 25% en materia seca, la composición de esta materia en seco se presenta en la tabla 3” (Fajardo, 2007; Tapia, 2019).

Tabla 3 Composición química de la levadura “saccharomyces cerevisiae”

Componentes	Porcentaje
Polisacáridos	34,1
Trehalosa	5
Ácidos nucleicos y nucleótidos	10,8
Fosfolípidos	4,5
Triglicéridos	2,5
Esteroles	1
Ceniza	3,1
Proteína	39

Fuente: (Tapia, 2019)

#### 2.2.4.2. Requerimiento físico –químico

Los requerimientos para el desarrollo de una levadura es un pH adecuado, en donde Estrada et al. (2015); Tapia, (2019) mencionan en sus trabajos de investigación que el desarrollo de la levadura se da a pH de 4.5 y 20°Brix. Además, Fajardo (2007) indica que el crecimiento de “*Saccharomyces cerevisiae*” se da mejor con un pH entre valores de 4.0 a 5.0. Sin embargo, se ha observado en un experimento que se logra mejor desarrollo con un pH inicial en el medio de 4.0 debido a que se generan compuestos especialmente ácidos que afectan en el desarrollo celular, también en la utilización de la glucosa ya que estas poseen una gran tolerancia frente a los diferentes cambios de pH (Fajardo, 2007).

#### 2.2.4.3. Inhibidores de crecimiento

La viabilidad y el desarrollo de las células de levaduras se ven desfavorecidas por causa del stress osmótico o también por la presencia de ciertos inhibidores tales como; CO<sub>2</sub>, alcohol etílico, ácidos grasos saturados de varios átomos entre ellos (6-8-10 Carbono) y ciertos pesticidas implicados en el cultivo agrícola, los cuales inhiben la conducción del azúcar. Otros inhibidores son el pantotenato de calcio, la tiamina el cual para que no influyan en el crecimiento de la levadura debe estar a una concentración máxima, alrededor de 6,25 miligramos por litro y 5 miligramos por litro, respectivamente (Estrada et al., 2015). Otro de los compuestos, es la biotina que se requiere máximo en una concentración de 1 milígramo por litro para que no afecte a las reacciones anabólicas que son: carboxilación del piruvato, síntesis de las bases púricas y pirimídicas de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos. Además existen algunos elementos metálicos inhibidores como: plata (Ag), arsénico (As), bario (Ba), litio (Li), níquel (Ni), osmio (Os), plomo (Pb), selenio (Se) y telurio (Te) (Telles P. et. al., 2012).

#### 2.2.4.4. Tolerancia al etanol

La síntesis de alcohol a partir de azúcares fermentables es el propósito principal de la fermentación en la fabricación de bebidas como la cerveza, el tequila, vino y la producción de compuestos particulares de sabor, que da la levadura *Saccharomyces cereviciae*. Sin embargo, en la fermentación es importante una población viable y vital de levadura. Como la fermentación va progresando, la concentración de etanol aumenta y las células se exponen a niveles cada vez más tóxicos de etanol (de 8% (p/v) al 18% (p/v)), afectando la viabilidad de la célula y su crecimiento, en la biosíntesis de la macromolécula y en la estructura de la membrana y su función (Gibson, Lawrence, Leclaire, Powell, & Smart, 2007). Ejemplo en la producción de vino mayoritariamente, las levaduras se detienen cuando el alcohol alcanza una concentración del 13 % ya que por encima de esta concentración las levaduras no sobreviven.

La identificación y caracterización de cepas de levaduras ha causado gran interés debido a que poseen alta tolerancia al etanol para esto se han modificado cepas de *Saccharomyces Cereviciae* genéticamente con capacidad de tolerar etanol en medio ácido y a elevadas temperaturas (39-41°C) para un potencial uso en la generación de bioetanol (Lopez Vital, 2016) véase también (Benjaphokee et al., 2012).

### 2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Se denominan medios de cultivo a los caldos que poseen una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en óptimas condiciones físicas, permiten el desarrollo de los microorganismos. Estos medios son importantes en un laboratorio de Microbiología por lo que se debe tener mucha precaución en su elaboración, preparación, conservación y utilización, esto asegura la confiabilidad, exactitud, y reproducibilidad de los resultados que se desean obtener. ("análisis Bioquímico", 2019, capítulo 2; Orrego, 2008) Tipos de medios de cultivo

#### 2.3.1. Tipos de medios de cultivo

##### 2.3.1.1. De acuerdo a su consistencia física

Los medios de cultivo de acuerdo a su consistencia física se clasifican según la tabla 4.

Tabla 4 Medios de cultivo de acuerdo a su consistencia física.

Líquidos	Se consideran caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa
Sólidos	Se logran añadiendo un agar a un cultivo líquido (caldo) a razón de 15g/litro. El agar es una sustancia inerte (polisacárido) es decir hidrato de carbono que se extrae de las algas. Esta sustancia no es digerida por los microorganismos por lo que no constituye ningún elemento nutritivo. Este conjunto se puede verter convenientemente esterilizado en placas Petri o tubos de ensayo y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar microorganismos.
Semisólidos	Contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio.

Fuente: (Lopez & Torres, 2007)

##### 2.3.1.2. De acuerdo a su origen

Los medios de cultivo de acuerdo a su origen se encuentran clasificados según la tabla 5.

Tabla 5 *Medios de cultivo de acuerdo a su origen.*

<b>Naturales:</b> son medios preparados con compuestos naturales de origen vegetal o animal por ejemplo: infusiones, extractos de tejidos de donde la composición química no es conocida.
<b>Sintéticos:</b> medios que contienen una composición química definida cualitativamente y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.
<b>Semisintéticos:</b> son aquellos medios sintéticos que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, un ejemplo es el extracto de levadura.

**Fuente:** (Lopez & Torres, 2007)

#### 2.3.1.3. De acuerdo a su composición

Los microorganismos en los caldos de cultivo tienen requerimientos químicos, por lo que a veces se requiere adicionar o eliminar componentes químicos del medio de cultivo. A estos medios de acuerdo a Lopez & Torres (2007); Unam (2019) se denominan:

1. **COMUNES:** su composición tiene como finalidad el crecimiento de gran parte de las células poco existentes. Es un medio constantemente utilizado para sostener colonias microbianas; ejemplo: el agar común, caldo común
2. **ENRIQUECIDOS:** Son medios que están compuestos por un medio base como soporte para el desarrollo del mismo, se puede tener grandes cantidades en exceso de nutrientes que trabajan como suplementos nutritivos, por ejemplo: líquido ascítico, suero, sangre, etc. Este medio de cultivo se utiliza para el desarrollo microorganismos que poseen exigencias nutricionales altas.
3. **SELECTIVOS:** Este tipo de medio sólo da paso al crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el resto, en estos medios la selectividad se alcanza modificando las condiciones físicas (oxígeno, pH, CO<sub>2</sub>, temperatura) o sea eliminando o agregando elementos químicos específicos con la finalidad de inhibir el crecimiento de las especies químicas que no son de interés; los antisépticos y antibióticos son los factores que inhiben el crecimiento de dichas especies. Se usa ocasionalmente para

aislar y seleccionar microorganismos desde una población mixta. Ejemplo: el agar salado-manitol dicho medio permite el crecimiento de ciertos estafilococos.

4. **DIFERENCIAL:** medios de cultivos que permiten diferenciar entre varios géneros y especies de microorganismos, fácilmente con la diferencia en el color entre las colonias que se encuentran aisladas. Este medio de cultivo es “el agar con azul de metileno – eosina” el cual facilita identificar y separar *E. coli*, de las *Enterobacter aerogenes*, a las primeras se les identifica como colonias opacas y con brillo de metal y a las segundas en colonias rosadas de centro azul exentas de brillo.

**DE ENRIQUECIMIENTO:** la técnica de enriquecimiento es aquella que se emplea en un medio selectivo líquido con cierta propiedad química o física, estos medios se incuban bajo condiciones especiales que favorece al desarrollo de un microorganismo en particular.

5. **DE TRANSPORTE:** con estos medios se asegura la viabilidad del microorganismo generalmente se emplea para transportar desde un lugar a otro sin multiplicación de los microorganismos hasta el momento de su estudio.

### 2.3.2. Requerimientos de los medios de cultivo

Mateus (2010) refiere que el desarrollo normal de los microorganismos en los medios de cultivo está influenciado por una cierta cantidad de factores de gran importancia que además muchas veces llegan a ser ajenos por completo del propio medio. Estos factores son:

#### 2.3.2.1. Disponibilidad de nutrientes adecuados

Para la investigación microbiológica un medio de cultivo adecuado a de contener macronutrientes y micronutrientes como fósforo, nitrógeno, carbono, azufre, sales inorgánicas, en ciertos casos para un buen desarrollo se requieren vitaminas y otras sustancias inductoras (minerales). El suministro de las sustancias se realiza en forma de extractos de carne, de levadura o infusiones de carne. El único inconveniente es que provoca la pérdida de los factores nutritivos en la preparación de las sustancias para su aplicación a los medios de cultivo. (Cerra et al., 2013)

En general siempre deben estar presentes las sustancias importantes para actuar como donantes o captadores de electrones en las posteriores reacciones químicas que ocurren.

La forma más efectiva en la actualidad para incorporar estas sustancias como fuentes de carbono y nitrógeno es utilizando peptonas. Los microorganismos que no tienden a utilizar de inmediato las proteínas naturales son capaces de atacar los aminoácidos y ciertos compuestos de nitrógeno más simples presentes en las peptonas. (Cerra et al., 2013; Yu, Zhang, & Tan, 2007)

Algunos microorganismos tienen requerimientos nutritivos específicos entonces por efecto se añade a muchos caldos sustancias ricas en nutrientes como sangre, líquido ascítico, suero, entre otros. De la misma manera se vuelve muy necesario disponer sustancias promotoras del crecimiento (vitaminas) además, de sales minerales donde se encuentre el calcio, potasio, magnesio, manganeso, sodio como el sulfato de Magnesio heptahidratado  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  o el Fosfato monopotásico  $K_2HPO_4$  y algunos carbohidratos. Si se requiere inhibir microorganismos no deseables o señalar actividades metabólicas a menudo se incorporan a los caldos de cultivo colorantes con capacidades de ejercer dichos requerimientos. (Campo, 2016; Cerra et al., 2013)

### 2.3.2.2. Consistencia adecuada en el medio

Un medio de cultivo cuando necesita una cierta consistencia podemos modificarlo partiendo desde un medio líquido, luego adicionando productos que los convierten en medios de estado semisólido o sólido, entre estos productos están: la albúmina, gelatina o agar. Hay que tener en cuenta que existe el gran inconveniente al usar gelatina en los medios. Los microorganismos no crecen adecuadamente en temperaturas que se encuentran por debajo del punto de fusión de dicho solidificante. En la actualidad los medios sólidos y semisólidos son de uso universal, debido a su versatilidad y comodidad, pero en los laboratorios no se descarta los medios líquidos y también se utilizan en grandes cantidades. (Yu et al., 2007)

### 2.3.2.3. Temperatura

La temperatura tiene gran influencia en las reacciones químicas y la velocidad con que se efectúan estas reacciones, esto quiere decir que la temperatura es determinante en la rapidez a la que se desarrollan las células microbianas. Las especies microbianas poseen óptimas temperaturas de desarrollo (Mateus, 2010). Las temperaturas de crecimiento se clasifican en 3 tipos.

Tabla 6 Clasificación de los microorganismos en función de la temperatura en que se desarrollan.

Psicrófilas	Microorganismos con temperaturas de crecimiento a 0° C. Su temperatura óptima fluctúa por los 15° C.
-------------	--

<b>Mesófilas</b>	Microorganismos con capacidad de desarrollarse entre (25 -40)° C.
<b>Termófilas</b>	Microorganismos con capacidad de crecer entre (45 – 60)° C.

Fuente (Mateus, 2010)

#### 2.3.2.4. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases

Una gran cantidad de microorganismos, pueden crecer en diferentes atmósferas con o sin presencia de oxígeno; dependiendo en qué ambiente se desarrollan se encuentran clasificados.

Tabla 7 Tipos de microorganismos en función de los requerimientos de Oxígeno.

Microorganismos	
<b>Aerobios</b>	Microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre, algunos tienen la capacidad obtener el oxígeno desde variados sustratos.
<b>Anaerobios estrictos</b>	Microorganismos que se desarrollan en ausencia completa de Oxígeno.
<b>Microarófilos</b>	Microorganismos que crecen en un punto intermedio, se desarrollan mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias.
<b>Anaerobios facultativos</b>	Microorganismos que poseen un metabolismo que pueden adaptarse a presencia como ausencia de oxígeno libre.

Fuente (Mateus, 2010)

#### 2.3.2.5. [pH]

Para un buen crecimiento de los microorganismos, es de suma importancia la concentración de los iones de hidrógeno. Algunos se desarrollan mejor en medios de pH neutro, otros se desarrollan mucho mejor en medios más o menos ácidos (Cerra et al., 2013). Hay que tener en cuenta que pueden inhibir y hasta alterar procesos normales metabólicos por la alteración del pH debido al uso de los carbohidratos, lo cual genera acidificación o catabolismo de proteínas lo que genera alcalinización. Para corregir el pH se hace un control mediante sistema tampón; llevando el medio a un pH de aproximadamente 6,8. Los más usados en microbiología es la conjugación de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Mateus, 2010).

### 2.3.2.6. Condiciones adecuadas de humedad

Para el correcto desarrollo de los microorganismos, se requiere un nivel de humedad mínimo tanto en la atmósfera como en el caldo de cultivo. En la estufa de un cultivo hay que considerar temperaturas mínimas entre 35-37°C, para conseguir mantener la humedad suficiente y así evitar que el medio se deseque (Cerra et al., 2013).

### 2.3.2.7. Luz ambiental

“Gran cantidad de microorganismos, no se desarrollan bien a la presencia de luz solar sino mucho mejor en la oscuridad. Con la excepción para el caso de los microorganismos fotosintéticos” (Cerra et al., 2013).

### 2.3.2.8. Esterilidad del medio

Para un crecimiento normal de los microorganismos, deben estar perfectamente estériles todos los medios de cultivo para lograr evitar la creación de otras células que puedan alterar, enmascarar las células inoculadas en los medios de cultivo. Un método clásico para esterilizar medios de cultivo, es el autoclave que consumen vapor de agua a presión que actúa como agente esterilizante o también se puede emplear esterilización en seco a temperaturas entre 160-170 °C (Cerra et al., 2013).

## 2.3.3. Conservación de medios de cultivo

Rojas A., (2011) recomienda que cuando se tiene medios de cultivo deshidratados, la mejor forma de conservar es en lugares secos y protegidos de la luz a una temperatura de 15 y 30 °C teniendo en cuenta que sus envases estén bien cerrados. Un medio de cultivo una vez preparado y esterilizado está listo para su uso; por ende deben ser consumidos en cortos tiempos alrededor de una semana y lo más recomendable es conservarlos a una temperatura baja máximo 4 °C. Los medios que contienen sustancias como tioglicolato, se mantienen mejor a temperatura ambiente dentro de un tiempo de 4 días máximo y en ausencia de luz.

Cuando se preparan medios de cultivo es muy eficiente hacer pruebas de esterilidad, esto se realiza tomando del lote varias muestras superior al 5 %, incubándose estas muestras a 37 °C/24h. Para saber si presentan desarrollo microbiano se debe realizar una observación con el fin de descartar la contaminación de lotes. Cuando tenemos medios deshidratados se puede conservar sus cualidades con la conservación adecuada durante el tiempo indicado por el fabricante que viene indicado en el membrete del recipiente (Rojas, 2011).

### 2.3.4. Aislamiento

#### 2.3.4.1. Aislamiento Primario

Detección y aislamiento de microorganismos potencialmente útiles; para llevar a cabo un aislamiento primario generalmente se parte de una población mixta donde existe una gran cantidad y variedad de microorganismos potencialmente útiles que debemos seleccionar. Para esto se utilizan los medios de cultivo selectivos en donde los parámetros principales son las fuentes de carbono, fuente de nitrógeno, aireación, temperatura, pH; también se les pueden añadir inhibidores que cumplen la función de eliminar los microorganismos que no interesa.

#### 2.3.4.2. Aislamiento secundario

Estudio de los microorganismos aislados en el aislamiento primario para separar los que tienen interés real de los que tienen interés potencial y conseguir mejores cepas seleccionadas.

### 2.4. INMOVILIZACIÓN

La inmovilización se basa en atrapar o contener células vivas dentro o en un material soporte estos pueden ser una red, membrana o malla que facilitan la difusividad de sustratos y productos permitiendo el crecimiento de las células y reteniéndolas activas. Con este sistema se consigue obtener altas densidades celulares y por efecto buena productividad volumétrica (cantidad de etanol producido por unidad de volumen de cultivo y por unidad de tiempo), disminuyendo los tiempos de residencia además, volúmenes de fermentación (Nedović, Manojlović, Branko, & Willaert, 2011). Los sistemas de inmovilización, están clasificados de acuerdo a la estrategia empleada para unir la célula al soporte y localización física de la misma (Nedović et al., 2011).

