

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

*Continuous ethanol production in a fixed bed reactor using immobilized cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in calcium alginate*

Resumen

La necesidad de incrementar las fuentes bioenergéticas y optimizar su producción ha conllevado que se empleen nuevas tecnologías como el de la inmovilización de células, que actualmente permite producir etanol inmovilizando levaduras. El objetivo del estudio fue la producción continua de etanol en un biorreactor de lecho fijo usando un sistema de células de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en alginato de calcio y la identificación de variables que tuvieron gran influencia en el proceso. Se empleó el diseño factorial $N=2^K$, donde $K=3$ representa las variables concentración de sacarosa "S", pH y temperatura "T", y el programa estadístico Statgraphics versión 5.1. Se mantuvo constante el caudal de alimentación de sustrato ($Q=72$ mL/h) y el tiempo de residencia hidráulica (TRH=8,33 h). Los resultados fueron $0,13\text{ h}^{-1}$ de velocidad específica de crecimiento máxima de células de levaduras libres y $0,017\text{ h}^{-1}$ de células inmovilizadas en alginato de calcio, 14,4 g/l de etanol como mayor concentración de producto cuando $S=100$ g/l, $\text{pH}=4,6$ y $T=25^\circ\text{C}$, y 3,20 g/l de etanol como la menor concentración cuando $S=200$ g/l; pH de 5,6 y $T=35^\circ\text{C}$. Según el análisis de varianza, el rendimiento de la producción de etanol estuvo grandemente influenciado por la concentración de sustrato y la temperatura, el pH tuvo una influencia poco significativa.

Palabras clave: inmovilización, tiempo de residencia, biorreactor, *Saccharomyces cerevisiae*, alginato de calcio

Abstract

*The need to increase bioenergy sources and optimize their production has led to the use of new technologies such as cell immobilization, which currently allows the production of ethanol by immobilizing yeast. The objective of the study was the continuous production of ethanol in a fixed bed bioreactor using a system of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in calcium alginate and the identification of variables that had a great influence on the process. The $N=2^K$ factorial design was used; where $K=3$ represents the variables sucrose concentration "S", pH and temperature "T", and the statistical program Statgraphics version 5.1. The substrate feed flow rate ($Q=72$ mL/h) and hydraulic residence time (HRT=8.33 h) were kept constant. The results were 0.13 h^{-1} maximum specific growth rate of free yeast cells and 0.017 h^{-1} of cells immobilized on calcium alginate, 14.4 g/l ethanol as the highest product concentration when $S=100$ g/l, $\text{pH}=4.6$ and $T=25^\circ\text{C}$, and 3.20 g/l ethanol as the lowest concentration when $S=200$ g/l; pH of 5.6 and $T=35^\circ\text{C}$. According to the analysis of variance, the ethanol production yield was greatly influenced by substrate concentration and temperature, pH had little significant influence.*

Keywords: immobilization, residence time, bioreactor, *Saccharomyces cerevisiae*, calcium alginate

Artículo Original

Carlos Tito Vargas^{1*}
Anacelly Valera López²

¹Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.
<https://orcid.org/0000-0002-3005-809X>

²Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.
<https://orcid.org/0000-0002-6667-3043>

Correspondencia:

*ctitov@unjbg.edu.pe

Recibido: 9/11/2023

Aceptado: 13/12/2023

Introducción

La producción de etanol se realiza por un proceso metabólico, en el cual se utiliza un conjunto de enzimas que transforman el azúcar en etanol, a través de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof. La fermentación continua utiliza un sistema de reactores completamente agitados colocados en cascada o reactores tubulares de lecho fijo. Este tipo de fermentación elimina la etapa de carga del sustrato y descarga del producto del fermentador, aumentando los rendimientos y productividades del proceso (Quinteros, 1981).

A través del proceso de inmovilización (Nuñez & Lema, 1987) (Yarleque *et al.*, 1993), las células atrapadas dentro de un soporte de material inerte (manteniendo su actividad) mejoran la producción y los productos pueden ser rápidamente separados del biocatalizador. Cuando se utiliza levaduras inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en alginato de calcio en un reactor tubular de lecho fijo, se produce etanol continuamente. En este tipo de fermentación se carga una sola vez las levaduras inmovilizadas al reactor del lecho fijo. Constantemente se alimenta el sustrato al fermentador y continuamente se produce etanol (Prescott & Gordon, 1986; Pérez, 1994). La fermentación del etanol realizada por levaduras, utiliza un ciclo de reacciones bioquímicas para transformar el sustrato (sacarosa) en etanol. Este ciclo se divide en etapas de oxidación y de reducción. La primera se lleva a cabo catalizando el sustrato hasta piruvato, en presencia de oxígeno, y la segunda transforma el piruvato hasta etanol, que es una reacción anaeróbica (Vogt, 1986).

