



## Efecto del tamaño de perla y de la concentración de alginato de sodio en la difusividad efectiva de los azúcares solubles y en la producción alcohólica a partir de mosto de uva (*Vitis vinífera*) variedad cardinal con biorreactor estático utilizando células inmovilizadas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Effect of bead size and concentration of sodium alginate in the effective diffusivity of soluble sugars and the alcoholic from production grape (*Vitis vinífera*) cardinal variety with static bioreactor using immobilized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*)

Jesús A. Sánchez-González <sup>a,\*</sup>, Carlos Echeverría Perez <sup>b</sup>, Ghenghis Bazán Aliaga <sup>b</sup>, Rodrigo Gabrielli González <sup>b</sup>, Kevin González Haro <sup>b</sup>, Damper Acosta Chinchayhuara <sup>b</sup>, Branny Velásquez Acosta <sup>b</sup>

a. Departamento de Ciencias Agroindustriales (Universidad Nacional de Trujillo) Av. Juan Pablo II s/n Trujillo Perú

(\* [jsanchezg@unitru.edu.pe](mailto:jsanchezg@unitru.edu.pe))

b. Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de Trujillo) Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo Perú

Recibido 18 Noviembre 2014; Aceptado 10 Diciembre 2014

### RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del tamaño de perlas de alginato ( $4,596 \pm 0.452$  y  $2,532 \pm 0.294$  mm de diámetro) y la concentración de alginato de sodio (3%, 3,5%, 4%) en la difusividad efectiva en células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de alcohol en mosto de *Vitis vinífera* variedad cardinal con biorreactores estáticos. Se utilizó un diseño factorial  $2 \times 3$ , con 3 repeticiones y dos factores: tamaño de las perlas de alginato y concentración de alginato de sodio y como variables dependientes: el consumo de azúcar, producción de alcohol, rendimiento de producción de alcohol respecto al sustrato y difusividad efectiva en las perlas. Se usó un biorreactor simple estático, sin aireación, para un volumen de 1000 ml de mosto. Con una relación de 1,8% de volumen de perlas respecto al mosto. A menor tamaño de las perlas y concentración de alginato se obtuvo la mejor producción y rendimiento de alcohol. La difusividad efectiva se evaluó para  $F_0$  entre 0.018 y 0.19 que representa un intervalo de 48 a 84 horas obteniéndose una mayor difusividad en las perlas de mayor tamaño.

**Palabras clave:** Difusividad efectiva, fermentación, levaduras inmovilizadas, biorreactor

### ABSTRACT

In the present investigation the effect of the size of alginate beads ( $4.596 \pm 0.452$  and  $2.532 \pm 0.294$  mm in diameter) and the concentration of sodium alginate (3%, 3.5%, 4%) was evaluated in the diffusivity effective in *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in alcohol production must cardinal variety of *Vitis vinifera* with static bioreactors. Size of the alginate beads and sodium alginate concentration and dependent variables: the consumption of sugar, alcohol production, alcohol production performance relative to the substrate one  $2 \times 3$  factorial design with 3 replications was used and two factors effective diffusivity and pearls. A simple static bioreactor, without aeration for a volume of 1000 ml was used wort. With a ratio of 1.8% relative to the bead volume wort. A smaller concentration of alginate beads and improved production and alcohol yield was obtained. Effective diffusivity was assessed for between 0.018 and 0.19  $F_0$  representing an interval from 48 to 84 hours in obtaining greater diffusivity larger beads.

**Keywords:** Effective diffusivity, fermentation, immobilized yeast, bioreactor.

## 1. Introducción

El vino es una bebida antigua conocida extendida por todo el mundo. Tuvo un papel importante en las antiguas civilizaciones y llegó a nuestros días no con menos importancia. Las uvas se utilizan en los tiempos antiguos, según ha confirmado el hallazgo de una instalación para la vinificación en el territorio de Armenia que data de alrededor de 4000 aC (Barnard et al., 2011). En 2011, según las estadísticas de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2012),  $7.6 \times 10^6$  hectáreas de vides, permite la producción de  $267 \times 10^8$  L de vino en todo el mundo. Tradicionalmente, la fermentación del mosto se inicia de manera espontánea por la acción de la levadura natural que cubre la superficie de las uvas. La mayoría de las cepas de levadura de la biomasa no son tolerantes al etanol y por esta razón, durante una fermentación espontánea hay una sucesión de organismos que prevalece en todo el proceso.

A pesar de que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está presente en las uvas y en el mosto fresco en porcentajes bajos, se considera ser el principal factor durante la fermentación alcohólica (Swiegers et al., 2005). Sin embargo, durante la elaboración del vino, otros géneros de levaduras están presentes y pueden contribuir, positiva o negativamente, a la calidad final del vino.

La utilización de células inmovilizadas ha sido considerada un método eficaz en el aumento de producción de metabolitos por parte de las células por largos períodos de tiempo, aumenta la estabilidad de las células, permite ventajas en la configuración de reactores entre las que se incluyen un rápido control del pH y la temperatura,

permite mantener altas concentraciones de células y no requiere sistemas de agitación. En general disminuye de manera considerable los costos de producción (Trevan et al., 1993).