#### 2.4.2. Métodos básicos de inmovilización de células

##### 2.4.2.1. Inmovilización de células en un soporte sólido.

###### 2.4.2.1.1. Adsorción

“La adsorción es un método físico sin transformación química en donde las célula se une a un soporte sin funcionalidad de los puentes de hidrógeno, tampoco influyen las fuerzas de Van der Waals y las interacciones iónicas tan solo en el proceso se da una combinación de interacciones hidrofóbicas y salinas” (Arroyo, 1998). Este método es rápido de preparación sencilla, bajo costo, no cambia la especificidad de la célula, es de gran aplicabilidad ya que permite cargar una elevada cantidad de células y da una buena

estabilidad de la célula inmovilizada. La adsorción simplemente se logra mezclando e incubando algún tiempo los microorganismos con la matriz absorbente a determinados factores (Norton & D'Amore, 1994).

En la adsorción influyen los siguientes factores:

Tabla 8 Los principales factores que influyen en la adsorción.

El pH del medio	El diámetro de poro	La presencia de iones	La fuerza iónica
Regula la naturaleza y el número de cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.	Debe tener aproximadamente el doble del tamaño del eje mayor del microorganismo.	Actúan como cofactores del microorganismo, estos pueden aumentar la carga enzimática del derivado.	Si la fuerza iónica se aumenta produce desorción del microorganismo, debido a que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que a la proteína (Arroyo, 1998).

Fuente (Arroyo, 1998).

#### 2.4.2.1.2. Unión covalente

Esta es una técnica muy utilizada aunque es una muy cara, estos métodos son empleados específicamente cuando se requiere que no existan microorganismos en el producto. La ventaja estriba en que el enlace entre el material soporte y el microorganismo es fuerte y estable por consiguiente no existe probabilidad de darse una desorción de las células a la solución. Para lograr niveles altos de enlace la unión se debe dar entre los grupos funcionales que se encuentran en la superficie de la matriz o soporte y los grupos funcionales que son parte de los residuos de aminoácidos del microorganismo (Hendrik, Heering, Wiertz, & Cees, 2004).

Los grupos funcionales con los que se enlaza la célula a un soporte previamente activado son grupos amino, Cis-tiol, Tir-hidroxil o His-imidazol o generalmente grupos de funcionalidad orgánica (Tiolautoensambladas, Monocapas, CNBr-SepHarosa, etc.). Normalmente los enlaces covalentes utilizan las cadenas laterales de diversos restos de aminoácidos ya que abundan en la superficie externa de las proteínas. Las desventajas en este método radican en el sitio del enlace, debido a que puede cambiarse el sitio activo,

ocurrir obstáculos o impedimentos estéricos que reduce la actividad. (R. Fajardo, Osuna, Villa, Escalante, & Ibarra, 2011)

#### 2.4.2.1.3. Enlace iónico

Esta inmovilización se basa en la unión iónica de las moléculas del microorganismo a soportes sólidos que poseen restos cambiadores de iones. La principal diferencia entre este método y la adsorción física es que la fuerza de unión entre el microorganismo y el soporte es mucho más alto, y el método de enlace iónico es menor que en el enlace covalente (B. Dolores & Manuel, 2015). La preparación de células inmovilizadas por enlaces iónicos es la misma que para la adsorción física solo que en este método en algunos casos se puede producirse liberación de la célula cuando se utilizan concentraciones elevadas de sustrato o cuando se producen variaciones en el pH (M. Dolores et al., 2005).

#### 2.4.2.2. Atrapamiento en una matriz porosa

“El método de atrapamiento se basa en la inclusión de las células dentro de una red polimérica que facilita al sustrato y a los productos pasar a través de ellos y retener las células. Este sistema es muy diferente al método de acoplamiento covalente descritos anteriormente porque las células no están enlazadas a la matriz o soporte. Los métodos de atrapamiento de células son diversos tales como el gel, atrapamiento por fibras, microencapsulado o por inclusión” (Bernfeld & Wan, 1963).

El método comúnmente usado es la retención de las células en geles o fibras es particularmente útil en procesos que aplican sustrato y productos pequeños, dado a la dificultad que tienen las moléculas de masa molecular elevada para difundir por el gel y alcanzar los sitios catalíticos de las células atrapadas (M. Dolores et al., 2005).

#### 2.4.2.3. Floculación celular (enlaces cruzados)

Este es el método en que los soportes no se requieren ya que la inmovilización se produce entre células mediante un enlace directo mediado por un elemento de unión. Generalmente se realiza la agregación de células para formar grandes cantidades seguido de un agente de peso molecular bajo por ejemplo glutaraldehido, este compuesto une covalentemente los grupos funcionales de las células para crear los agregados (Kourkoutas, Bekatorou, Banat, Marchant, & Koutinas, 2004). La ventaja de este método

es la fácil aplicabilidad pero su desventaja se manifiesta en las modificaciones de pH y temperatura en las condiciones de operación.

#### **2.4.2.4. Células contenidas detrás de una barrera**

“Este método se puede llevar a cabo de tres formas distintas, mediante el uso de un filtro de membrana micro porosa esto se basa en el confinamiento de la célula en un lado de la membrana mientras que el sustrato y el producto formado están presentes en el otro lado. Este confinamiento, puede lograrse con distintos tipos de membranas comerciales que presenta una elevada relación superficie/volumen; también mediante el atrapamiento de células en micro cápsulas o por la inmovilización celular en una superficie de interacción entre dos líquidos inmiscibles” (Kourkoutas et al., 2004).

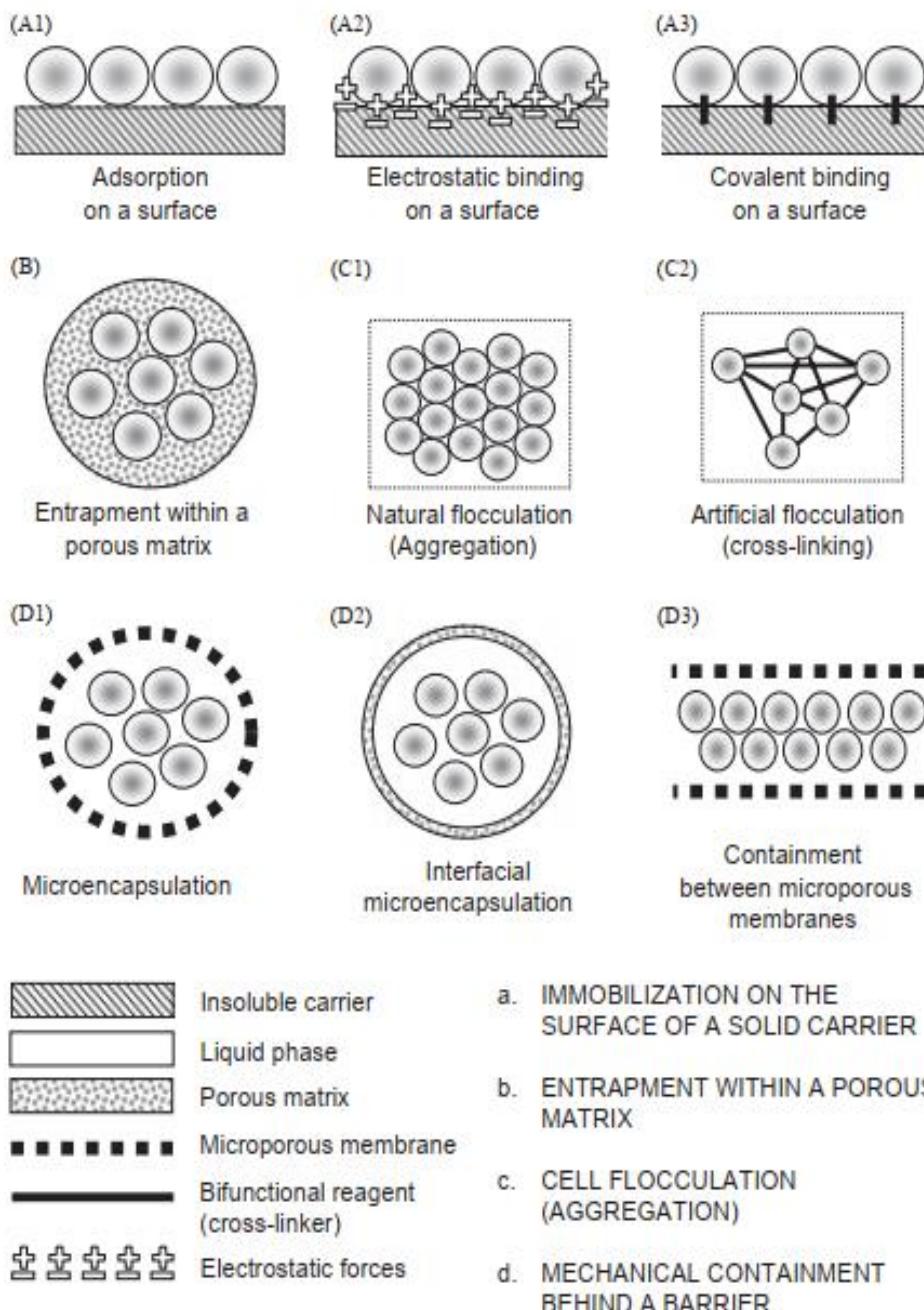


Ilustración 5. Métodos básicos inmovilización de células.

A) Inmovilización en la superficie de un vehículo sólido. A1: Adsorción en la superficie. A2: Unión por las fuerzas electrostáticas. A3: Unión por enlaces covalentes. B) Atrapamiento dentro de una matriz porosa. C) Floculación celular (agregación). C1: Floculación natural. C2: Floculación artificial de células. D) Contención mecánica detrás y barrera. D1: Microencapsulación. D2: Microencapsulación interfacial. D3: Contenidas entre membranas microporosas. (Kourkoutas et al., 2004)

#### 2.4.3. Materiales de inmovilización

Para realizar inmovilización de células existen diferentes tipos de materiales dependiendo el método que se va a emplear, entre los más específicos están:

Tabla 9 Soportes sólidos para adsorción.

PARA MÉTODOS DE UNIÓN (COVALENTES, ADSORCIÓN FÍSICA O UNIONES BIOESPECÍFICAS)	
<b>polisacáridos insolubles en agua</b>	celulosa, dextrano y derivados de la agarosa), , proteínas (gelatina y albúmina)
<b>polímeros sintéticos</b>	derivados del poliestireno, resinas de intercambio iónico y poliuretano
<b>materiales inorgánicos</b>	arcilla, cristal, arena, cerámica y magnetita (minerales del grupo de los silicatos)
<b>Materiales ligno celulósicos</b>	Madera, sorgo dulce, virutas, cáscara de arroz, cáscara de cacao

Fuente (M. Dolores et al., 2005)

Tabla 10 Soportes para métodos de atrapamiento

ATRAPAMIENTO EN UNA MATRIZ POROSA	
<b>Gel de Poliacrilamida</b>	
<b>Carragenato de Potasio o Calcio)</b>	
<b>Gel de Alginato (de potasio o Calcio)</b>	
<b>Resinas sintéticas, Quitosano</b>	
<b>Matrices poliméricas de Colágeno, alcohol Polivinílico.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Atrapan células un enrejado producido por una matriz porosa o se realiza encapsulación en micro cápsulas, liposomas del cultivo de células.</li><li>- No libera células de levadura al medio</li></ul>
<b>Más usados en fermentación de vinos</b>	
(Bernfeld & Wan, 1963)	

Tabla 11 Materiales de floculación.

FLOCULACIÓN DE CÉLULAS (enlaces cruzados)
---

<b>Glutaraldehido</b>	Entrecruza grupos amino mediante uniones base de Schiff.
<b>Disocianato de tolueno</b>	El entrecruzamiento da lugar a redes insolubles en agua.
<b>Diisocianato de hexametileno</b>	

(Kourkoutas et al., 2004)

Tabla 12 Material de membrana.

PARA CÉLULAS CONTENIDAS DETRÁS DE UNA BARRERA	
<b>Filtro de membranas microporosas</b>	Método de micro encapsulación de “ <i>Millispark</i> ”

(Kourkoutas et al., 2004)

#### 2.4.4. Aplicaciones de la inmovilización

La fijación de células se ha venido investigando desde los años 60 y luego, aplicando industrialmente por lo que esto ha tenido una continuidad mayor; estas aplicaciones han tenido éxito en producción de vinagre, productos orgánicos, aminoácidos, en el tratamiento de aguas residuales, medicina, además en la industria cervecera y del vino.

- Las aplicaciones de inmovilización en la industria cervecera se alcanzaron a escala piloto a mitad de los 70s, siendo el primer reporte en una planta piloto implementando el uso de cultivo de levaduras inmovilizadas en PVC (Polivinilclorato) durante la fermentación para dar efectos en las notas de sabores de la cerveza (Norton & D'Amore, 1994).
- La técnica de las células inmovilizadas ha sido empleada en la etapa de maduración, este es el caso de la cervecería Sinebrychoff la cual encapsuló *S. cerevisiae* en DECAE (Dietilaminoetilcelulosa) y celulosa para hacer madurar la cerveza dentro de un sistema continuo (Brányik, Vicente, Dostálek, & Teixeira, 2005; Nervi Faggiani, 2017).

La ventaja notable de estas técnicas de inmovilización es:

El material soporte protege la levadura de la acción de algunos inhibidores como los metales pesados, ácidos, fenoles y temperaturas extremas. También, estos soportes sólidos son sencillos de utilizar dan la facilidad de tener un mejor control de la actividad catalítica (Galazzo & Bailey, 1990).

- La incursión de los métodos de inmovilización en el área de vinos espumosos ha sido especial y de mucho interés. La producción de vinos espumosos es posible

con el combinado de esta tecnología con reactores de alta presión y reactores de flujo continuo los mismos que contienen composiciones y propiedades sensoriales parecidas a los que se fabrican tradicionalmente (Yokotsuka, Yajima, & Matsudo, 1997). El uso de membranas se ha usado en el campo de los vinos espumosos acoplando al tapón de la botella en donde permiten el contacto entre las levaduras y el vino durante su añejamiento (Moreno, Martínez, Mauricio, & Moreno, 2018).

- Otro proceso en el que las células inmovilizadas son de interés y exhibe gran potencial, es en la fermentación maloláctica. La transformación de ácido malo láctico en ácido láctico y anhídrido carbónico reduce la acidez y mejora la calidad de los mostos por lo tanto este proceso es especial en la producción de muchos vinos (R. Fajardo et al., 2011).

La aplicación de la tecnología que involucra inmovilización ha sido y tiene gran utilidad en la producción del vino. Pero no obstante, es de esperar que con un mejor entendimiento sobre la fisiología de los microorganismos inmóviles, existe la posibilidad de implementar esta tecnología a muchos procesos (R. Fajardo et al., 2011).

- La fermentación del etanol se busca mejorar con una tecnología de células inmovilizadas que se ha sugerido como un medio eficaz para la fermentación. La inmovilización de las células conduce a mayores densidades celulares con los consiguientes aumentos en las tasas de reacción y la productividad de bioetanol (Yu et al., 2007).
- También es importante en aplicaciones analíticas en donde es posible diseñar y construir biosensores específicos de interactuar con la capacidad con cualquier tipo de compuesto en un sistema biológico. Generalmente, un biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada esto puede ser células, anticuerpos o células próximas a un traductor (Griffiths & Hall, 1993). De acuerdo a la gran utilidad los biosensores son de buen interés ya que con estos se puede detectar patógenos, virus, fármacos, células, contaminación microbiana además cuantificación de azúcar presente en bebidas (Arroyo, 1998).

- En aplicaciones médicas se tiene la posibilidad de utilizar células inmovilizadas para el tratamiento de “leucemias y canceres diseminados por ejemplo la enzima L-asparaginasa” (Callegaro & Denti, 1983).
- La utilización de células inmovilizadas en farmacéutica es una alternativa efectiva en la síntesis bioquímica; específicamente en fases importantes en el cual no se debe trabajar a temperaturas elevadas o quizás se requiera una elevada especificidad de sustrato para la creación de productos de gran pureza óptica (Arroyo, 1998).

## 2.5. BIOETANOL

### 2.5.2. Definición

Se define al bioetanol como un biocombustible el cual se consigue al fermentar medios azucarados hasta alcanzar un grado alcohólico, entre el 10%-15%, al que luego se concentra por destilación para obtener el denominado "alcohol hidratado" (4-5% de agua). Y por último pasa por un proceso específico de deshidratación hasta alcanzar el alcohol absoluto (99,4% min de riqueza). La última calidad obtenida es el llamado bioetanol el cual es el necesario para utilizar en combinación con gasolina en todos los vehículos convencionales. (Núñez & Triñanes, 2010)

### 2.5.3. Fermentación alcohólica

La fermentación se define, como un proceso de biotransformación en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de microorganismos que poseen la capacidad de convertir los hidratos de carbono; los mismos que se desdoblan hasta producir productos como el alcohol etílico, dióxido de carbono y moléculas de ATP cuando las condiciones son anaeróbicas (AgroWaste, CSIC, & LIFE, 2012). Los azúcares para transformarse en etanol deben pasar por un cierto número de etapas y la reacción (Gay – Lussac) es la que se presenta a continuación. (Azcapotzalco & Dacosta, 2007)

*Reacción de fermentación de la Glucosa*



**Glucosa → Etanol + Gas Carbónico + Energía**

(Azcapotzalco & Dacosta, 2007)

“Principalmente las levaduras son las responsables de la transformación, estas son las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, usada frecuentemente. A nivel

estequiométrico pareciera una transformación simple para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono pero en realidad se da una serie de trasformaciones por lo que es un proceso bastante complejo” (Azcapotzalco & Dacosta, 2007).