La levadura que crece en medios sólidos presenta un aspecto característico. Las colonias jóvenes son siempre húmedas y algo viscosas de color blanquecinas, cremosas o rosadas. Al envejecer algunas de estas colonias cambian poco, pero otras se tornan secas y rugosas. Casi todas las especies crecen en forma de agregados sueltos de células aisladas que pueden ser globosas, ovoides o alargadas y casi cilíndricas. Cuando crecen vigorosamente en cultivos, forman a menudo cadenas de células alargadas, por las que se les llama pseudomicelio. En casi todas las especies de interés industrial, el modo habitual de reproducción vegetativa es por gemación. Su metabolismo aerobio los capacita para oxidar completamente una cierta fracción del sustrato y extraer así la máxima energía para convertir el resto del sustrato en masa celular. Las vías bioquímicas que utiliza son glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria. En el metabolismo anaerobio no interviene la cadena respiratoria. En la industria, sin embargo, se suele denominar fermentación. Las fermentaciones son propias de los microorganismos como ciertas bacterias y levaduras, y es un proceso catabólico en el cual tanto el dador como el aceptor final de electrones son compuestos orgánicos. Generalmente, estos dos compuestos son metabolitos de un único sustrato que durante el proceso se escinden, uno que actúa como dador de hidrógeno (se oxida) y otro que actúa como aceptor final de H^+ .

Las células pueden ser inmovilizadas por entrecruzamiento, adsorción y atrapamiento, en este último la célula se localiza dentro de la red espacial de una matriz polimérica o de una membrana de forma que se evite la liberación de la célula sin impedir el ingreso de sustrato ni la salida de producto (Wiseman, 1986). El atrapamiento de la célula dentro de los espacios intersticiales de una matriz polimérica es uno de los principales métodos empleados. Entre los polímeros utilizados se mencionan la poliacrilamida, el alginato, el gel de sílice y la gelatina (Park & Chiang, 2000). Las células inmovilizadas para ejercer su actividad son colocadas dentro de biorreactores los cuales son recipientes en donde se lleva a cabo la reacción catalizada por las células. El papel que cumplen es el de obtener un producto específico a una velocidad dada a partir de unos reactantes concretos y con un costo mínimo, se diferencian de los reactores químicos, en que trabajan a temperaturas y presiones bajas y comparativamente consumen o generan poca energía durante la reacción (Wiseman, 1991).

Los biorreactores se clasifican en homogéneos, con una sola fase o heterogéneos si coexisten varias fases en las que frecuentemente hay un sustrato líquido continuo y otro sólido inmovilizado que es la fase catalítica. También, se clasifican según sea la reacción, en forma continua o discontinua y como reactores abiertos o cerrados. Los continuos se caracterizan porque se le suministra sustrato a la misma velocidad con que se evacua el contenido del reactor, es decir, no hay acumulación del producto dentro del reactor. Existen los continuos del tipo tanque con agitación, son versátiles, baratos y particularmente usados en las reacciones de fase líquida. El volumen contenido está tan bien mezclado que la concentración de los reactantes es uniforme en todo el recipiente de modo que el flujo de salida del reactor tiene la misma concentración que la mezcla que permanece en el tanque agitado. Se mantienen homogéneos mediante agitación mecánica que provoca una rápida dispersión y mezclado de los materiales inyectados, consiguiéndose una rápida transferencia de calor para mantener la temperatura, así como una rápida disolución de los gases burbujeados tales como el oxígeno. La eficiencia de tales procesos depende de la cantidad de energía que se transmite en el medio y el agitador es en esencia el mecanismo que lo realiza (Wiseman, 1986).

La concentración de etanol obtenido en biorreactores puede ser medido por el método de Picnometría, que requiere la determinación de masa del picnómetro vacío, masa del picnómetro con agua y la masa del picnómetro con la muestra problema teniendo en cuenta que las mediciones se realizan a una determinada temperatura. En las mediciones se requiere utilizar una balanza analítica de cuatro dígitos. Se trata de un método simple, pero que requiere de la comprensión de sus fundamentos. En la determinación de la densidad de una sustancia líquida es importante tener en cuenta que el volumen varía con la variación de la temperatura (Atares, 2011).

En este trabajo el objetivo fue la producción continua de etanol en un biorreactor de lecho fijo usando un sistema de células de levaduras inmovilizadas en alginato de calcio y la identificación de variables con gran influencia en el proceso.