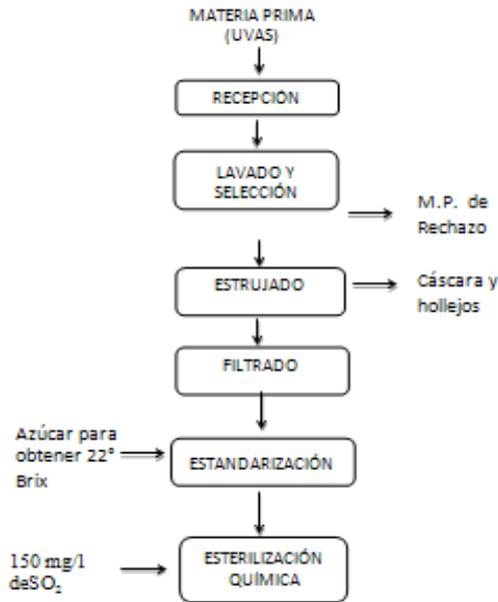
El gel de alginato de sodio es el material más comúnmente utilizado para el atrapamiento de células en la industria alimentaria (Strehaiano et al., 2006). Las células en la superficie de las perlas de alginato pueden ser liberadas de las cuentas y debido a este hecho, se propuso en los años 80 hacer una capa externa de alginato estéril y producir perlas de doble capa de alginato.

## 2. Materiales y Métodos

### Inmovilización de levaduras

Se utilizó la técnica de inmovilización de células por atrapamiento en perlas de alginato, introducida por Hackel et al. (1975). Se usó fermento biológico seco instantáneo (levadura), *S. cerevisiae*, el cual se agregó 10 g a 100 ml de agua destilada. La matriz de alginato de sodio se preparó al 3.0%, 3.5% y 4.0% p/v. Para preparar esta solución se sometió la mezcla de alginato de sodio con agua destilada a calentamiento hasta obtener una mezcla uniforme y homogénea, dejándola enfriar. La solución de levaduras y de alginato de sodio se mezcló en relación 1:1.5. Esta mezcla se agitó hasta lograr uniformidad, posteriormente se formaron las perlas usando jeringas hipodérmicas con y sin aguja, con el objetivo de obtener dos tamaños de perlas; dejándose caer a una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2.0%, manteniéndolas en refrigeración por 24 horas. Finalmente, las perlas se lavaron con agua destilada estéril, para eliminar el exceso de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  y células no atrapadas, antes de ser utilizadas para el proceso de fermentación.

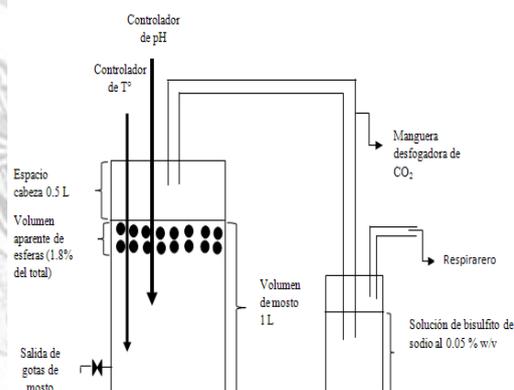
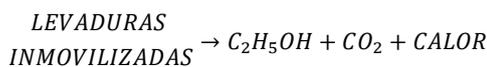
### Elaboración del mosto de uva



**Figura 1.** Flujograma para la obtención del mosto.

### Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor casero, con un volumen de trabajo de 1000 ml; a temperatura ambiente en estado estacionario. Para iniciar la fermentación se adicionó al medio un número determinado de células inmovilizadas las cuales fueron equivalentes al 1.8% de su volumen. La siguiente reacción representa el proceso de fermentación aeróbica de las levaduras inmovilizadas:



**Figura 2.** Biorreactor simple para producción de vino.

### Difusividad efectiva

Para determinar el coeficiente de difusividad efectiva se aplicó una de las fórmulas de Crank (1975), la cual se aplica para la forma geométrica de la esfera y para tiempos extensos. Este método consiste en medir la variación de la concentración del producto de reacción en la solución, para así obtener datos de velocidad en función del tiempo.

La concentración de glucosa en el mosto de uva varió debido a la difusión hacia las perlas hasta llegar al equilibrio de transferencia de masa. Este fenómeno fue estudiado y modelado por Crank (1975) a quien se debe el método de evaluación de difusividad efectiva.

Para la determinación de la difusividad efectiva se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\left(\frac{M_0^j - M_t^j}{M_0^j - M_\infty^j}\right) = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp[-\pi^2 n^2 Fo]$$

$$Fo = \frac{D_e \cdot t}{r^2}$$

Donde:

$M_0$ : Son los grados Brix (°Bx) iniciales del mosto.

$M_t$ : Son los grados Brix (°Bx) del mosto en función del tiempo.

$M_\infty$ : Son los grados Brix (°Bx) en equilibrio (para un tiempo infinito).

ferc: Es la función error complemento de Gauss.

$F_0$ : Es el módulo de Fourier.

$D_e$ : Es la difusividad efectiva.

$r$ : Es el radio de la perla.