En la siguiente ilustración se muestra un gráfico en donde se puede ver la reacción de la producción de etanol (fase anaerobia) (Zamora, Prado, Capataz, Barrera, & Peña, 2014).

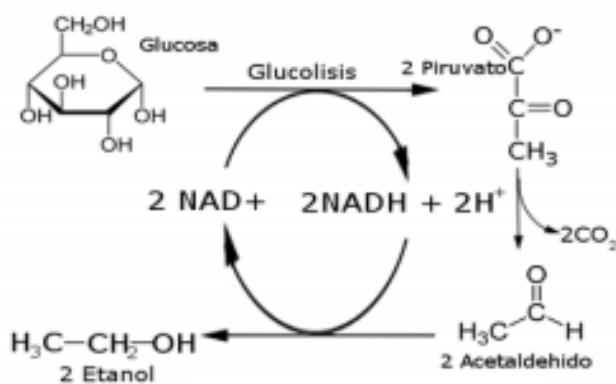


Ilustración 6 Proceso de conversión de glucosa a etanol.

(Zamora et al., 2014)

#### 2.5.4. Fermentación con células libres

“Tradicionalmente la fermentación alcohólica se realiza mediante el uso de células libres, método que se basa en inocular directamente la levadura con el mosto. Este método de fermentación presenta ciertos inconvenientes tales como riesgos de contaminación, pérdida de biomasa, dificultad de separación de las células al culminar el proceso, alto costo del reciclaje microbiano y una respuesta adversa por la variación ambiental” (Yu et al., 2007).

#### 2.5.5. Fermentación con células inmovilizadas

“Esta fermentación consiste en inocular en el mosto células vivas atrapadas dentro de un material soporte (de una red, malla o membrana), el mismo que permite la difusión de sustratos y los productos haciendo posible que las células se conserven activas. La técnica de inmovilización permite obtener altas densidades celulares y por ende altas productividades volumétricas. Es decir cantidad de etanol producido por unidad de volumen de cultivo y por unidad de tiempo disminuyendo



los volúmenes de fermentación necesarios y los tiempos de residencia” (Stajić et al., 2016; Nervi, 2018).

### 3. METODOLOGÍA

El presente proyecto es un estudio de carácter experimental-comparativo y se llevó a cabo con la finalidad de encontrar mayor producción de etanol. Principalmente se basa en la fermentación anaerobia discontinua, usando como sustrato mucílago de cacao CCN – 51; donde dicho sustrato se fermentó mediante un sistema de células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en cáscaras de cacao y mediante células libres. Este proceso experimental se realizó en un reactor de 2 litros de capacidad (Biotron GX Single Vessel tipo Batch); equipo que se encuentra en el laboratorio de Energía e Ingeniería de Reacción de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. El biorreactor puede trabajar a diferentes valores de temperatura, pH y velocidad de agitación; pero para este estudio se trabajó en los respectivos experimentos bajo las mismas condiciones de operación (pH, temperatura) de acuerdo a la tabla 14. Para conocer cuánto mejora la producción de bioetanol con el sistema de células inmovilizadas, se toma como base de comparación la cantidad de etanol que se genera bajo el sistema de células libres. El proceso experimental de este proyecto de titulación se llevó a cabo bajo los protocolos de esterilidad, higiene y bioseguridad que ameritan las circunstancias del COVID 19.

#### 3.1. Materia prima

##### 3.1.1. Mucílago de cacao

El mucílago de cacao, con el cual se hicieron los experimentos fue obtenido en el centro de acopio de cacao del centro del cantón la Troncal zona 6 del Ecuador; la variedad o tipo de cacao que se produce en esta zona es una especie clonada de origen ecuatoriano al cual se le conoce como “CCN-51”. El producto de esta zona es tolerante a las enfermedades (escoba de bruja), posee alta productividad y se encuentra ya caracterizado por proyectos realizados anteriormente, uno de ellos es el realizado por Quizhpi X., 2016. Caracterización del mucílago de cacao CCN – 51 mediante espectrofotometría UV-visible y absorción atómica.

##### 3.1.2. Levadura

En este proyecto se utilizó levadura *Saccharomyces Cereviciae* “Safale US-05” en estado liofilizado; este es un producto biológico y orgánico se puede encontrar fresca y a granel, esta última es la utilizada en este estudio; el mismo se prepara y se mantiene en un medio MY enriquecido para el desarrollo de los experimentos. Este es un cultivo que se le denomina cultivo madre el cual está preparado con 7 g de levadura liofilizada / L de cultivo e incubado a 30 °C durante 24 horas, después almacenado en refrigeración a 4 °C con un tiempo de vida útil de 30 días.

### 3.1.3. Cáscara de cacao

En este proyecto se requiere limitar la movilidad celular mediante el aislamiento dentro de un vehículo adaptable al medio de fermentación. La cáscara de cacao es un material ligno celulósico y se usa en este proyecto como vehículo de inmovilización de células de *Saccharomyces Cereviciae* por ser un material poroso, resistente, de bajo costo, de alta producción y de fácil obtención. Los experimentos se hicieron con la cáscara del mismo tipo de cacao del cual se obtuvo el mucílago, este es la variedad de cacao “CCN-51”; producto que se produce en el cantón la Troncal zona 6 del Ecuador.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Método de preparación de los soportes de inmovilización (cáscara de cacao)

Tabla 13 Equipo para preparar los soportes de inmovilización

Equipos
Secador GANDER MTN

Elaborado por Autor

#### 3.2.1.1. Procedimiento

Tomar la mazorca de cacao madura y se procede a realizar un lavado. Luego cortarla y retirar el fruto de la mazorca. Almacenar en sacos limpios, sellar y transportar. En un laboratorio cortar en láminas largas, quitar la corteza exterior (capa roja). Despues llevar al secador Gander MTN y secar a 60 °C. Por ultimo almacenar en fundas ziploc.

### 3.2.2. Método de inmovilización

#### 3.2.2.1. FUNDAMENTO

El método de inmovilización que se aplica en este proyecto se basa en la adsorción, método físico sin transformación química, las célula se une a un soporte sin funcionalidad, tan solo en el proceso se da una combinación de interacciones hidrofóbicas y salinas. Este método es rápido simple y de gran aplicabilidad que permite cargar una elevada cantidad de células; la adsorción simplemente se logra mezclando e incubando algún tiempo los microorganismos con la matriz absorbente a determinados factores (pH, temperatura). (Norton & D'Amore, 1994)

### 3.2.2.2. Procedimiento para la inmovilización

#### 3.2.2.2.1. Preparación de un banco de trabajo de levaduras “*S. cereviciae* “a partir de un cultivo liofilizado

Esparrcir en esterilidad la levadura seca en un volumen de medio YPD en (g/L); glucosa (20); extracto de levadura (3); polipeptona (5); extracto de malta (3); agar (20). El medio YPD se mantiene en 30 °C durante 24 h y después se almacena a 4 °C. Verificar viabilidad del medio en el microscopio mediante tinción con azul de metileno.

#### 3.2.2.2.2. Preparación de un pre-cultivo de levadura

Del cultivo YPD se toma un inoculo del 10 % (v/v). Luego añadir en un medio que contiene en (g/L): glucosa (15); sacarosa (15); extracto de levadura (3); poli peptona (5); extracto de malta (3). Cultivar las células en un agitador de ambiente controlado a 28 °C durante 20 h con la finalidad de obtener una alta densidad celular, Luego las células se centrifugan y se re-suspenden de forma aséptica en un medio de pre-cultivo nuevo para ser utilizado como inóculo.

#### 3.2.2.2.3. Preparación de medios de cultivo enriquecidos

Preparar dos medios enriquecidos de diferente composición:

- Medio (A) con composición (g/L): glucosa (70); sacarosa (80); polipeptona (50); MgSO<sub>4</sub> (10); de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5)
- Medio (B) con composición (g/L): glucosa (100); sacarosa (100); polipeptona (80); MgSO<sub>4</sub> (12); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.6)

Los medios se deben ajustar a pH 5,5 y luego tratar en autoclave a 116 °C durante 20 min antes de su uso.

#### 3.2.2.2.4. Inmovilización

Procedimiento de inmovilización:

Agregar 50 g de soportes (piezas de cáscara de cacao) preparadas anteriormente de acuerdo a la figura 18 en un reactor habiendo sido esterilizado por 20 min. Luego se mezcla con 100 ml de pre-cultivo fresco medio (el cual la concentración celular es 6 x

$10^8$  cel. /ml en matraz). Veinticuatro horas después, se combina con 100 ml de medio (A) y se realiza una agitación suave a temperatura ambiente. Veinticuatro horas después se reemplaza por un nuevo lote de 100 ml de medio (B), Tomar muestras y determinar el número de células usando una cámara neubauer. Por ultimo almacenar los soportes a 4 °C hasta su uso.

### 3.2.3. Método de fermentación para sistema de células libres e inmovilizadas

Este proceso se lleva a cabo en un reactor discontinuo tipo Batch dentro de un sistema cerrado; este tipo de sistemas es muy utilizado en el sector de la industria. Para dar inicio a la fermentación se necesita inocular microorganismos en el medio que contiene los nutrientes, bajo el sistema de células inmovilizadas inoculamos con soportes de cáscara de cacao que contienen los microorganismos inmovilizados en su interior y bajo el sistema de células libres inoculamos levadura libre (pesar una cierta cantidad de levadura comercial fresca 3[g/L] y se inocula directamente). Además se establecen condiciones óptimas de operación de acuerdo a la tabla 14 que deben mantenerse a lo largo de la fermentación,

Tabla 14 Condiciones óptimas de operación durante la fermentación.

pH	4.0
Temperatura	35 °C
DO	0

El pH del proceso debe ser controlado con ácido clorhídrico 1N o base (NaOH 1N) según se el requerimiento. Y por último el progreso de la fermentación se controla con la medida de la concentración de sustrato el cual es un parámetro que indica el proceso del metabolismo celular y el mismo que marca el final de la fermentación.

#### 3.2.3.1. Proceso para fermentación discontinua

##### a) Preparación de la materia prima

La conservación de sus características es muy importante para esto la materia prima se almacenó a temperatura de congelación. El mosto con el cual se trabaja en este proyecto es el mucílago de cacao CCN-51.

La botella que contiene la muestra se retira del equipo de congelación previamente antes de realizar el experimento y se descongela. De inmediato medir los °Brix, se trabaja entre

15-17 °Brix (concentración natural del mucílago de cacao). Ajustar la temperatura a la que se va a trabajar (35°C) usando una cocineta y un recipiente de acero inoxidable. Luego medir 2L de mucílago de cacao y adicionar en el reactor previamente esterilizado.

#### **b) Acondicionamiento del reactor**

Realizar el ensamble del reactor Batch, este consta de varios accesorios como tanque de fermentación al cual se ancla el motor que da movimiento a las aspas del reactor y a este se conectan unan serie mangueras también, sensores de pH, temperatura y DO. Establecer parámetros de operación en el tablero del reactor pH (4), temperatura (35), DO (0), velocidad de agitación para células inmovilizadas 100 rpm y para células libres 150 rpm.

#### **c) Inoculación de las células inmovilizadas o células libres**

Introducir los soportes con las células inmovilizadas y accionar el flujo de nitrógeno.

#### **d) Toma de muestras**

La toma de muestras se realiza una vez realizado la inoculación ( $t_{(0)}$ ) luego cada cierto tiempo (6 h). En cada toma de muestra se mide el pH y °Brix (este valor nos ayuda a controlar el desarrollo de la fermentación); luego se realiza una centrifugación se toma el sobrenadante y conserva en una atmósfera de nitrógeno líquido. Este proceso se lleva a cabo hasta que los °Brix permanezcan constantes es decir no haya cambio en la toma de 2 o 3 muestras; esto se da cuando los °Brix se encuentran entre 6-7. Este valor nos indica que hay insuficiencia de nutrientes y por lo tanto la fermentación ha llegado a su fin en el reactor.

#### **3.2.4. Método para la determinación de contenido de etanol (micro difusión de Conway) para el sistema de células libres e inmovilizadas.**

Un método usado para determinar la concentración de etanol que se produce en el proceso fermentativo, se basa en la técnica y fundamento de micro difusión de Conway. Para el desarrollo de este proceso se usan cajas bipetri en lugar de celdas de Conway; con este proceso se determinará la concentración de etanol que se produce con células inmovilizadas y con células libres en función del tiempo.

*Tabla 15 Equipos y reactivos para cuantificación de etanol por el método de micro difusión de Conway.*

Reactivos	Equipos
-----------	---------

- |  |                          |
|--|--------------------------|
| ▪ Dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$ (0,4N) en Ácido  | ▪ Centrifuga 80-3        |
| Sulfúrico $H_2SO_4$ (10N)                            | ▪ Balanza BOECO [BWL 61] |
| ▪ Carbonato de Potasio $K_2CO_3$ o $Na_2CO_3$ al 20% | ▪ Secador                |
| ▪ Tiosulfato de Sodio $Na_2S_2O_3$ (0.1N)            | GANDER MTN               |
| ▪ Yoduro de Potasio KI (3N)                          |                          |
| ▪ Solución de Almidón                                |                          |

Adaptado de (Tapia, 2019)

#### 3.2.4.1. Fundamento

El método de micro difusión de Conway sirve para determinar sustancias susceptibles de volatilización esto es compuestos como el etanol en muestras biológicas y otros alcoholes, además análisis de diferentes sustancias entre estas están análisis de amoniaco, urea, nitrógeno no proteico, ácido láctico entre otros (Fernandez J., 1950).

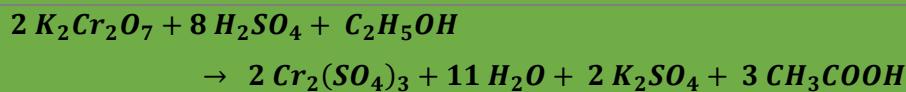
“La micro difusión se realiza en una cámara de Conway, la cual posee dos compartimientos, en el primero se coloca la muestra a analizar y el agente liberador carbonato de potasio  $K_2CO_3$  y en el otro compartimiento se coloca el agente atrapante una disolución sulfúrica de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ). En este caso, el etanol presente en la muestra, es liberado y difunde en el seno de la celda de Conway, donde se produce la captación y la reacción de óxido reducción entre el etanol y el dicromato, forzándose completamente la remoción del primer compuesto al cabo de una hora” (Criminalistica, 2008).

La disolución sulfúrica de dicromato de potasio será el encargado de convertir en ácido acético desde el alcohol de manera continua. Cuando la reacción reduce el dicromato a óxido III en el compartimiento de la segunda cámara, conduce a un fenómeno físico-químico. Al momento que la reacción está equilibrada se observa la desaparición del color amarillo formándose un color azul. Dicho fenómeno nos indica la presencia del etanol en la muestra, para confirmar el resultado se utiliza una técnica instrumental de Cromatografía de Gases o también se puede recurrir a otras técnicas esto es; el dicromato de potasio que no reaccionó deber ser determinado por

espectrofotometría o por titulación con tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ ) y usando almidón como indicador en la reacción. (Criminalistica, 2008; Hernandez, Yepez, Cevallos, & Fernando, 2018)

El exceso de ( $K_2Cr_2O_7$ ) que queda en el medio sin reaccionar se mide con yoduro de potasio, de acuerdo a la siguiente reacción (Hernández et al., 2018).

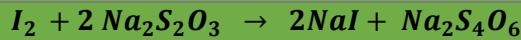
*Ecuación 1 Reacción del dicromato en medio ácido y el etanol*



*Ecuación 2 Reacción entre el dicromato de potasio sobrante y el yoduro de potasio*



*Ecuación 3 Reacción de cuantificación del yodo molecular mediante tiosulfato de sodio*



Fuente (Hernández et al., 2018)

### 3.2.4.2. Procedimiento del método de micro difusión de Conway

Comúnmente el contenido de etanol en una muestra es alto, entonces para aplicar este método debemos realizar diluciones en el cual la concentración de etanol se encuentre entre 20 y 225 mg /l el mismo que nos permitirá tener una correcta determinación. Con diluciones de 2:100 se puede conseguir resultados confiables. Para empezar debemos tomar una muestra de 7ml del sustrato que se encuentra fermentando en tubos vacutainer de plástico, luego esta muestra se debe centrifugar a 4000rpm durante 10 min. Una vez terminada la centrifugación se tomará el líquido sobrenadante que servirá para hacer la dilución respectiva. Luego de la dilución se debe seguir el método de micro difusión de Conway con el proceso descrito a continuación por (Middleton, 2019):

Añadir 2ml de la muestra diluida previamente en el compartimiento A de la caja bipetri. A continuación medir 2ml de carbonato de potasio y añadir en el compartimiento A de la caja bipetri, con agitación moderada y mezclar las sustancias. Luego medir 1ml de dicromato de potasio 0.4N preparado en ácido sulfúrico y agregarlo en el compartimiento B de la caja bipetri. Ahora se cierra la caja bipetri herméticamente, para esto se utiliza

cinta aislante, luego ingresar las cajas bipetri en el secador a una temperatura de 50°C o 125°F durante un tiempo de 2 horas.

Transcurrido este tiempo se quita el cierre hermético de las cajas bipetri, se añade 1ml de yoduro de potasio 3N y luego 3 gotas de indicador de almidón en la cámara B de la caja bipetri. Mezclar suavemente los reactivos en la cámara B de la caja bipetri, valorar la solución con Tiosulfato de Sodio 0,1N manteniendo agitación constante hasta que se dé el viraje a color azul. Por ultimo registrar el volumen de tiosulfato de sodio consumido y realizar el análisis de las muestras por triplicado para contrastar los resultados obtenidos.

Nota: *Después de haber pasado 2 horas en el desecador, si el color de la cámara B de la caja bipetri es azul se debe descartar dicha muestra y luego tomar otra muestra y realizar una dilución más. Si el reactivo presenta un color verde, verde amarillento u ocre se procede a titular la muestra.*

### 3.2.4.3. Determinación de la concentración de etanol para el sistema de células libres e inmovilizadas

La ecuación que se presenta a continuación nos permite calcular la concentración de etanol en la muestra problema teniendo en cuenta las diluciones que se realizó previamente.

*Ecuación 4 Ecuación para cálculo de la concentración de etanol.*

$$\text{Etanol } \left( \frac{g}{l} \right) = \frac{N * (V_b - V_m)}{V_M} * 11,51$$

**(Hernandez et al., 2018)**

De donde:

N: Normalidad del tiosulfato de sodio

V<sub>b</sub>: Volumen de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> consumido en la titulación del blanco (ml)

V<sub>m</sub>: Volumen de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> consumido en la titulación de la muestra problema (ml)

V<sub>M</sub>: Volumen de muestra utilizada en la experimentación (2ml)

11,51: Se basa en la reacción Redox, el valor viene del resultado de dividir el peso molecular de etanol para 4.

Nota: *Tomar en cuenta a la hora de realizar los cálculos, el valor que se obtenga se deberá multiplicar de acuerdo a las diluciones que se haya realizado.*

### 3.2.5. Análisis por microscopía electrónica de barrido

#### 3.2.5.1. Fundamento

“El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la visualización y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, y entrega información morfológica del material analizado” (González, 2009; Meré, 2017).

“Se basa fundamentalmente en hacer interaccionar un haz primario de electrones sobre un área del objeto que se desea estudiar. El haz debe ser intenso muy fino y estable porque ejerce la función de explorar la superficie de una muestra en análisis, para luego dar diversas señales que son captados por diferentes detectores de señales en donde estos muestran la información micro analítica y morfológica estructural; dicha información está de acuerdo con el tipo de detector que se haya utilizado” (Hernandez, 2005).

Para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido las muestras deben estar libres de humedad y también cubiertas por materiales conductores como el oro o el carbón. La gran versatilidad es una de las importantes características de la microscopía electrónica de barrido, se puede aplicar por ejemplo en el campo de la biotecnología, ciencias de materiales como en las ciencias biomédicas, bioingeniería entre otras. (Hernandez, 2005)

Tabla 16 Materiales y reactivos para preparación de las muestras para análisis MEB.

Materiales	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Vasos de vidrio</li><li>▪ Botellas o envases de plástico</li><li>▪ Fundas para empacado al vacío</li><li>▪ Recipientes desechables de aluminio</li><li>▪ Desecador</li><li>▪ Máquina empacadora al vacío</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Glutaraldehido 3.5%</li><li>▪ Etanol (50%, 70%, 90%, 95%, 100%)</li></ul>

Elaborado por autor

### **3.2.5.2. Proceso de preparación de muestras para análisis por microscopía electrónica de barrido**

La cáscara de cacao portador de las células inmovilizadas se estudian con un microscopio electrónico de barrido, para ello:

1. Las muestras se empapan en 3,5% de glutaraldehído durante 6 h.
2. Luego se deshidrata por tratamiento con etanol al 50, 70, 90, 95 y 100%, 6 [h] con cada uno.
3. Eliminar la humedad durante la noche reteniendo las muestras en un desecador.
4. Las muestras se empacan al vacío para su traslado al laboratorio de análisis.

### **3.2.6. Método de Liofilización para el sistema de células libres e inmovilizadas**

Es un proceso de secado a través de *sublimación*, que se ha creado con el fin de minimizar las pérdidas de los componentes volátiles o termoestables. Es un proceso noble de conservación de productos biológicos como células, levaduras, virus, alimentos entre otros. (Ramirez Navas J., 2006)

#### **3.2.6.1. Fundamento**

La liofilización se basa en el fenómeno físico de sublimación del agua o de mezclas acuoso-orgánicas en estado sólido (congeladas); el disolvente congelado pasa directamente a vapor sin pasar por el estado líquido (sublimación). Con esta técnica los productos no se ven alterados en sus propiedades y se logra la deshidratación. (Orrego Alzate E., 2008)

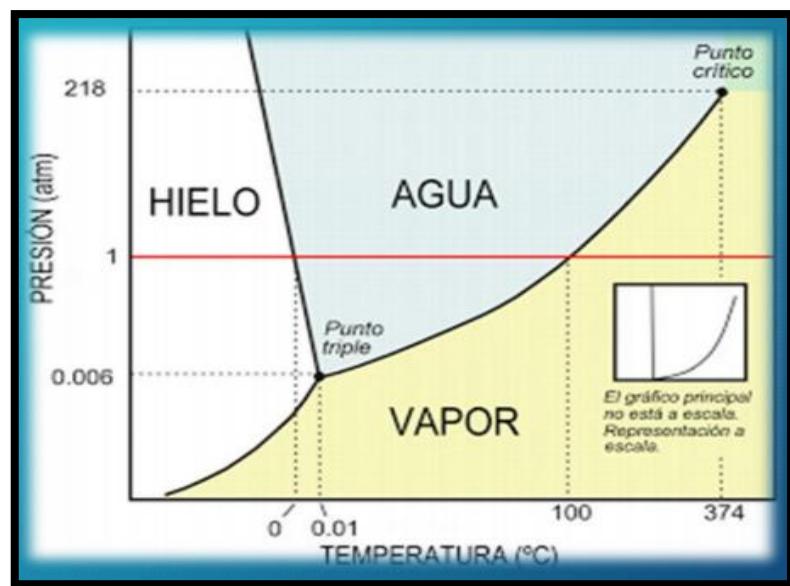


Ilustración 7 Diagrama de punto triple del agua.  
(Salinas M., 2012)

El diagrama nos indica la fase del agua en donde la sublimación del hielo puede ocurrir, solo si la temperatura y presión de vapor están debajo de 0,01°C y 0.006 atm, respectivamente.

### 3.2.6.2. Etapas del proceso de liofilización.

#### Secado primario

**Fase 1:** “Llamada etapa conductiva. Inicialmente, por el calentamiento de la muestra, la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta llegar a un máximo. El tiempo para agotar esta fase es relativamente corto, entre un 10 y 15% del tiempo total del proceso” (Nesmi, 2010; Orrego, 2008).

**Fase 2:** “Primera etapa difusiva. La velocidad de sublimación desciende en gran medida porque se crea una capa porosa de material seco que opone resistencia creciente al flujo de calor y al vapor. A medida que procede el secado en estas dos fases se lleva a cabo la eliminación de la mayor parte de agua del producto (entre un 75-90 %)” (Nesmi, 2010; Orrego, 2008).

#### Secado secundario

**Fase 3:** Segunda etapa difusiva. La velocidad de sublimación continúa descendiendo de forma que se aproxima a cero. Esto debido a que el calor que se requiere para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación. Es posible en esta etapa

aumentar la temperatura del producto y de la calefacción hasta valores del orden de 50°C, dependiendo del material que se trate (Nesmi, 2010; Orrego, 2008).

### 3.2.6.3. Procedimiento para la liofilización

El proceso a seguir es el descrito por (Isabel & López, 2019; Nesmi, 2010)

Tomar 5 ml de la muestra desde el reactor y colocar en tubos vacutainer plásticos de 10ml previamente lavados y secados, luego centrifugar la muestra a 400 rpm durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y almacenar en un tanque de nitrógeno líquido para su conservación. Despues de terminada la fermentación, descongelar las muestras y paralelamente pesar vasos metálicos limpios y secos. Luego vaciar la muestra en los recipientes desecharando toda la muestra en su totalidad y en caso de quedar residuos de muestra colocar agua destilada para su limpieza total. Ubicar los vasos metálicos en las bandejas del liofilizador, luego poner dichas bandejas dentro del liofilizador y ajustar los parámetros de operación; cuando el liofilizador se encuentre con una presión de vacío de 830 mbar y la temperatura de -40°C se abre la llave de vacío para que inicie el proceso de liofilización de las muestras. Terminado el proceso quitar las muestras del liofilizador, pesar y ejecutar los cálculos de biomasa obtenida mediante la ecuación descrita a continuación.

*Ecuación 5 expresión para el cálculo de la concentración de biomasa*

$$\text{Concentración de biomasa} = \frac{P_f - P_i}{V_m}$$

**Donde:**

**P<sub>i</sub>:** Peso de la muestra tomada al inicio de la fermentación (t<sub>0</sub>).

**P<sub>f</sub>:** Peso de la muestra tomada en cada intervalo de tiempo (t<sub>i</sub>).

### 3.2.7. Método fenol-ácido sulfúrico (método de dubois) para el sistema de células libres e inmovilizadas

#### 3.2.7.1. Fundamento

El ensayo colorimétrico más confiable y conocido para carbohidratos es posiblemente el ideado por Du Bois et al. (1956) utilizando fenol y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El método consiste en realizar una mezcla entre carbohidratos y fenol en agua y luego agregar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El calor de la reacción permite que se impulse la deshidratación y por consiguiente los derivados de furfural esto es; la adición de ácido sulfúrico causa una deshidratación de las pentosas a

furfural y las hexosas a hidroximetil furfural. Estos productos derivados de la catálisis ácida de los azúcares se condensan con fenoles para dar paso a la formación de complejos de color amarillo anaranjado. “La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes en la muestra, lo cual puede ser medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 492 nm”. (Le & Stuckey, 2016)

*Reacción del fenol, ácido sulfúrico concentrado y carbohidratos donde da lugar a un complejo amarillo-naranja*



Hexosas a → hidroximetil furfural

Pentosas a → furfural

### 3.2.7.2. Diluciones para cuantificación de azúcares

**Disolución patrón:** es un reactivo de concentración exacta y conocida, estas disoluciones ejercen una función importante en todos los métodos volumétricos, su preparación se puede hacer mediante métodos directos e indirectos. El método directo se basa en tener una cantidad exacta pesada de un soluto (*patrón primario*), que se disuelve en agua (solvente adecuado) luego se lleva a un volumen final conocido en un balón de aforo (Capelo & Perez, 2011).

El método indirecto no dispone de patrones primarios para esto se realiza una solución de concentración aproximada del valorante y después se determina su concentración por normalización. La *solución patrón* tiene que ser lo suficientemente estable para que solo se requiera determinar una vez la composición, debe reaccionar de inmediato con el analito y también reaccionar de manera selectiva con dicho analito para que describa una reacción balanceada. (Capelo & Perez, 2011)

#### Procedimiento de las diluciones

1. Extraer las muestras del tanque de nitrógeno y someter a descongelación.
2. Tomar 1ml de muestra y diluir tomando en cuenta la concentración de azúcar de la muestra.
3. Efectuar varias diluciones en función de la lectura que se vaya a realizar 1/25; 1/100; 1/500; 1/1000, 1/5000.

### 3.2.7.3. Curva de calibración

Para realizar la cuantificación de carbohidratos por el método de espectrofotometría hay que tener en cuenta que la concentración de las especies absorbentes es proporcional a la medida de absorbancia, entonces es necesario elaborar una curva patrón realizadas con glucosa como estándar (López-legarda, Taramuel-gallardo, & Arboleda, 2017). Donde:

*Ecuación 6 Ecuación lineal para la curva de calibración.*

$$A = Bx + C$$

A: absorbancia de las diluciones de la curva patrón.

B: pendiente a partir de la ecuación de la linealidad patrón.

X: concentración de carbohidratos.

C: intersección basada en la ecuación de linealidad de la curva patrón

(López-legarda et al., 2017)

### 3.2.7.4. Procedimiento para el método fenol-ácido sulfúrico

Para determinar el contenido de azúcares se debe seguir el proceso descrito por Isabel A. & Valdez E. (2019) que describe a continuación:

Colocar 5 ml de muestra en tubo vacutainer (no se requiere que estén sellados al vacío), después centrifugar la muestra de análisis a 4000 rpm durante 10 minutos. Luego el sobrenadante con la ayuda de una jeringa introducir a un tubo vacutainer sellado al vacío para conservar la muestra y guardar los tubos de muestras en un tanque de nitrógeno líquido. Después de terminado el proceso de fermentación se puede realizar la determinación de azúcares para esto descongelamos las muestras y se empieza por realizar las diluciones requeridas de las muestras para que puedan ser leídas por el espectrofotómetro UV-visible. Una vez hechas las diluciones añadir 2 ml de la solución de azúcares a cada tubo de ensayo, añadir 1 ml de fenol al 5% a la solución de azúcares, medir y adicionar 5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, mantener en reposo durante 10 minutos luego agitar moderadamente los tubos durante 30 segundos, para lo cual se presentará una reacción exotérmica con lo cual se debe tener precaución. Despues colocar los tubos de muestras durante 20 minutos en baño maría y por ultimo determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490nm. Cada ensayo se debe realizar por triplicado para verificar los resultados.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**4.1. Resultados de reproducción de células en medios de cultivo enriquecidos**  
Este proyecto de investigación está basado en la reproducción de células de levadura “*Saccharomyces cereviciae*” por medios de cultivo enriquecidos, para el cual se utilizó un cepa de levadura “*Safale us-05*” a una concentración de 7 [g/l] posteriormente para su reproducción se realizó un subcultivo y se incubó en condiciones adecuadas de temperatura 30 °C y agitación moderada por 18 h en los cuales sus componentes principales fueron: polipeptona, extracto de levadura, extracto de malta, glucosa y sacarosa. Para la cosecha de las células cultivadas se utilizó la centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos; y luego fueron resuspendidas en un fresco subcultivo para su utilización en el proceso de inmovilización. En este estudio realizado se identificó  $6,05 \times 10^8$  [cel./ml], en estudios realizados por (Yu et al., 2007) y (Ariyajaroenwong, Laopaiboon, & Salakkam, 2016) las cantidades identificadas son un poco menores,  $2 \times 10^8$  y  $5 \times 10^6$  [cel./ml] respectivamente.

**4.2. Análisis de los datos obtenidos por inmovilización de células de levadura en cáscara de cacao**

Los resultados que se obtuvieron por efecto de la inmovilización celular en la cáscara de cacao se presentan en la Tabla 17. Estos resultados se obtuvieron por conteo de células viables utilizando una cámara NEUBAUER (improved) el cual nos facilita la visualización de las levaduras con la ayuda de un microscopio, y por ende tener valores aproximados del número de células que se encuentran en las colonias de un medio de cultivo.

Tabla 17 Resultados del conteo de células presentes en el proceso de inmovilización.

Tiempo (h)	# células contadas	# células/ml
0	121	6,05E+08
6	106	5,30E+08
12	376	1,88E+09
16	119	5,95E+08
24	137	6,85E+08
26	82	4,10E+08
34	55	2,75E+08

40	46	2,30E+08
72	33	1,65E+08

Condiciones de Operación: temperatura ambiente, agitación moderada

Los resultados que presentan la tabla anterior, son basados en la técnica descrita por (Jordi S., 2017) donde menciona que el recuento se realiza dentro de una porción de 5 cuadros de la cámara Neubauer tomados de forma diagonal. Para el recuento de cada uno de los 5 cuadros seleccionados se utilizó el criterio superior-izquierda, según la ilustración 8 es

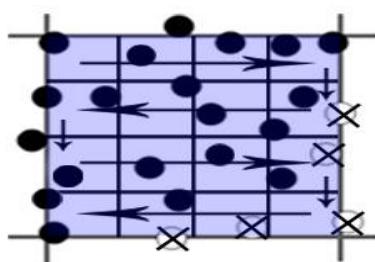


Ilustración 8 Técnica de conteo de células de levadura

decir se deben contabilizar todas las células que tocan las líneas izquierda y superior de un cuadro y no las que tocan las líneas inferior- derecha para evitar un doble conteo. Por ende para tener el número total de células se utilizó la ecuación 7 determinada por (Jordi S., 2017) donde el resultado que arroja esta ecuación se multiplicaría por el *factor de dilución*, ecuación 8.