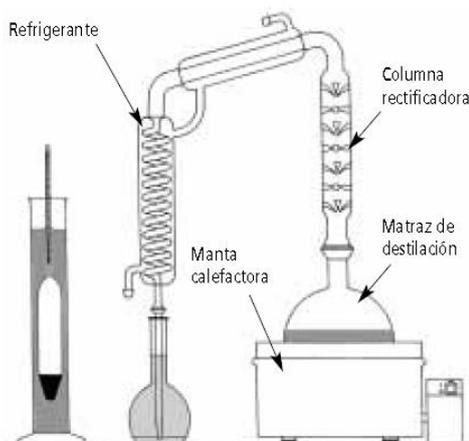
### Consumo de azúcar

Para poder calcular el consumo de azúcar se utilizó un refractómetro tradicional portátil de precisión de 0.5 °Brix; obteniéndose una medida inicial de 22°Brix, del mosto, luego se realizaron las medidas en un intervalo

de tiempo de aproximadamente 12 horas por un límite 118 horas.

### Porcentaje en volumen de alcohol

La concentración alcohólica de las muestra fue determinada por el método de destilación y alcoholómetro (Cazorla y Xirau, 2000). Se destilaron 150 ml de mosto, a 50 ml del destilado se le agregaron, usando una probeta, 50 ml de agua destilada. Se halló el porcentaje alcohólico del destilado utilizando un alcoholómetro referenciado a una temperatura de 15°C.



**Figura 3.** Equipo de destilación, para encontrar el grado alcohólico del vino.

El Grado alcohólico es grado de una mezcla hidroalcohólica pura, indicado por el alcoholómetro centesimal de Gay Lussac en una temperatura diferente a la de referencia. El alcoholómetro de Gay-Lussac se supone graduado a la temperatura de 15°C. Si al usarlo, aquella es de 15°±n, el número verdadero “x” de grados alcohólicos, siendo “g” los grados que indica el aparato es:

$$x = g \pm (0,4)n.$$

Para relacionar el porcentaje de alcohol en el vino se relaciona la cantidad de alcohol que tiene el destilado y el mosto usado en la destilación.

### Rendimiento de alcohol

Para determinar el rendimiento de alcohol a partir del sustrato consumido,

se sigue la ecuación dada por Monot; el cual la define como la cantidad de alcohol producido por sustrato consumido en las mismas unidades de tiempo (Crueger, 1993).

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de experimentos factoriales 2 y 3 factores. Este diseño incluye k = 2 factores o variables independientes (tamaño de perlas y concentración de alginato de sodio), una con tres niveles y la otra con dos niveles, se puede construir 3 × 2 combinaciones que dan lugar al diseño factorial 3 × 2. En la Tabla 1, se muestran los niveles de las variables independientes (“x” e “y”: perlas de 2,532± 0.294 y 4,596±0.452mm de diámetro respectivamente; “a”, “b” y “c”: concentraciones de alginato de sodio de 3.0, 3.5 y 4.0 % p/v respectivamente).

**Tabla 1.** Niveles utilizados en el diseño factorial 3 x 2 para las dos variables.

VARIABLES	CONCENTRACIONES DE ALGINATO %		
	a	B	c
TAMAÑO DE PERLAS			
x	ax	Bx	cx
y	ay	By	cy

Luego graficamos el comportamiento de las VD, en función de las VI, para ver el efecto significativo de éstas.

### 3. Resultados y Discusiones

#### Concentración de sólidos

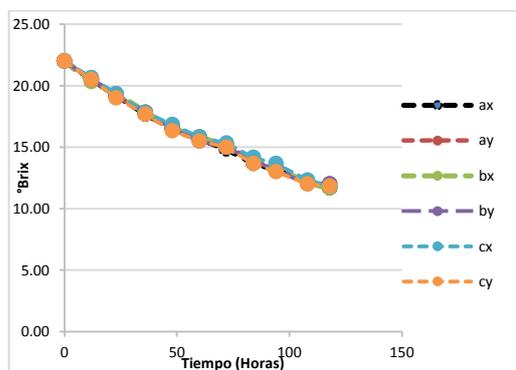
##### Grados Brix:

Desde el inicio de la experimentación en los biorreactores se determinó la variación de los grados °Brix respectivos, el promedio de estos valores a partir de las tres repeticiones se muestran en la tabla 2, y figura 4.

**Tabla 2:** Valores promedios de grados Brix en tres repeticiones, por levaduras inmovilizadas a concentraciones de 3.0%, 3.5% y 4.0% p/v de alginatos y dos tamaños de perlas, en biorreactores estáticos durante 118 horas de operación.

Tiempo(h)	ax	ay	Bx	by	cx	cy
0	22.00±0.000	22.00±0.000	22.00±0.000	22.00±0.000	22.00±0.000	22.00±0.000
12	20.50±0.000	20.50±0.000	20.33±0.289	20.50±0.000	20.67±0.289	20.50±0.000
23	19.17±0.289	19.17±0.289	19.33±0.289	19.33±0.289	19.33±0.289	19.00±0.000
36	17.67±0.289	17.83±0.289	17.83±0.289	17.83±0.289	17.83±0.289	17.67±0.289
48	16.50±0.500	16.50±0.000	16.50±0.500	16.50±0.000	16.83±0.289	16.33±0.289
60	15.67±0.289	15.83±0.289	15.83±0.289	15.50±0.000	15.83±0.289	15.50±0.000
72	14.83±0.577	15.17±0.289	15.00±0.500	15.00±0.000	15.33±0.289	15.00±0.000
84	13.67±0.289	13.83±0.289	13.83±0.289	13.83±0.289	14.17±0.577	13.67±0.289
94	13.17±0.289	13.33±0.289	13.17±0.289	13.17±0.289	13.67±0.577	13.00±0.000
108	12.17±0.289	12.17±0.289	12.17±0.289	12.00±0.000	12.33±0.289	12.00±0.000
118	11.67±0.289	12.00±0.000	11.67±0.577	12.00±0.000	11.83±0.289	11.83±0.289

El tratamiento que llega a obtener la más baja concentración en grados °Brix es el tratamiento ax y bx obteniendo un valor promedio al final de 118 horas de operación de 11.67°Brix.



**Figura 4.** Valores promedios de la variación de grados Brix en tres repeticiones experimentales en biorreactores estáticos con levaduras inmovilizadas a concentraciones de 3.0%, 3.5% y 4.0% p/v de alginatos y dos tamaños de perlas, en biorreactores estáticos durante 118 horas de operación.

### Consumos de azúcares

El consumo de azúcares totales expresados como grados Brix durante la operación de los biorreactores en 118 horas de operación, se muestran en la

tabla 3y una representación de estos en la figura 5.

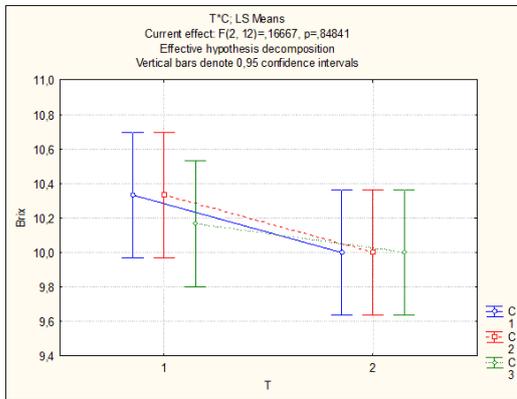
**Tabla 3:** Valores promedios de consumo de azúcar en tres repeticiones, por levaduras inmovilizadas a concentraciones de 3.0%, 3.5% y 4.0% p/v de alginatos y dos tamaños de perlas, en biorreactores estáticos durante 118 horas de operación.

Tamaño perlas	concentraciones		
	a	b	c
X	10.333±0.289	10.333±0.577	10.167±0.289
Y	10.000±0.000	10.000±0.000	10.000±0.000

Para trabajar, los datos obtenidos, en el programa de Statistica 7.0, se codificó 1 para los tamaños “x” (perlas pequeñas) y 2 para las “y” (perlas grandes); mientras que para el caso de las concentraciones se codificó de la misma manera 1, 2 y 3 para las concentraciones de “a” (3.0%), “b” (3.5%) y “c” (4.0%) respectivamente.

Como se aprecia en la Figura 5 para el caso del tamaño de perla pequeña (1), existe mayor consumo de azúcar en la concentración 1 y 2; mientras que para

el caso del tamaño de perla grande (2), existen igual o similar consumo de azúcar para las tres concentraciones.



**Figura 5.** Efecto de Interacción del tamaño y concentración de alginato de sodio en las perlas en el consumo de azúcar

Como se aprecia en la Figura 5 para el caso del tamaño de perla pequeña (1), existe mayor consumo de azúcar en la concentración 1 y 2; mientras que para el caso del tamaño de perla grande (2), existen igual o similar consumo de azúcar para las tres concentraciones.

**Productividad de alcohol**

Para ver si el tamaño de las perlas y las concentraciones de alginato tienen efecto significativo sobre la producción de alcohol, se realizó un ANOVA.

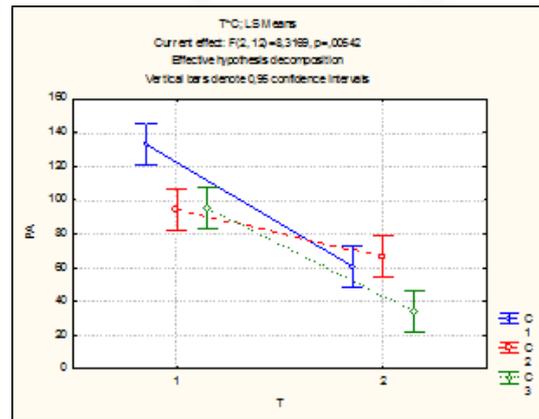
**Tabla 4.** Valores promedios de producción de alcohol en mL en tres repeticiones de perlas a diferentes concentraciones de alginato y tamaños de perlas, en 118 horas de fermentación.