Ecuación 7 Formula para conteo total de células de levadura en una cámara Neubauer

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} * \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{vol. de la cámara}} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} = \text{Millones de células/ml}$$

Ecuación 8 Formula para conocer el factor de dilución

$$F_d = \frac{(V_m + V_d)}{V_m}$$

$V_m$ : Volumen de la muestra

$V_d$ : Volumen del disolvente

El recuento se realizó durante 3 fases de inmovilización de las células en los soportes; fase 1 (adsorción), fase 2 (alimentación del sistema con un medio de cultivo enriquecido); fase 3 (realimentación con un medio de cultivo mucho más enriquecido) que consta de 24 horas cada una. La tendencia que sigue el proceso de adsorción se muestra en la ilustración 9 a continuación.

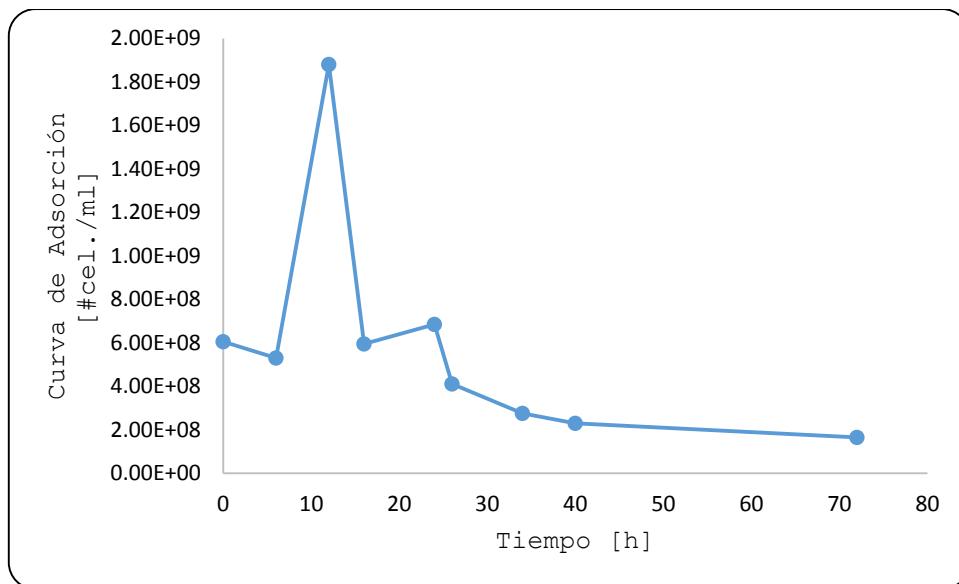


Ilustración 9 curva del proceso de inmovilización de células de levadura.

En esta ilustración se puede observar que al inicio se produce una pequeña adsorción y luego un crecimiento de células en el cultivo alcanzando  $1,88 \times 10^9$  [cel. /ml]. A partir de las 12 horas del proceso de inmovilización, la cantidad de levaduras disminuyen en el cultivo como se puede observar en la ilustración 9 mientras se van incorporando a través del tiempo en los poros del soporte (cáscara de cacao). La finalidad que tiene los medios de cultivo enriquecidos es robustecer, producir más células y además que sean predominantes con la capacidad de incrustarse en lo más profundo de los poros del soporte de inmovilización (Lopez & Torres, 2007). Durante el proceso de inmovilización de 72 horas se logra incorporar alrededor de  $1,7 \times 10^9$  células de levadura. De acuerdo a (PHukoetpHim, Salakkam, Laopaiboon, & Laopaiboon, 2017) describe en su estudio que se necesita tener una cantidad suficiente de células para tener una inmovilización fuerte, la misma que tiene como base una concentración de  $5 \times 10^8$  [cel./ml] en el cultivo. También (Yu et al., 2007; Ariyajaroenwong, Laopaiboon, & Salakkam, 2016) en sus artículos demuestran mediante modelos que es posible usar este sistema de inmovilización para lograr una mejor producción de bioetanol.

#### 4.3. Análisis obtenido por resultados de microscopía electrónica de barrido para verificación de inmovilización.

En la ilustración 10 se presentan micrografías de la cáscara de cacao con células inmovilizadas en sus poros en distintas densidades y tamaños de resolución que fueron realizadas en un microscopio electrónico de barrido de la Universidad politécnica del ejército-Quito.

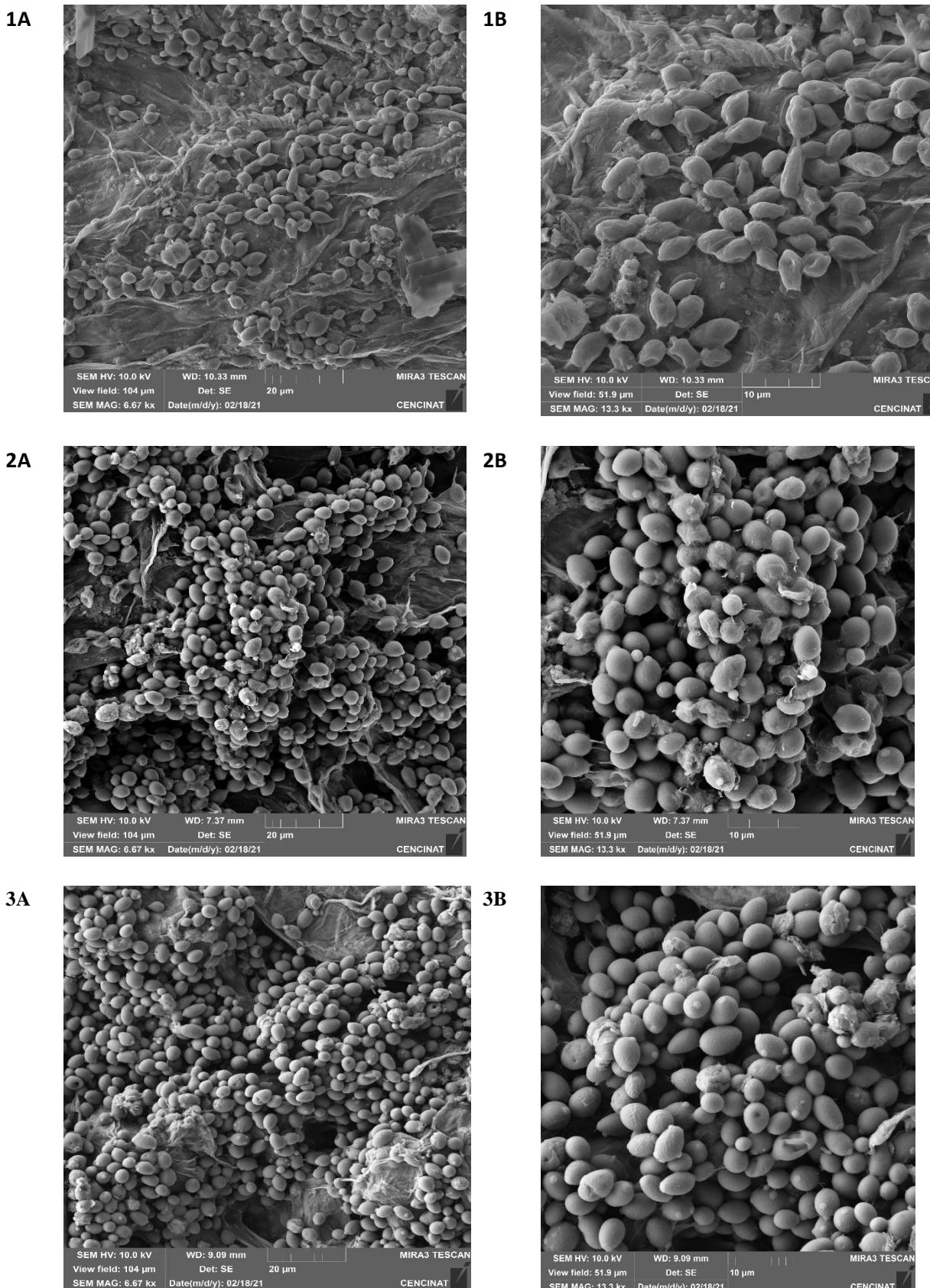


Ilustración 10 Microscopía electrónica de barrido de células inmovilizadas.

(1A) micrografía a 2000 aumentos de resolución- ensayo 1; (1B) micrografía a 4000 aumentos de resolución- ensayo 1; (2A) micrografía a 2000 aumentos de resolución-ensayo 3; (2B) micrografía a 4000 aumentos de

*resolución-ensayo 3; (3A) micrografía a 2000 aumentos de resolución- ensayo 4; (3B) micrografía a 4000 aumentos de resolución ensayo-4.*

Los análisis se desarrollaron en un microscopio electrónico de barrido tipo MIRA3- TESCAN bajo un detector de electrones secundarios en un sistema de vacío, potencia 10 kV en donde se obtuvieron varias microfotografías como se muestra en la ilustración 10 a ciertas magnificaciones cada muestra. Las magnificaciones se realizaron en dos campos de visión, para las micrografías de los literales A y B tenemos un campo de visión de: 104  $\mu\text{m}$  equivalentes a 2000 aumentos de resolución y un campo de visión de 51,9  $\mu\text{m}$  equivalentes a 4000 aumentos de resolución, respectivamente.

De las micrografías que se presentan en los literales 1A y 1B se observa la concentración aproximada de 1,28E+08 [cel./ml] en una distancia de trabajo en la muestra de 10,33 mm; en los literales 2A y 2B se observa la concentración de 6,30E+08 [cel./ml] en una distancia de trabajo de 7,37 mm y en los literales 3A y 3B se observa la concentración de 1,72E+09 [cel./ml] en una distancia de trabajo de 9,9 mm pudiéndose evidenciar que tenemos una alta densidad celular (fuerte inmovilización) en las micrografías 2 y 3; mientras que en la micrografía 1 tenemos baja densidad celular (débil inmovilización). De acuerdo a (Ariyajaroenwong et al., 2016) la inmovilización se produce debido a la fijación de las células en los tejidos de la superficie porosa del material.

#### 4.4. Análisis de los resultados obtenidos por fermentación con células inmovilizadas

En este proyecto se realizó fermentaciones de mucílago (cacao) con células inmovilizadas en cáscaras de cacao, en donde se buscó determinar y analizar la producción de etanol usando este tipo de material y materia prima. En la tabla 18 se muestra los resultados que se obtuvieron, en donde se puede evidenciar varias concentraciones de etanol cercanas entre sí; el primer experimento en su composición tiene menor concentración con respecto a los demás. En esto se puede evidenciar la calidad de la inmovilización el cual termina influenciando en la producción de etanol. El primer experimento al tener menor concentración nos indica que hubo inmovilización parcial pero a medida que se prosiguió con los experimentos tanto en el segundo, tercero y cuarto se logró mejorar la eficiencia de inmovilización y por ende mejorar la concentración de etanol. Según (Yu et al., 2007) mencionan que cuando la inmovilización es parcialmente fuerte, desde los soportes se generan efectos de desorción para lo cual la densidad celular disminuye y esto termina

influyendo en la productividad del etanol. En la siguiente ilustración se presenta el resultado del experimento con mejor producción de etanol 60 [g/l].

Tabla 18 Concentración de etanol generado en varios experimentos.

Concentración etanol [g/L]	
<b>Experimento 1</b>	50,8358333
<b>Experimento 2</b>	55,6316667
<b>Experimento 3</b>	56,5908333
<b>Experimento 4</b>	60,4275

Condiciones de operación: pH [4], T [35°C], agitación [100 rpm]

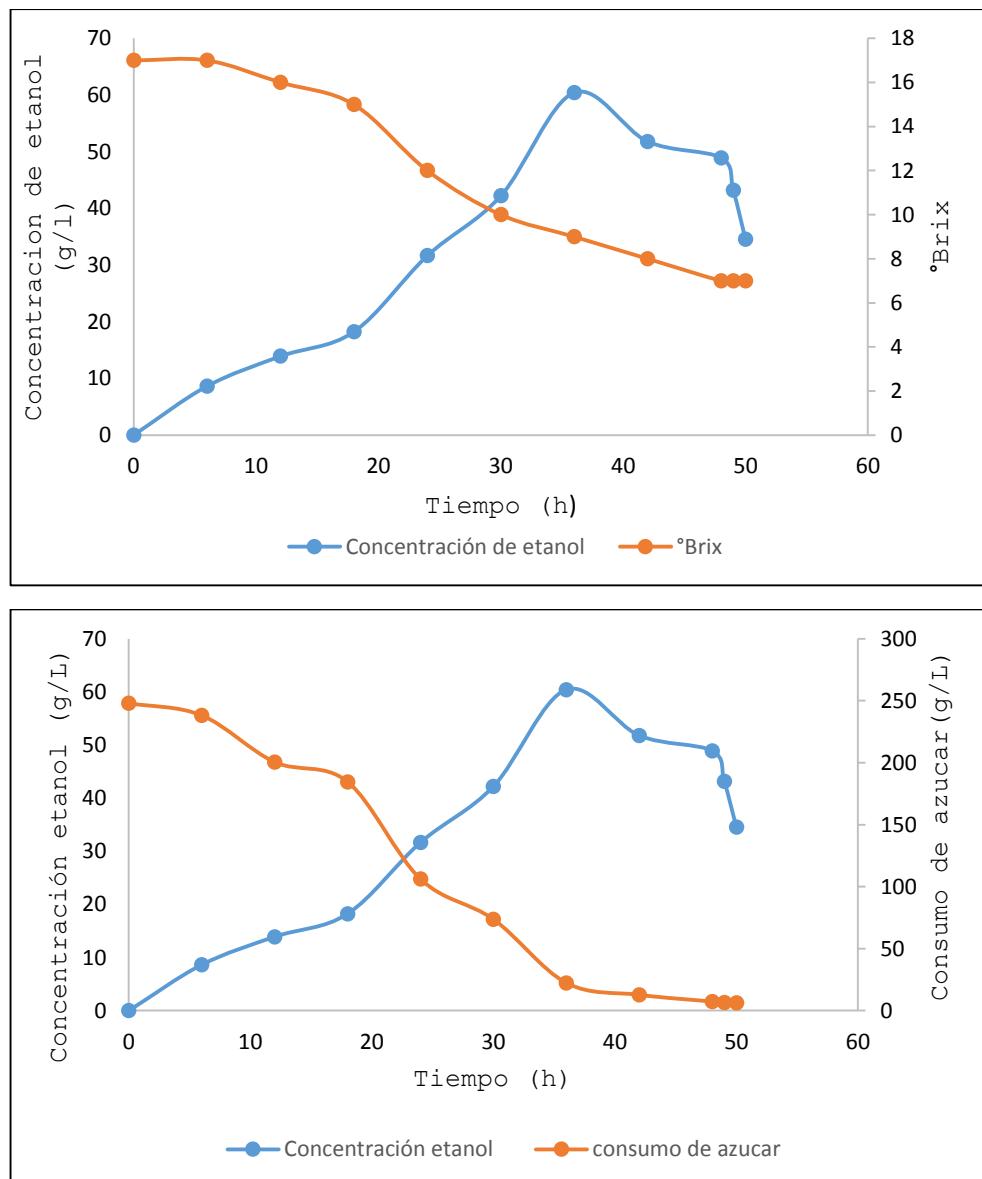


Ilustración 11Producción de etanol en sistema de células inmovilizadas.

En la ilustración 11 se muestra en el eje principal la producción de etanol a través del tiempo y en los ejes secundarios el ° Brix grafico (a) y consumo de azúcar grafico (b) respectivamente. El proceso de fermentación está enmarcado por el descenso del ° Brix; se partió de 17 °Brix iniciales que va descendiendo durante la generación de etanol hasta alcanzar los grados finales (7 °Brix) que constituyen la materia orgánica más sólidos que no se transforman esto indica que el proceso de fermentación está llegando a su fin. Como se puede ver en la ilustración 11 la producción de etanol se genera a través del tiempo en las primeras horas, alcanzando en este experimento 60 g/L en 36 horas de fermentación. Estos resultados son similares al estudio realizado por (Jin, Liu, & He, 2012) los cuales reportan una producción de etanol final de 58 [g/l] y otro estudio realizado por (Najafpour, Younesi, Ku, & Ismail, 2004) describen una concentración más alta con un alcance de producción que bordea los 90 [g/l] de etanol, con un sistema de células inmovilizadas en bagazo de sorgo.

La máxima cantidad de etanol que se logra producir en la fermentación se da cuando se consume un alto porcentaje de nutrientes del medio en este caso del mucílago de cacao; como se puede evidenciar el mosto inicial contiene aproximadamente 250 [g/l] de azúcar iniciales, para cuando se alcanza la máxima cantidad de etanol se consume gran parte de los azúcares quedando alrededor de 22 [g/l] presente en el mucílago. A partir de la producción máxima de etanol se tiene un declive, esto se debe a la formación de subproductos de diferente composición; los subproductos que se generan son tales como ácidos acético, láctico, succínico, tartárico, esteres y otros alcoholes de acuerdo a (Dias, Schwan, Freire, & Dos Santos Serôdio, 2007).

#### 4.5. Análisis de los resultados obtenidos en la fermentación de células libres

La generación de etanol mediante el sistema de células libres se realizó con fines de comparación con respecto, a la producción de etanol mediante el sistema de células inmovilizadas en cáscara de mazorca de cacao durante la fermentación de mucílago de cacao. Los resultados que se presentan a continuación en la ilustración 12 se muestran en el eje principal la producción de etanol a través del tiempo y en los ejes secundarios los ° Brix y consumo de azúcar, respectivamente en el grafico (a) y grafico (b).

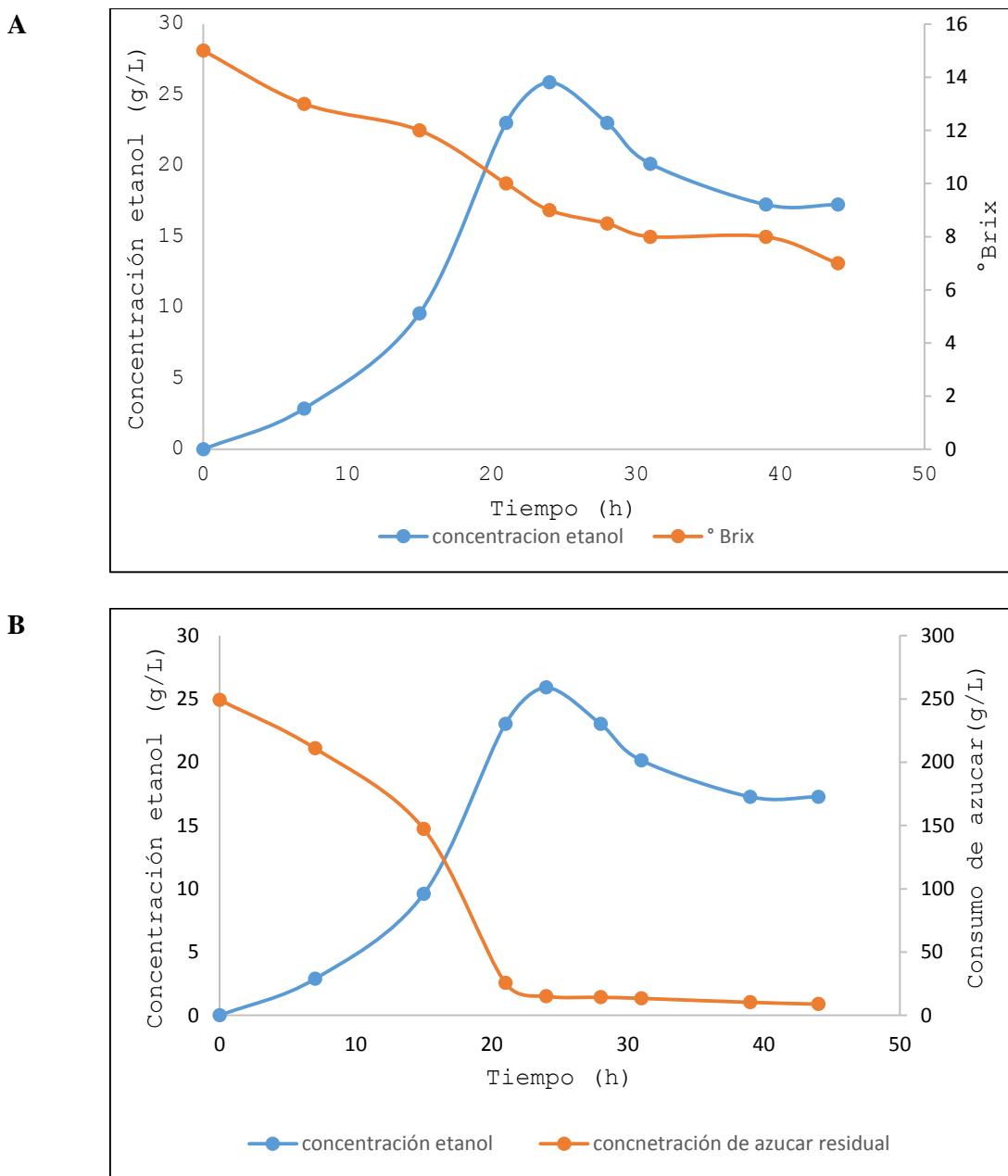


Ilustración 12 Producción de etanol en sistema de células libres.

El proceso de fermentación está enmarcado al igual que en el sistema de células inmovilizadas por el descenso del ° Brix, por medio el cual se puede saber si el medio de fermentación dispone o no de nutrientes. En el grafico (a) podemos observar una tendencia continua de descenso a través del tiempo hasta alcanzar 7 °Brix; a partir de esta medida se considera que existe una insuficiencia de nutrientes. En la ilustración 12 se puede evidenciar que la producción máxima de etanol se genera a las 24 horas de proceso brindando una producción alrededor de 25 g/L de etanol; después de este tiempo hay un

descenso en la producción por efecto de la fase estacionaria en que entra el crecimiento de las levaduras por factores de liberación de productos residuales que hacen que se genere un medio inhóspito para el crecimiento (Viteri et al., 2017). Este resultado tiene concordancia con lo obtenido en la investigación realizada por (Jin et al., 2012) en el cual presenta modelos cinéticos con lo que obtienen una concentración de 28 (g/l) de etanol; esta misma concentración reporta (Nieves & Castillo, 2018) por fermentación de mucílago de cacao con 8 (g/l) de células de levadura libres.

En el grafico (b) se puede observar que el proceso de fermentación inicia con 250 [g/l] de azúcar aproximadamente, las células consumen con una tendencia pronunciada este sustrato hasta alcanzar la máxima cantidad de etanol en donde queda alrededor de 15 [g/l] de azúcar presente en el mucílago de cacao. A partir de esto el azúcar se consume lentamente dado a que las células se encuentran en el estado estacionario como es mencionado anteriormente también se encuentra generando productos de diferente composición; llegando a consumirse al final del proceso de fermentación 90 % del azúcar total. Este comportamiento es similar al estudio realizado mediante modelos cinéticos por (Jin et al., 2012) donde reportan el 95 % de azúcares consumidos durante la fermentación partiendo de 200 (g/l) de azúcar.

#### 4.6. Comparación de la fermentación Batch mediante el sistema de células libres y sistema de células inmovilizadas

El objetivo de este proyecto busca mejorar la producción de etanol en la fermentación de mucílago de cacao con células inmovilizadas en soportes, para saber cuánto mejora comparamos con la producción de etanol mediante el sistema de células libres. De acuerdo a los resultados que se observaron anteriormente los sistemas con tecnología de células inmovilizadas poseen muchas ventajas frente a los sistemas convencionales bajo las mismas condiciones de operación y concentración de nutrientes 248 g/l; uno de ellos es el aumento en la productividad del proceso de fermentación gracias a la posibilidad de aumentar la densidad celular a través de los soportes.

Durante el proceso de fermentación de mucílago de cacao el sistema de células inmovilizadas tomó 36 horas en consumir el 91% del azúcar total y producir 60 g/L, la productividad y el rendimiento fueron 1,667 [g/L h] y 0,27 g de etanol/ g de azúcar consumido, respectivamente. En contraste después de 24 horas, se consumió el 90 % del total de azúcar bajo el sistema de células libres para producir 25 g/L. La productividad y

rendimiento fueron 1,07 [g/L h] y 0,11 g de etanol/ g de azúcar consumido respectivamente; esto indica que la aplicación del sistema de células inmovilizadas mejora 2.5 la producción de etanol.

#### 4.7. Análisis de los resultados obtenidos por cuantificación de biomasa mediante el sistema de células inmovilizadas

Para la cuantificación de la biomasa se aplicó el método de liofilización el cual está basado por el fenómeno físico de sublimación; a continuación se muestran los resultados de este proceso en la tabla 19.

Tabla 19 Concentración de biomasa a partir del método de Liofilización.

Tiempo [h]	Promedio peso muestra seca [g/ml]	Promedio peso muestra seca [g/L]	Peso de Biomasa
<b>blanco</b>	0,00682	6,820	0,000
<b>0</b>	0,00682	6,820	0,000
<b>6</b>	0,00705	7,056	0,236
<b>12</b>	0,00778	7,786	0,966
<b>18</b>	0,00892	8,923	2,103
<b>24</b>	0,00912	9,121	2,301
<b>30</b>	0,01276	12,763	5,943
<b>36</b>	0,01650	16,501	9,681
<b>42</b>	0,02360	23,606	16,786
<b>48</b>	0,02263	22,633	15,813
<b>49</b>	0,02347	23,470	16,650
<b>50</b>	0,02375	23,751	16,931

Condiciones de operación: T°C [35], pH [4], velocidad de agitación [100 rpm].

El valor del blanco es aquella muestra que tomó sin soportes de células inmovilizadas.

En la Tabla 19 se presentan los resultados de promedios de pesos de muestras secas y pesos de biomasa en [g/L]; además las condiciones de operación a las cuales se llevaron a cabo los experimentos y de manera gráfica en la ilustración 13 se representa la concentración de Biomasa [g/L] en función del tiempo [h], en donde se puede observar el crecimiento de levaduras “*Saccharomyces cereviciae*” durante el proceso.

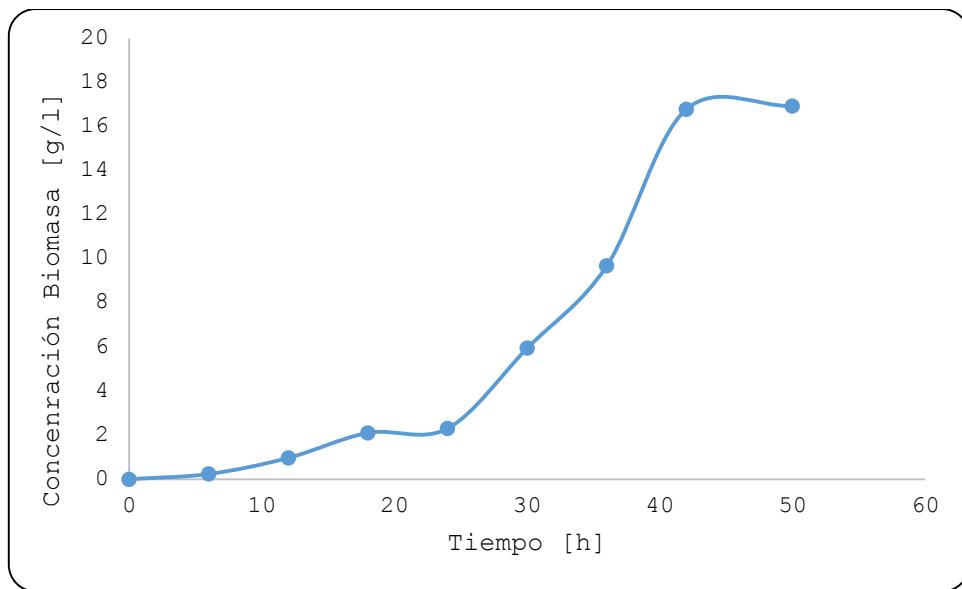


Ilustración 13 Concentración de biomasa en sistema de celulas inmovilizadas con las condiciones de operación pH (4), temperatura (35°C) y 100 rpm.

Durante el proceso de fermentación las células que se encuentran adheridas débilmente es decir no tenían fuerte incrustación en los poros del soporte de inmovilización migran y crecen en el medio que está siendo fermentado. En la ilustración 13 se puede evidenciar el crecimiento de estas células que transcurre desde las 6 primeras horas para luego reproducirse hasta llegar al estado estacionario a las 40 horas de trabajo con 16,7 [g/L] en condiciones de operación de 35°C, pH 4 y 100 rpm de agitación. En los estudios de (Yu et al., 2007 ) y (Ivanova, Petrova, & Hristov, 2011) reportaron concentraciones similares de células determinadas como libres en el medio de fermentación que bordea entre 10 y 12 [g/L].

Las muestras que se tomaron para los análisis fueron desde el tiempo 0 hasta el tiempo en que el consumo de sustrato medido en °Brix se mantienen constante 50 [h] lo que indica que hay insuficiencia de nutrientes. De acuerdo con las fases de crecimiento de las células de levadura “*Saccharomyces cereviciae*” en esta grafica no se pueden identificar fases que transcurren en un tiempo más largo del proceso pero si fases como aceleración, exponencial, ralentización y estacionaria. De acuerdo a (Hidalgo J., 2010) la fase de declive transcurren a las 500 horas de proceso o en un tiempo 3 o 4 veces más largo que la del crecimiento.

#### 4.8. Análisis de los resultados obtenidos por cuantificación de biomasa mediante el sistema de células libres

En la ilustración 14 se presenta la cantidad de biomasa que se genera durante el proceso de fermentación del mucílago de cacao bajo el sistema de células libres.

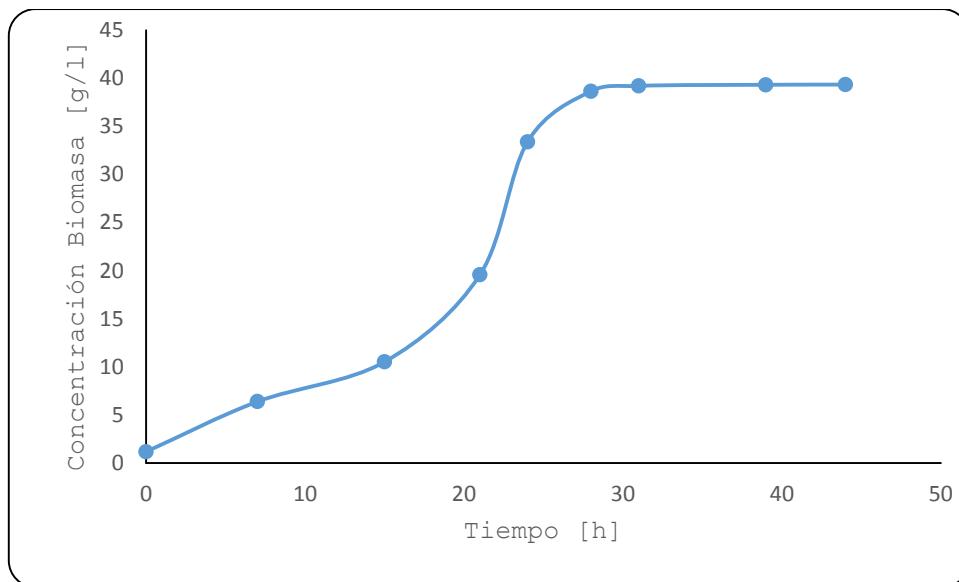


Ilustración 14 Producción de biomasa mediante sistema de células libres bajo las mismas condiciones de operación pH (4), temperatura (35°C) y 100 rpm.

En la ilustración 14 observamos la concentración de biomasa para cada tiempo de muestreo obtenidos en el experimento. En esta ilustración se puede evidenciar que la reproducción de las levaduras se da dentro del tiempo en que toma producir la máxima cantidad de etanol. Este experimento terminó a las 44 horas, cabe destacar que no se observa fase de adaptación ya que esto se da en las primeras 2 horas de acuerdo a estudios realizados y descritos por (Mora Y., 2014). El crecimiento exponencial de la biomasa se observa más pronunciado a partir de las 6 horas hasta las 24 horas, este es el tiempo en la cual se produce la mayor cantidad de etanol, produciendo alrededor de 40 [g/L] de biomasa hasta esta instancia del proceso de fermentación en condiciones de operación, pH 4, temperatura 35 °C y 100 rpm de agitación. (Leal, Tarantino, Hernández, & Morán, 2014) reportó en su estudio, el tiempo en que se estabilizó la fermentación es decir cuando se da el mayor consumo de sustrato fue de 32 horas aproximadamente en condiciones de operación, pH 4, temperatura 33 °C generando 90 [g/l] de biomasa. Otro valor similar 90,9 [g/l] determinan (Nieves & Castillo, 2018) en su estudio en condiciones de operación de pH 4, temperatura 35 °C y 3 [g/l] de levadura.

## 5. CONCLUSIONES

En este proyecto, el sistema de células inmovilizadas aplicado a la fermentación del mucílago de cacao CCN-51, permitió mejorar el rendimiento y productividad del etanol; ya que se consiguió una buena inmovilización a través de una alta densidad celular conseguido mediante el proceso físico de adsorción de las células en cáscaras de cacao. No obstante, el factor que influye para el éxito de esta técnica es la fuerza con la que se fijan las células por medio de interacciones hidrofóbicas en los tejidos del material de inmovilización (cáscara de cacao); en el primer ensayo fue difícil conseguir este objetivo con gran eficiencia pero a medida que se avanzó en los consecuentes ensayos se alcanzó la fuerza necesaria de inmovilización.