Tamaño perlas	concentraciones		
	a	b	c
x	133.111±17.338	94.667±9.262	95.556±8.853
y	60.889±10.030	66.444±0.770	34.444±0.770

**Tabla 5.** Análisis de varianza de la productividad alcohólica del diseño factorial 3x2

PRODUCCIÓN ALCOHOL	SS	GL	MS	F	p
Intercepto	117666,4	1	117666,4	1246,205	1,71E-13
T	13050,1	1	13050,1	138,214	6,08E-08
C	3072,8	2	1536,4	16,272	3,82E-04
T*C	1570,6	2	785,3	8,317	5,42E-03
Error	1133,0	12	94,4		
Total	136492,9	18			

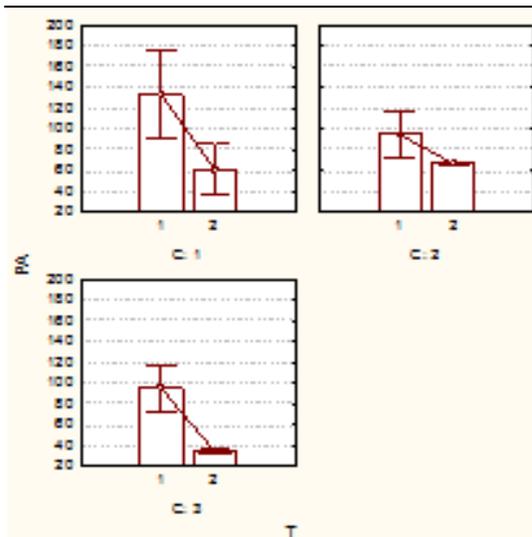
Como podemos ver: para el tamaño de perlas (T), la concentración de alginato (C) y la interacción T\*C,  $p < 0,05$ ; por lo tanto todas tienen efectos significativos en la producción de alcohol.



**Figura 6.** Efecto de interacción del tamaño de perlas y la concentración de alginato de sodio, en la producción de alcohol.

En la Figura 5 vemos que el tamaño 1 (perlas pequeñas) y en la Concentración de alginato 1 (3%), se tiene mayor producción de alcohol.

En la figura 7 podemos observar, que la mayor producción de alcohol se da en la Concentración 1 (3%) y el Tamaño 1 (perlas pequeñas), estando en un rango de 120 a 140 ml por litro de vino.



**Figura 7.** Producción de alcohol respecto a la Concentración de alginato y tamaño de perlas.

Para determinar la concentración de alcohol (% de alcohol en volumen), se recurrió al método de la medición con el alcoholímetro, ya que nos permite determinar de forma directa la cantidad de alcohol presente en una bebida fermentada por medio de la destilación, para pequeñas cantidades de muestras (50 ml) (Bondiac, 1980). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en perlas de alginato de sodio, produjo numéricamente la mayor cantidad de alcohol, 13.31% de alcohol, a una concentración de alginato del 3% y un tamaño de perlas pequeño, que representa un 0.1331 ml de alcohol/ml de mosto de uva. Mientras que a una concentración de alginato de sodio de 4% y al tamaño de perlas grandes se produjo numéricamente la menor cantidad de alcohol, la cual fue de 3.44% de alcohol, que representa un 0.0344 ml de alcohol/ml de mosto de uva. Todos estos valores fueron hallados durante 118 horas de operación.

Esto se debe teóricamente a la fisiología de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que degrada la glucosa por medio de una vía homofermentativa; y para crecer tan solo necesita un medio de cultivo sin presencia de alcohol (0%) (Ward, 1991).

Docentes de la Universidad Nacional de Kangnung en Korea; trabajando con *Saccharomyces cerevisiae*, alimentada a un medio hidrolizado de maíz y trigo, a 20 °Bx, durante 72 horas de operación, obtuvieron un rendimiento del 8% de alcohol (v/v) (Lee, 2000), esto permite corroborar que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* es una buena productora de alcohol. En comparación con nuestra investigación, se puede decir que la diferencia de producción de alcohol se debe principalmente a la mayor cantidad de grados Brix (°Bx) iniciales en el mosto de uva y al tiempo de operación.

Estadísticamente (Tabla N° 5), se llega a comprobar que existen efectos significativos del tamaño de perlas de alginato, la concentración de alginato de sodio y la interacción de ambos sobre la producción de alcohol en el mosto de uva.

Los problemas difusionales y, por tanto, el diámetro de perla también tienen influencia en la producción de etanol (Lin y Tanaka, 2006). Se han reportado problemas difusionales con diámetros mayores a 3,5 mm (Norton y D'Amore, 1994). Los resultados obtenidos en este estudio con *S. uvarum* (*S. bayanus*) coinciden con esto, ya que se registró un aumento en la producción y rendimiento de etanol hasta un diámetro de 3 mm, pero se obtuvo lo contrario a lo obtenido en un estudio semejante con *Saccharomyces cerevisiae* (Göksungur y Zorlu, 2001), en el cual la producción de etanol disminuyó a medida que se incrementó el diámetro de las perlas. En nuestra investigación, esto se comprueba en las Figuras 4 y 5, donde se aprecia una relación inversamente proporcional entre el tamaño de las perlas de alginato y la producción de alcohol en el mosto de uva.

### Rendimiento de alcohol

En la Tabla 6, muestran los resultados de los valores de rendimiento de alcohol en ml por sustrato consumido por perlas a diferentes concentraciones de

alginatos (a, b y c) y tamaños de perlas (X e Y) en 118 h.

**Tabla 6.** Valores promedio de rendimiento de alcohol en ml por sustrato consumido en tres repeticiones, por perlas a diferentes concentraciones de alginatos y tamaños de perlas (“x” e “y”) en 118 h.