La fermentación en el reactor tipo BATCH bajo el sistema de células inmovilizadas se logró consumir más del 90 % del azúcar después de 36 horas partiendo de una concentración inicial de 250 [g/l] de azúcar total dando una producción de 60 g/L de etanol, productividad y rendimiento de 1,667 [g/L h] y 0,27 g de etanol/ g de azúcar consumido, respectivamente. Mientras que bajo el sistema de células libres también se consume más del 90 % del total de azúcar pero la producción de etanol es de 25 g/L, productividad y rendimiento de 1,07 [g/L h] y 0,11 g de etanol/ g de azúcar consumido, respectivamente.

Por lo tanto, el método de inmovilización es un método innovador ya que permite de forma eficaz estabilizar los sistemas de fermentación; en este método se destacan los medios de cultivo enriquecidos ya que son los actores principales en la producción y viabilidad celular que se necesita para lograr una inmovilización firme de las células en los soportes. La cáscara de cacao al tener una gran porosidad posee un gran potencial como portador de células, además, por ser un material de bajo costo y otras ventajas como: la simplicidad para aplicar la técnica de inmovilización, su durabilidad y su resistencia como portador.

De acuerdo a los resultados obtenidos y mencionados anteriormente se puede demostrar que se consiguió mejorar el rendimiento y productividad del etanol aplicando el sistema de células inmovilizadas, el cual nos llama a tener en cuenta y adaptarlo como un tema de innovación.

## 6. RECOMENDACIONES

La cepa de células madre se deben renovar cada mes para tener una buena vitalidad de las células además que se deben conservar a 4°C. Para lograr tener una mejor vitalidad de las células se podría aumentar la concentración de polipeptona, MgS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y KHPO<sub>4</sub> en los pre-cultivos que se prepare ya que estos reactivos son los encargados de enriquecer el medio y brindar fortaleza a las levaduras.

Para lograr tener una fuerte inmovilización de células vivas y alta densidad celular en soportes de cáscara de cacao se debe considerar los siguientes aspectos: la técnica menciona que en la tercera fase de inmovilización se remplaza el medio de cultivo (a) por el medio de cultivo (b) al realizar este procedimiento las células se pueden contaminar como sucedió en uno de los ensayos de este proyecto. Para el propósito de realizar fermentaciones de mucílago de cacao a escala industrial se debe realizar un estudio económico mediante la determinación de costos para conocer si el proyecto tiene rentabilidad.

## 7. REFERENCIAS

- AgroWaste, CSIC, & LIFE. (2012). FERMENTACION ALCOHOLICA -. *Centro Tecnologico Internacional de La Conserva y La Alimentacion.*
- Aguilar, D. (2018). CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL TEMA :  
AUTOR : Aguilar Oliveros , Diana Vanessa INGENIERA AGROINDUSTRIAL  
TUTORA : Dra . Pulgar Oleas , Nelly Lorena , M . Sc .
- análisis Bioquímico. (2019). Retrieved from  
<https://aprenderely.com/doc/3269120/capítulo-1-análisis-bioquímico>
- Anvoh, K., Zoro, A., & Gnakri, D. (2009). Production and Caracterization of Juice from Mucilage of Cocoa Bens and its transformation into Marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition* 8(2) 129 -33 ,2009, ISSN 1680-5194.  
<https://doi.org/pjn.2009.129.133&org=11>
- Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., & Salakkam, A. (2016). Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 66, 210–216.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.023>
- ARROYO, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Departamento de Biología y Bioquímica Molecular*, (11), 1–17.
- Azcapotzalco, H., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica : Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas Alcoholic fermentation : An option for renewable energy production. *Departamento de Sistemas, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico. Oficina de Consejo, Desarrollo y Transferencia Tecnológica, Dijon, Francia.*, 1, 249–259.
- Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., ... Harashima, S. (2012). Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New Biotechnology*, 29(3), 379–386.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.07.002>
- Bernfeld, P., & Wan, J. (1963). Antigens and Enzymes Made Insoluble by Entrapping Them into Lattices of Synthetic Polymers. *Science*, 142(3593), 678 LP – 679.  
<https://doi.org/10.1126/science.142.3593.678>
- Brányik, T., Vicente, A. A., Dostálek, P., & Teixeira, J. A. (2005). Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems. *Biotechnology Progress*, 21(3), 653—663. <https://doi.org/10.1021/bp050012u>
- Calderon, L. (2002). Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobromacacao L.*) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad, 144.
- Callegaro, L., & Denti, E. (1983). Applications of bioreactors in medicine. *The International Journal of Artificial Organs*, 6 Suppl 1, 107—110. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/6358050>
- Calzada A., Bueno A., S. M. (2000). El inicio de la replicación del ADN ©. *Ciencia Internacional*, 3(1), 1–15.
- Campo, Y. (2016). *Los Microorganismos en el concreto.*
- Capelo, M., & Perez, M. (2011). determinación de carbohidratos totales en bebidas analcohólicas consumidas por adolescentes en la ciudad de cuenca y nabón. *tesis previa a la obtención del título de bioquímico farmacéutico*, 35.

- Cerra, H., Aversa, N., Carbone, N., Carnevali, S., Chiesa, C., Covo, M., ... Zaresky, A. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*.
- Claudia Degrossi, M. W. (2005). Estudio de las cepas de levaduras.
- CONAVIO. (2012). comision nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. *Theobroma Cacao, México*.
- Criminalistica, M. P. (2008). el Método de Microdifusión en Cámara de Conway. *Química e Investigación Criminal. Departamento Metropolitano de Caracas, Venezuela, 1*, 1–2.
- Dias, D. R., Schwan, R. F., Freire, E. S., & Dos Santos Serôdio, R. (2007). Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(3), 319–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01226.x>
- Dolores, B., & Manuel, P. (2015). degradación de limonina por células de *rhodococcus fascians* inmovilizadas por atrapamiento en criogelos de alcohol polivinílico y perlas huecas de alginato de calcio. aplicación en zumos, 99–117.
- Dolores, M., Castillo, F., Blasco, R., Huertas, J., Caballero, F., Moreno, C., & Martinez, M. (2005). BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL. In *Libro- Biotecnología ambiental . Madrid-España (# 1, pp. 303–317)*. Madrid.
- Editorial, U. S. L. U. (2018). Conceptos del cacao.
- Espinoza Ordoñez, V. A. (2015). Utilización del jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) como medio de cultivo para la producción de *Saccharomyces boulardii* L. *Universidad Técnica De Machala, 70*. Retrieved from <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3185/2/CD0000-28-TRABAJO COMPLETO-pdf>
- Estrada, A., Bacilio, J., Miguel, L., Valverde, L., Wong, W., Cruz, M. S., & Linares, G. (2015). evaluación de harina de soya como fuente primaria en la produccion de biomasa de *Saccaromyces cerviciae*. *A g r o i n d u s t r i a l S c i e n c e Escuela de Ingenieria Agroindustrial. Universidad Nacional de Trujillo, 5*.
- Fajardo, E. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de. *Tesis de Pregrado*.
- Fajardo, R., Osuna, J., Villa, C., Escalante, P., & Ibarra, V. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Acta Química Mexicana*, 3, 42–56.
- FAO. La Bioenergía y los Biocombustibles (2015).
- Fernandez, J. (1950). Dialnet- [El Metodo De Microdifusion De Conway Su Aplicacion En El Dos-6293311.pdf](https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6293311.pdf). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6293311.pdf>
- Galazzo, J. L., & Bailey, J. E. (1990). Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(4), 417–426. <https://doi.org/10.1002/bit.260360413>
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5), 535–569. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>
- González, A. (2009). Microscopia Electronica de Barrido. Retrieved from El Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI), Universiad de Murcia

- Griffiths, D., & Hall, G. (1993). Biosensors--what real progress is being made? *Trends in Biotechnology*, 11(4), 122–130. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90086-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90086-O)
- Hendrik, A., Heering, F. G., Wiertz, M., & Cees, D. (2004). Direct Immobilization of Native Yeast Iso-1 Cytochrome c on Bare Gold: Fast Electron Relay to Redox Enzymes and Zeptomole Protein-Film Voltammetry. *Localización: Journal of the American Chemical Society: ISSN 0002-7863, Vol. 126*, págs. 11103-11112.
- Hernandez, P., Yepez, C., Cevallos, I., & Fernando, P. (2018). Analisis de factibilidad tecnica para la produccion de bioetanol a partir de residuos de maiz en Ecuador Technical feasibility analysis for the production of bioethanol from maize residues in Ecuador. *Universidad Técnica Del Norte-Ecuador INNOVA No. 7*, 36-52. ISSN 2477-9024, 3(7), 36–52.
- Hernandez, C. (2005). Universidad de Murcia. *All Rights Reserved. IJES*, 281(4), 1–30. Retrieved from <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf> <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Universidad+de+murcia#0>
- Hidalgo, J. (2010). Tratados de enología y procesos microbianos. *Mundi-Prensa Libros, Madrid España*, 2(81 (185)), 204–210.
- Isabel, A., & López, A. (2019). *Determinacion de la velocidad maxima de reacción y constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucilago de cacao CCN-51*.
- Ivanova, V., Petrova, P., & Hristov, J. (2011). Application in the Ethanol Fermentation of Immobilized Yeast Cells in Matrix of Alginate/Magnetic Nanoparticles, on Chitosan-Magnetite Microparticles and Cellulose-coated Magnetic Nanoparticles, 3(March), 289–299. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/1105.0619>
- Jin, H., Liu, R., & He, Y. (2012). Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Sweet Sorghum Stalk Juice. *Procedia Environmental Sciences*, 12, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.258>
- Jordi, S. (2017). cámara thoma y neubauer improved para el recuento de levaduras ( tiraje ). *gab Sistemática Analitica. Moja Olerdola 08734 Bcn-Spain*, 1–5.
- Juan, A., & Morales, D. (2010). ÁREA DE ESTUDIOS SOCIALES Y GLOBALES, 0–136.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), 377–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Lares Mary, Pérez Elevina, Álvarez Clímaco, Perozo José, E. K. S. (2013). Cambios de las propiedades físico-químicas y perfil de ácidos grasos en cacao de Chuao, durante el beneficio. *Agronomía*. Retrieved from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2013000100004&lng=es&tlang=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2013000100004&lng=es&tlang=es)
- Le, C., & Stuckey, D. C. (2016). Colorimetric measurement of carbohydrates in biological wastewater treatment systems: A critical evaluation. *Water Research*, 94, 280—287. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.008>
- Leal, I., Tarantino, G., Hernández, R., & Morán, H. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui. *Multiciencias*, (14(4)), 375–381.
- López-legarda, X., Taramuel-gallardo, A., & Arboleda-, C. (2017). Comparación de

- métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales  
Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars  
Resumen Introducción, 29(2), 180–198.
- Lopez, T., & Torres, L. (2007). Trabajo tipos de Medios de Cultivo. *Facultad de Agroindustrias Universidad Del Nordeste*, 2.
- Lopez Vital, P. (2016). caracterización metabólica de la tolerancia de levaduras al estres por compuestos fenolicos y azufrados. *Centro de Biotecnología Gemónica. Instituto Politecnico Nacional*.
- M., C. (2001). una célula madre da lugar a la formación de yemas en diferentes puntos de la superficie produciendo en cada uno sólo una célula hija (blastoconidio o blastospora), pero en, (1), 40–46.
- Manzanos, P. (2014). Identificación y caracterización completa ( ampelográfica , 314.
- Martínez, H. (2008). Biocombustibles en el Ecuador, 1–320.
- Mateus, P. (2010). Condiciones de cultivos de microorganismos. *Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca*.
- Merchan, M., & Flores, E. (2017). (Theobroma cacao). *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quevedo-Ecuador*, (Guía para facilitar el aprendizaje en el manejo integrado del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)).
- Meré, J. (2017). Estudio del procesado de un Polímero termoplástico basado en almidón de patata amigable con el medio ambiente. *Departamento De Ciencia E Ingeniería*, 1–176. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/30043724.pdf>
- Middleton, E. L. (2019). Efecto del uso de diferentes antiespumantes en la fermentación anaerobia Levadura, Mucilago de cacao CCN-51 en diversas concentraciones de la Bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae* y su influencia en la producción de bioetanol.
- Miranda, F. (2015). *Asociación nacional de exportadores de cacao-Ecuador. Revista institucional de Anecacao, Edicion 21*.
- Mora, Y. (2014). Modelación de la fermentación alcoholica del zumo de pomarrosa. *Universidad Central Del Ecuador*, 22(6), 3–14.
- Moreno, J., Martínez, T., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2018). Yeast Immobilization Systems for Alcoholic Wine Fermentations: Actual Trends and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00241>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Najafpour, G., Younesi, H., Ku, K., & Ismail, S. (2004). la fermentación del etanol en un reactor de células inmovilizadas utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, 92, 251–260.
- Nedović, V., Manojlović, V., Branko, B., & Willaert, R. (2011). State of the Art in Immobilized/Encapsulated Cell Technology in Fermentation Processes. In *Food Engineering Series* (pp. 119–146). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7475-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7475-4_6)
- Nervi, E. (2018). Aplicaciones de inmovilización e ingeniería genética en la producción de cerveza. *Departamento de Ingenieria Genetica. Biotecnología*.
- Nervi Faggiani, E. (2017). Aplicaciones de Inmovilización e Ingeniería genética en la producción de cerveza. *Universidad ORT Uruguay, Facultad de Ingeniería*. Retrieved from <https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/3371>

- Nesmi, L. (2010). Universidad de san carlos de guatemala facultad de agronomía.
- Nieves, A., & Castillo, O. (2018). Influencia en la producción de biomasa, etanol y ácido acético con el incremento de la concentración de la levadura *saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones anaerobias del mucílago del cacao CCN-51. *Universidad de Cuenca (Bachelor's Thesis)*, 121.
- Nils Hidalgo, C. (2015). *Materiales Genéticos de Theobroma Cacao*.
- Norton, S., & D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(5), 365–375. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90150-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90150-3)
- Núñez, M. J., & Triñanes, P. (2010). BIOCOMBUSTIBLES : Bioetanol y Biodiesel. *Departamento de Inginieria Quimica, ETSE. Universidad de Santiago*, 10.
- Oballe, A. (2016). Tipos de Cacao. *Cacao Nativ*, 2. Retrieved from <http://cacaonativo.blogspot.com/2016/09/contacto.html>
- Orrego, E. (2008). *Congelación y liofilización de alimentos*.
- Pedro, T., Luna, P., & Velazco, A. (2012). Revista Mexicana de I ngeniería Q uímica. *Universidad de Guadalajara*, 52(33).
- Petrenko, O. (2005). *Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo*. Universidad de Belgrano.
- Phillips-mora, W., Arciniegas-leal, A., Mata-quirós, A., Motamayor-arias, J. C., & Motamayor-arias, J. C. (2012). Catálogo seleccionados por el catie para siembras comerciales. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Programa de Mejoramiento Genético de Cacao. Turrialba, Serie técnica. Manual técnico no.105*.
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *Journal of Biotechnology*, 243, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.012>
- Plata, K. (2013). Multiplicación microbiana. *Departamento de Microbiología. Universidad Iberoamericana*.
- Poletto, J. A., & Silva, L. (2009). Influencia de la Separación de Residuos Sólidos Urbanos para Reciclaje en el Proceso de Incineración con Generación de Energía Influence of the Separation of Municipal Solid Wastes to Recycling in the Incineration Process with Energy Generation, 20(2), 105–112. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4062it.08>
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634–640. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>
- Quizhpi, X. (2016). Caracterización del mucilago de cacao CCN-51 mediante espectrofotometría UV-visible y absorción atómica” caso. *Universidad de Cuenca (Bachelor's Thesis)*.
- Ramirez Navas, J. (2006). Metodo de liofilización. *Universidad Del Valle, Programa Doctoral Con Enfasis En Ingenieria En Alimentos.*, 6.
- Rizzuto, M. L. (2015). Productos básicos agrícolas y desarrollo: producción y comercialización de cacao en Venezuela. *Saber.Ula.Ve*, 114. Retrieved from <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/41852>