Tamaño perlas	concentraciones		
	a	b	c
x	12.888±1.683	9.212±1.366	9.420±1.120
y	6.089±1.003	6.644±0.077	3.444±0.077

**Tabla 7.** ANOVA realizado a los 18 ensayos para evaluar el efecto significativo de los factores en el rendimiento de producción de alcohol.

RA	SS	GL	MS	F	P
Intercepto	1137.542	1	1137.542	979.0413	0.000000
T	117.693	1	117.693	101.2939	3.34E-07
C	28.023	2	14.012	12.0592	0.001345
T*C	15.098	2	7.549	6.4971	0.012248
Error	13.943	12	1.162		
Total	1312.298	18			

En la Tabla 7, se realizó un ANOVA para evaluar el rendimiento de producción de alcohol y el efecto de diferencias significativas entre el tamaño de perlas, concentración de alginato y su interacción de las cuales se puede observar que tanto el tamaño, concentración y su interacción tienen efecto significativo en el rendimiento de producción de alcohol, ya que sus valores de  $p < 0.05$ .

El rendimiento de producción de alcohol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 fue 2.4938 ml alcohol (Rebaza, 2002).

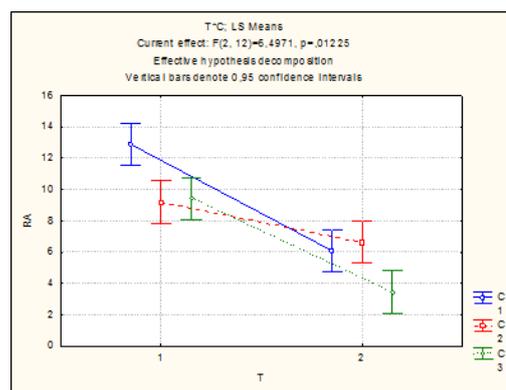
**Tabla 8.** Promedio de rendimientos de producción de alcohol en las 3 repeticiones.

Tratamientos	Consumo de azúcar		Producción		Rendimiento de alcohol
	°Brix	r <sub>s</sub>	ml	r <sub>p</sub>	
Ax	10.3300±0.289	0.0875	133.1333	1.1282	12.8880±1.683
Ay	10.0000±0.000	0.0847	60.8889	0.5160	6.0889±1.003
Bx	10.3300±0.577	0.0875	94.6667	0.8023	9.1642±1.366
By	10.0000±0.000	0.0847	66.4444	0.5631	6.6444±0.077
Cx	10.1700±0.289	0.0862	95.5556	0.8098	9.3958±1.120
Cy	10.1700±0.000	0.0862	34.4444	0.2919	3.3869±0.077

r<sub>p</sub>: La velocidad de producción de alcohol.

r<sub>s</sub>: Velocidad de consumo de azúcar.

El resultado obtenido por la bibliografía en comparación con los resultados que obtuvimos oscila entre 3.3869 y 12.888 ml de alcohol las cuales se muestran en la Tabla 8.



**Figura 8.** Efecto de interacción del tamaño de perlas y la concentración de alginato de sodio, en el rendimiento de producción de alcohol.

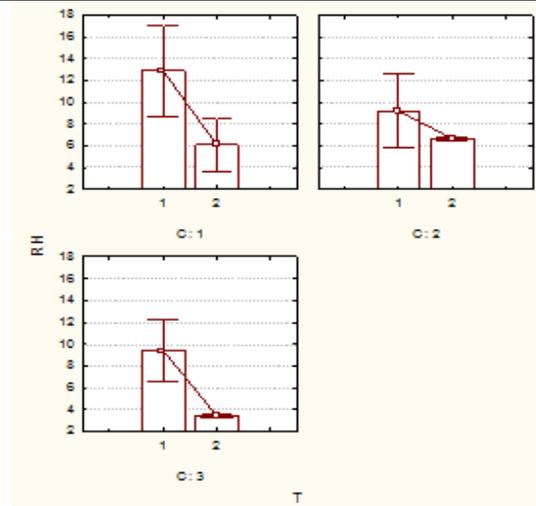
En la Figura 8, se puede observar en el tamaño de perlas pequeñas la que presenta mayor rendimiento de producción de alcohol es el de la

concentración 1 (3% de alginato), mientras que en el tamaño de perlas grandes la que presenta mayor rendimiento de producción de alcohol es el de la concentración 2 (3.5 % alginato) y se comparan el rendimiento de producción de alcohol entre los dos tamaños (1 y 2) el que tiene mayor rendimiento es el de 1, es decir, las perlas pequeñas.

Un estudio semejante con *Saccharomyces cerevisiae* (Göksungur *et al.*, 2001), en el cual el rendimiento alcohólico disminuyó a medida que se incrementó el diámetro de las perlas, obteniendo producciones de 42,7, 46,2 y 38,1 g/L<sup>-1</sup> para los diámetros 1,3 – 1,,7, 2,0 – 2,4 y 2,8 – 3,2 mm, respectivamente. Aunque al aumentar el tamaño de las perlas disminuye el área superficial disponible para la transferencia de masa de sustrato dentro y a través de las perlas (Göksungur *et al.*, 2001), se han reportado cambios fisiológicos y metabólicos relacionados con procesos de inmovilización celular.

En otros estudios realizados se menciona la importancia de la dureza y la rigidez de las perlas en relación con la concentración de alginato. Trabajando con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada con soluciones de alginato al 1,5, 2, 3 y 6 %, la solución de alginato al 2% resultó la más adecuada para evitar inconvenientes en la difusión de los nutrientes a altas tasas de actividad celular y con buenas características de resistencia del gel durante todo el tiempo de cultivo (Najfpour *et al.*, 2004).

En la Figura 9 se puede observar más específicamente el rendimiento de producción de alcohol en comparación con la Figura 8, ya que en la Figura 9, a la concentración 1 (C1) y el tamaño 2 le corresponden el mayor rendimiento de producción de alcohol, en la concentración 2 y el tamaño 1 también hubo mayor rendimiento de producción de alcohol, lo mismo ocurrió con la concentración 3.



**Figura 9.** Efecto las variables en el rendimiento de alcohol.

**Difusividad efectiva.**

Para encontrar la difusividad efectiva en las perlas se usó el modelo de Crank, para tiempos largos en la difusividad efectiva de esferas, especificado en la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{M_0^j - M_t^j}{M_0^j - M_\infty^j}\right) = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp[-\pi^2 n^2 Fo]$$

Asumiendo que:

$$Y = \left(\frac{M_0^j - M_t^j}{M_0^j - M_\infty^j}\right)$$

Se encontró que para Fo entre 0.018 y 0.19 que representa un intervalo de 48 a 84 horas, el valor del sumando de la ecuación de Crank no se considera, de tal manera la ecuación de Crank queda reducida a:

$$Y = 1 - \frac{6}{\pi^2} e^{-\pi^2 n^2 Fo}$$

Linealizando la ecuación anterior tenemos:

$$\ln(1 - Y) = \ln\left(\frac{6}{\pi^2}\right) - n^2 \pi^2 Fo$$

Sustituyendo el valor de Fo y n=1, a la ecuación linealizada obtenemos:

$$\ln(1 - Y) = \ln\left(\frac{6}{\pi^2}\right) - \frac{\pi^2 De}{r^2} t \dots\dots\dots (\alpha)$$

A la ecuación  $\alpha$ , la expresamos según la ecuación de la recta:

$$Y = A + BX$$

Donde la pendiente será:



$$B = \frac{\pi^2 De}{r^2}$$

De esta manera despejando la difusividad efectiva podemos calcular su valor para radios diferentes.

$$De = \frac{r^2 B}{\pi^2}$$

En la Tabla 9 se muestran valores de difusividad efectiva ( $D_e$ (m<sup>2</sup>/s)) de perlas a diferentes concentraciones de alginatos (3 (a), 3.5 (b) y 4 (c)%) y tamaños de perlas (“x” e “y”) en el tiempo de 48 a 84 horas de fermentación.

**Tabla 9.** Valores promedios de difusividad efectiva (m<sup>2</sup>/s) en tres repeticiones, en perlas.

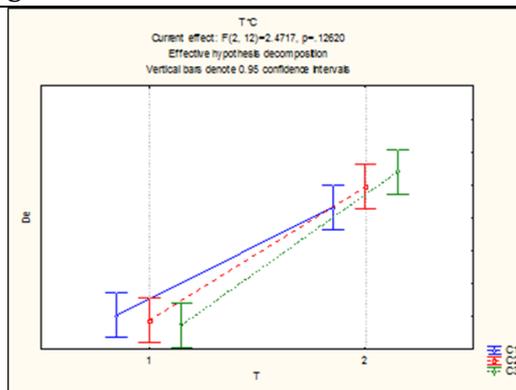
Tamaño perlas	concentraciones		
	a	b	c
X	(1.083±0.059)×10 <sup>-12</sup>	(9.944±1.35) ×10 <sup>-13</sup>	(9.160±1.45) ×10 <sup>-13</sup>
Y	(2.927±0.458) ×10 <sup>-12</sup>	(3.275±0.445) ×10 <sup>-12</sup>	(3.536±0.317) ×10 <sup>-12</sup>

**Tabla 10.** ANOVA realizado a los 18 ensayos para evaluar el efecto significativo de los factores en la difusividad efectiva en perlas.

De	SS	GL	MS	F	P
Intercepto	8.11E-23	1	8.11E-23	881.9799	1.33E-12
T	2.28E-23	1	2.28E-23	247.5684	2.25E-09
C	1.48E-25	2	7.42E-26	0.8076	0.468742
T*C	4.54E-25	2	2.27E-25	2.4717	0.120208
Error	1.10E-24	12	9.19E-26		
Total	1.06E-22	18			

Según la Tabla 11 se observa que solo el tamaño de perlas tiene efecto significativo ya que  $p < 0.05$ .

Según Vlasta (2006) las perlas fabricadas con alginato de sodio al 2% p/v se rompían rápidamente o no formaban perlas sino pequeños flóculos de alginato de sodio disperso.



**Figura 10.** Efecto de Interacción del tamaño de perlas y concentración de alginato de sodio, en la difusividad efectiva de perlas en un intervalo de 48 y 84 horas.