- Rogtheer, J. (2018). New horizons for oil companies. *Texas Energy Departament*.
- Rojas, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general. *Departamento de Biología y Bioquímica Molecular Universidad de Guadalajara*, 134.
- Salinas, M. de los angeles. (2012). Diagrama de fases del agua. *Departamento de Físico-Química, Universidad SENATI, Perú.*, 12.
- Sánchez, A. (2011). *Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza*. Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, Á., & Deák, T. (2006). Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 120–124.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.014>
- Sevilla, B. (2020). *suministro mundial de energía*.
- Shell, D. (2016). El final del petróleo. *Richmand Refinery Virginia*, 20–23.
- Stajić, S., Kalušević, A., Tomasevic, I., Rabrenović, B., Božić, A., Radović, P., ... Živković, D. (2016). Technological Properties of Model System Beef Emulsions with Encapsulated Pumpkin Seed Oil and Shell Powder. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70, 159–168. <https://doi.org/10.31883/pjfn/118008>
- Tapia, D. (2019). *Efecto del uso de diferentes antiespumantes en la fermentación anaerobia de Mucílago de cacao CCN-51 en diversas concentraciones de levadura Saccharomyces cerevisiae y su influencia en la producción de bioetanol*.
- Unam. (2019). “BACTERIAS EN ALIMENTOS” Intoxicación alimentaria estafilocócica. *UnAD México*, 1–38. Retrieved from [https://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/internal/courses/NA-NHCA-1902-B1-002/announcements/\\_331618\\_1/BACTERIAS.pdf](https://unadmexico.blackboard.com/bbcswebdav/internal/courses/NA-NHCA-1902-B1-002/announcements/_331618_1/BACTERIAS.pdf)
- Uribe, A., Cortes, M., & Alexader, Z. (2007). Caracterización fisiológica de las levaduras aisladas de la Filosfera de mora. *Microbiología Industrial Pontificia Universidad Javeriana*.
- Uribe, L. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Villagómez García, S., & Argüello Moreta, F. (2013). Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del mucílago) de la almendra fresca del cacao (theobroma cacao l.) ccn51 en la elaboración de vinagre. *Tsafiqui - Revista Científica En Ciencias Sociales*, 4(4 SE-), 7–19. <https://doi.org/10.29019/tsafiqui.v0i4.256>
- Viteri, A., Carb, R., & Ginovart, M. (2017). In *Science Education and Learning*, 10(2), 153–192.
- Yokotsuka, K., Yajima, M., & Matsudo, T. (1997). Production of Bottle-Fermented Sparkling Wine Using Yeast Immobilized in Double-Layer Gel Beads or Strands. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 471 LP – 481. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/48/4/471.abstract>
- Yu, J., Zhang, X., & Tan, T. (2007). An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology* 129 (2007) 415–420, 129, 415–420.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.039>
- Zamora, T., Prado, A., Capataz, J., Barrera, B., & Peña, J. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educacion Química*, 25(2), 122–127. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(14\)70534-8](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(14)70534-8)

## 8. ANEXOS

### 8.1. Resultados obtenidos en la inmovilización de células

# de células inmovilizadas en los soportes	
Experimento 1	1,28E+08
Experimento 2	5,15E+08
Experimento 3	6,30E+08
Experimento 4	1,72E+09
Experimento 5	6,45E+08

### 8.2. Datos de la serie de diluciones realizadas para determinación de azúcares

Número de muestra	Tiempo de fermentación [h]	Diluciones
Muestra 1	0	1/5000
Muestra 2	6	1/5000
Muestra 3	12	1/5000
Muestra 4	18	1/5000
Muestra 5	24	1/5000
Muestra 6	30	1/5000
Muestra 7	36	1/1000
Muestra 8	42	1/1000
Muestra 9	48	1/500
Muestra 10	49	1/500
Muestra 11	50	1/500

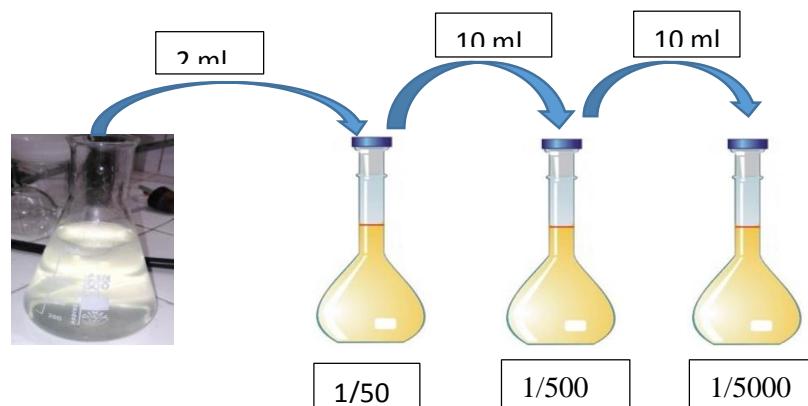


Ilustración 15 Serie de diluciones

### 8.3.Resultados obtenidos en la fermentación de todos los experimentos.

Tabla 20 Resultados del experimento 1, en condiciones de operación de pH [4], T °C [35] y velocidad de agitación 100 rpm.

tiempo (h)	°Brix	Muestra	Sub. Muestra		Concentración etanol [g/l]
<b>0</b>	16	blanco	3,6 3,6 3,6	3,6	0
<b>6</b>	13	M1	3,3 3,3 3,3	3,3	8,6325
<b>12</b>	12	M2	3,1 3,2 3,1	3,13333333	13,4283333
<b>18</b>	10	M3	3 3 3	3	17,265
<b>24</b>	9	M4	2,5 2,4 2,5	2,46666667	32,6116667
<b>30</b>	9	M5	2,2 2,2 2,2	2,2	40,285
<b>36</b>	8	M6	1,8 1,9 1,8	1,83333333	50,8358333
<b>42</b>	8	M7	2,1 2,1 2,1	2,1	43,1625
<b>48</b>	7	M8	2,4 2,4 2,4	2,4	34,53
<b>49</b>	7	M9	2,7 2,7 2,7	2,7	25,8975
<b>50</b>	7	M10	2,8 2,8 2,8	2,8	23,02
<b>Los valores de sub muestra corresponden al volumen de tiosulfato consumido por titulación.</b>					

Tabla 21 Resultados obtenidos del experimento 2, en condiciones de operación de pH [4], T°C [35] y velocidad de agitación 100 rpm.

tiempo (h)	°Brix	Muestra	Sub. Muestra	Concentración etanol [g/l]	
0	17	blanco	3,6	3,6	0
			3,6		
			3,6		
6	17	M1	3,3	3,26666667	9,59166667
			3,2		
			3,3		
12	16	M2	3,1	3,06666667	15,3466667
			3,1		
			3		
18	15	M3	2,9	2,9	20,1425
			2,9		
			2,9		
24	14	M4	2,8	2,8	23,02
			2,8		
			2,8		
30	12	M5	2,7	2,7	25,8975
			2,7		
			2,7		
36	11	M6	2,2	2,16666667	41,2441667
			2,2		
			2,1		
42	10	M7	1,9	1,9	48,9175
			1,9		
			1,9		
44	9	M8	1,8	1,83333333	50,8358333
			1,9		
			1,8		
48	8	M9	1,7	1,66666667	55,6316667
			1,7		
			1,6		
50	7	M10	2,1	2,1	43,1625
			2,1		
			2,1		
53	7	M11	2,3	2,23333333	39,3258333
			2,2		
			2,2		
<b>Los valores de sub muestra corresponden al volumen de tiosulfato consumido por titulación.</b>					

Tabla 22 Resultados obtenidos obtenido del experimento 3, en condiciones de operación de pH [4], T°C [35] y velocidad de agitación 100 rpm.

tiempo (h)	°Brix	Muestra	Sub. Muestra	concentración etanol [g/l]	
0	17	blanco	3,6	3,6	0
			3,6		
			3,6		
7	15	M1	3,1	3,13333333	13,4283333
			3,1		
			3,2		
13	13	M2	2,6	2,63333333	27,8158333
			2,6		
			2,7		
18	10	M3	2,2	2,16666667	41,2441667
			2,2		
			2,1		
22	8	M4	1,9	1,88333333	49,3970833
			1,9		
			1,85		
23	7	M5	1,6	1,63333333	56,5908333
			1,6		
			1,7		
24	7	M6	1,7	1,7	54,6725
			1,7		
			1,7		
27	7	M7	2,1	2,13333333	42,2033333
			2,2		
			2,1		
30	6	M8	2,4	2,4	34,53
			2,4		
			2,4		
34	6	M9	2,4	2,43333333	33,5708333
			2,5		
			2,4		

**Los valores de sub muestra corresponden al volumen de tiosulfato consumido por titulación.**

Tabla 23 Resultados del experimento 4, en condiciones de operación de pH [4], T°C [35] y velocidad de agitación 100 rpm.

tiempo (h)	°Brix	muestra	Sub. muestra	Concentración de etanol [g/l]	
0	17	blanco	3,6	3,6	0
			3,6		
			3,6		
6	17	M1	3,3	3,3	8,6325
			3,3		
			3,3		
12	16	M2	3,1	3,11666667	13,9079167
			3,1		
			3,15		
18	15	M3	3	2,96666667	18,2241667
			2,9		
			3		
24	12	M4	2,5	2,5	31,6525
			2,5		
			2,5		
30	10	M5	2,1	2,13333333	42,2033333
			2,2		
			2,1		
36	9	M6	1,5	1,5	60,4275
			1,5		
			1,5		
42	8	M7	1,8	1,8	51,795
			1,8		
			1,8		
48	7	M8	1,9	1,9	48,9175
			1,9		
			1,9		
49	7	M9	2,1	2,1	43,1625
			2,1		
			2,1		
50	7	M10	2,4	2,4	34,53
			2,4		
			2,4		
<b>Los valores de sub muestra corresponden al volumen de tiosulfato consumido por titulación.</b>					

8.4. Registro de fotografías de cada etapa del proyecto realizado.



Ilustración 16 Cultivo de la cepa de levadura usado en el desarrollo de los experimentos



Ilustración 17 Preparación e incubación de pre-cultivo.



Ilustración 18 preparación de los soportes de inmovilización



Ilustración 19 Cosecha de células.

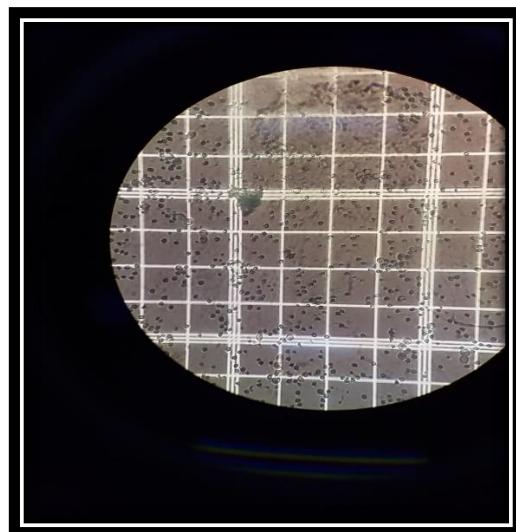
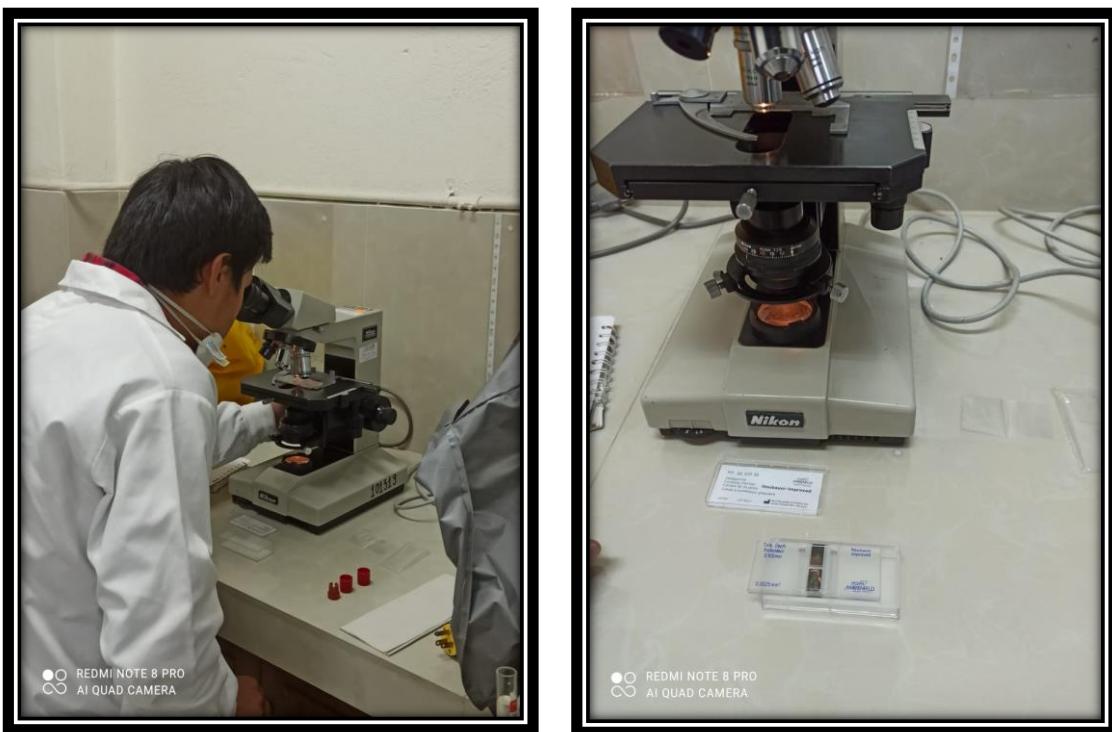


Ilustración 20 Visualización y conteo de células en cámara Neubauer.



Ilustración 21 Secado de los soportes de inmovilización.



Ilustración 22 Adsorción y fijación de las células de levadura.



Ilustración 23 Retención de humedad.



Ilustración 24 Medición de parámetros del mucílago de cacao



Ilustración 25 Adición del mucílago de cacao en el reactor y ajuste parámetros de fermentación

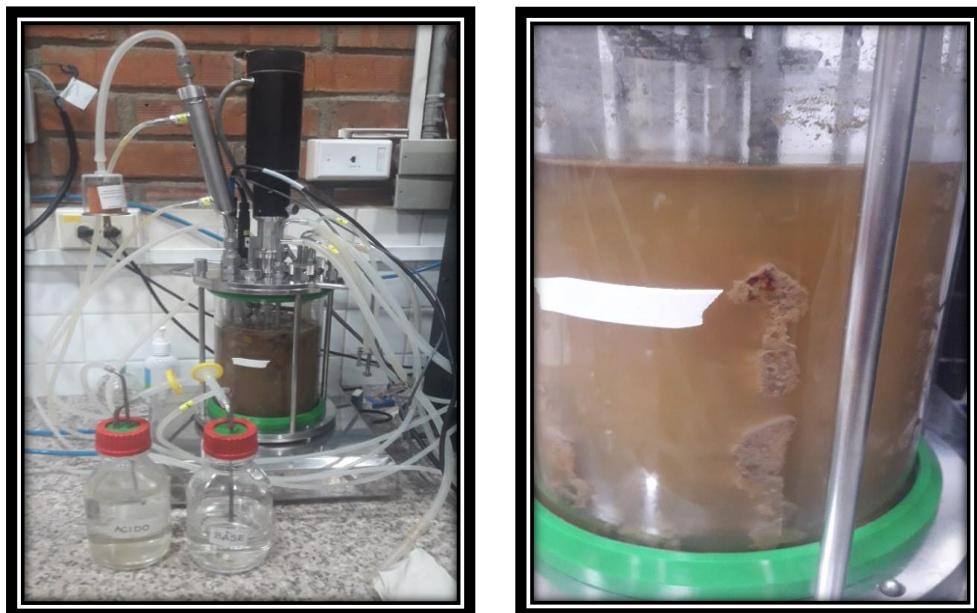


Ilustración 26 Proceso de fermentación con células inmovilizadas



Ilustración 27 Preparación de las muestras para análisis de etanol.



Ilustración 28 Proceso de micro difusión del etanol.



Ilustración 29 Proceso de titulación de muestras con tiosulfato de sodio.

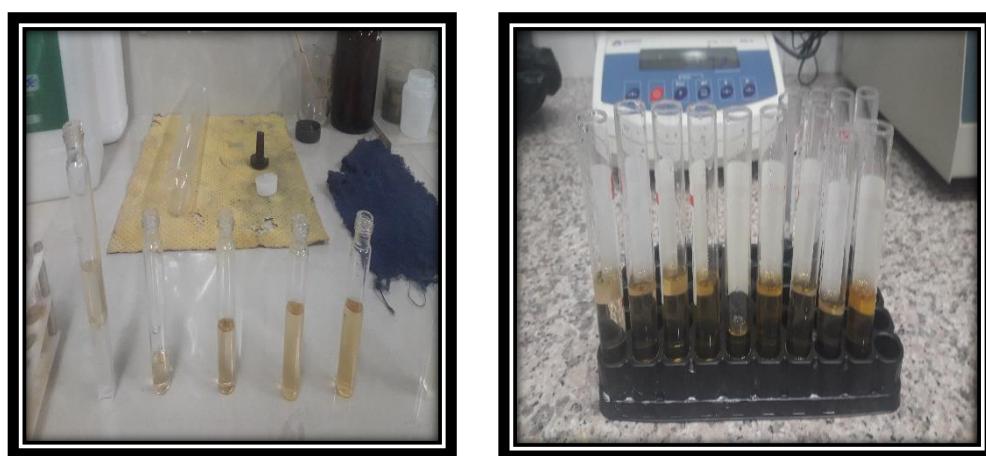


Ilustración 30 Preparación y análisis de muestras para glucosa.



*Ilustración 31 Análisis de biomasa por Liofilización.*