Aquellas conteniendo 2.5 % p/v, fueron muy poco resistentes y al cabo de algunas horas se rompieron dejando las levaduras dispersas en el sustrato. Para concentraciones de 3.5 y 4.0% p/v no hubo fermentación perceptible, por lo que su uso se descartó. Las perlas con 3% p/v de alginato de sodio fueron resistentes mecánicamente en el fermentador y, a la vez, permitieron la fermentación. En la Figura 8 para el menor tamaño de perlas la mayor difusividad efectiva se obtuvo en la concentración de 3% p/v.

Si bien el método de inmovilización de células por atrapamiento en geles tiene varias ventajas, posee también como desventajas la escasa permeabilidad a moléculas de sustrato con elevado peso molecular y, en general, limitaciones en la transferencia de materiales a las células.

La inmovilización de células por atrapamiento en gel tiene algunas limitaciones, principalmente referidas a las restricciones difusionales internas, por lo que el tamaño de perla es un parámetro importante por considerar. La estrategia más común para mejorar la transferencia interna de masa es reducir el diámetro de perla, lo cual conlleva una situación de compromiso de elegir el menor tamaño posible, manteniendo las características operativas de las perlas (Norton y D’Amore, 1994).

Un estudio semejante con *Saccharomyces cerevisiae* (Göksungur *et al.*, 2001), Estos cambios podrían atribuirse a una modificación en el entorno físico y químico de las células inmovilizadas, estrechamente asociados a limitaciones en transferencia de masa al interior del sistema, lo cual puede contrarrestarse por el empleo de monocapas celulares o trabajando a bajas densidades celulares (Norton y D'Amore, 1994).

Otras variables importantes en la inmovilización de levaduras para la producción de etanol incluyen el soporte de la inmovilización, del tipo de cultivo utilizado, el sistema de cultivo (cultivo en lote o cultivo continuo), la concentración y el tipo de azúcar, y la temperatura de fermentación.

Despejando la fórmula de difusividad másica por la fórmula de Fourier (Fo) se tiene que al aumentar el radio de las esferas hay una mayor difusividad, en la Figura 8 observamos que hay mayor difusividad en las perlas de mayor tamaño.

#### 4. Conclusiones

Se concluyó que no hay efecto significativo de las variables en el consumo de azúcar en el proceso de fermentación durante 118 horas de fermentación, pero se evaluó que a la concentración de alginato de 3% y menor tamaño de perlas se obtuvo una mayor producción y rendimiento de alcohol.

La concentración de alginato de sodio, no tuvo efecto significativo en la difusividad efectiva de las perlas, mientras que el tamaño sí, obteniendo una mayor difusividad en las perlas de mayor tamaño.

#### 5. Referencias

Barnard, H.; Dooley, A. N.; Areshian, G.; Gasparyan, B.; Faull, K. (2011). Chemical evidence for wine production around 4000

BCE in the Late Chalcolithic near Eastern Highlands. *Journal of Archaeological Science* 38: 977-984.

Bondiac, E. (1980). Elaboración de vinos. Editorial SINTESIS. Barcelona – España. Cap. 6.

Cazorla, J.; Xirau, M. (2000). Métodos Para determinación del grado alcohólico de vino. Editorial Panreac química, S.A., España.

Crueger, W; Cruger A. (1993). Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial acribia, S.A. Zaragoza-España. Cap. 5 y 7.

Göksungur, Y., Zorlu, N. (2001). Production of ethanol from beet molasses by ca – alginate immobilized yeast cells in a packed – bed bioreactor. *Turkish Journal Biology* 25: 265-275.

Hackel, U., Klein, J., Magnet, R., Wagner, F. (1975). Immobilization technique. *European journal of applied microbiology biotechnology* N° 1, 1975, 191-293.

Kriel, A. (2009). Manual de Etnología teórico-práctica. Editorial acribia S.A Zaragoza. España.

Lee, B. (2000). Fundamentos de biotecnología de alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza – España. Pag. 77 – 87.

Lin, Y., Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 627-642.

Najafpour, G., Habibollah, Y., Syahidah, K. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 92: 251-260.

Norton, S., D'amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 365-375.

OIV. (2012). Statistical report o world vitiviniculture 2012. París: International Organization of Vine and Wine.

Rebaza, J. (2002). Tasa de producción alcohólica en mosto de *Vitis Vinífera* variedad cardinal por *Sacharomyces cerevisiae* MIT-L51 y *Zymomonasmobilis* CECT-596 en biorreactores estáticos y agitados. Trujillo, Perú.

Strehaiano, P.; Ramon-Portugal, F.; Taillander, P. (2006). Yeasts as biocatalysts. Editorial Querol, & G.H. Fleet. Berlín, Alemania.

- Swiegers, J.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 139-173.
- Treva, M.D.; Poltorak, O.M.; Chukhrai, E.S. Estabilidad en enzimas y células. *Biología molecular y biotecnología*. Editorial acribia S.A. Zaragoza, España.
- Valladares, B. (1900), *Tratado de física elemental*. Editorial Imprenta del Corazón de Jesús. Bilbao, España.
- Vlasta, V. (2006). *Inmovilización levaduras y fermentación de sustratos concentrados de melaza*. Editorial Longman. Chicago: Estados Unidos.
- Ward, O. (1991). *Biología de fermentación*. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza – España. Cap. 2,3,7 y 8.g

Agroind Sci  
Agroind Sci  
AGROINDUSTRIAL