Material y métodos

Aislamiento, identificación y producción de biomasa de levaduras

Se realizó el aislamiento de levadura a partir de una muestra comercial de levadura, fue sembrada por estrías en agar Sabouraud, y se incubó a 30 °C durante 24 h. Las colonias típicas que se desarrollaron, se replicaron nuevamente en una placa Petri con agar Sabouraud y después de ser incubadas se guardaron en tubos de ensayo con tapa rosca a 4 °C para su identificación, que se realizó estudiando el aspecto de colonia, celular y bioquímico. La producción de levaduras se hizo a través de un biorreactor discontinuo, utilizando como medio de propagación el caldo sacarosado al 6%, previo a su inoculación, la levadura se sembró en un matraz con 100 mL de medio de cultivo e incubó a 30 °C por 24 h. Luego, se inoculó en el biorreactor discontinuo de 1 L de capacidad con aireación y agitación constante. Se cosechó las levaduras cuando la fermentación estuvo en su crecimiento exponencial máximo y centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, desechando el sobrenadante, lavando el sedimento tres veces con una solución de NaCl al 0,9% y centrifugándolo nuevamente para la obtención de las levaduras que se almacenaron a 4 °C en buffer acetato al 0,1 M con un pH de 4,5 para su conservación.

Inmovilización celular

El proceso de inmovilización de la levadura se realizó utilizando el método de atrapado en gel, usando como soporte el alginato de sodio, en donde las células quedaron inmersas en la matriz del soporte, para lo cual se disolvió 7,5% de alginato de sodio en un vaso de precipitado con 200 mL de agua destilada en ebullición, se homogeneizó el alginato y se enfrió hasta 40 °C, se disolvió 9% de levaduras en 100 mL de agua destilada dentro de un Beaker para obtener una suspensión celular que se llevó a baño maría hasta una temperatura de 40 °C. Se mezclaron y homogeneizaron ambos preparados, vertiendo la suspensión de levaduras en el vaso de precipitación que contenía la solución de alginato de sodio y con una bagueta de vidrio, manteniendo la mezcla a 40 °C en baño maría en todo el proceso. La mezcla se dejó caer gota a gota desde una jeringa de vidrio de 25 mL de capacidad con una aguja N.º 21 (al cual se le acortó el largo de la aguja) previo cargado sobre una solución fría de 300 ml de CaCl₂ al 1,5% en constante agitación. Las esferas producidas se almacenaron a 4 °C con la solución de CaCl₂ al 1,5% durante 2 h para darle mayor consistencia a las esferas, luego se lavó con agua destilada y se almacenó a 4 °C en buffer acetato con un pH de 4,5.

Proceso de producción de etanol

Para cada proceso de fermentación de etanol, se realizó una esterilización del biorreactor con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y posteriores lavados con agua destilada estéril. El medio de fermentación (sacarosa, MgSO₄·7H₂O y KH₂PO₄) se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C. Se inició la alimentación continua del medio de fermentación en forma descendente haciendo la salida del producto por rebose en forma continua (fermentación continua) y viendo que la concentración del producto o de la sacarosa remanente permanecieran constantes como evidencia de que se hubo alcanzado el estado estacionario, siendo en este momento que se tomó una muestra para determinar la concentración de etanol por el método del picnómetro. La producción de etanol se empezó a obtener cuando se hizo circular un flujo de medio de fermentación a través de las esferas con levaduras inmovilizadas, por lo cual el sustrato se difundió al interior de las esferas y levaduras para producirse la transformación del azúcar en etanol, que luego se difundió hacia el medio de fermentación. La producción de etanol se realizó variando la concentración de sacarosa (S), la temperatura (T) y el pH mediante un diseño experimental, manteniendo constante el tiempo de residencia hidráulico de 8,33h y el volumen de 300 mL de levaduras inmovilizadas al 3% (Montgomery, 1991; Palacios, 1997). El biorreactor diseñado y construido fue de vidrio borosilicatado, provisto de una chaqueta por el cual pudo circular agua caliente o fría con un caudal de 5,7 L/min.

Tabla 1
Características del biorreactor usado en la producción de etanol

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

Determinación de la concentración de etanol (método del picnómetro)

Se llenó el picnómetro de 25 mL de capacidad con la muestra (producto de la fermentación continua) y luego se agregó a un balón de destilación de 100 mL de capacidad. El picnómetro fue lavado tres veces con un total de 12,5 mL de agua destilada que fue agregado al balón hasta hacer un total de 37,5 mL. Este balón se llevó a destilar hasta obtener unos 22,5 mL que fue vertido en el picnómetro al cual se le aforó con agua destilada (25 mL), y llevado a baño maría a 20 °C durante 30 min, secado y pesado en una balanza con cuatro decimales. El peso obtenido en gramos (ml) fue llevado a la ecuación: $d = (m_1 - m) / (m_2 - m)$, donde m fue peso del picnómetro vacío, m_1 peso del picnómetro con el destilado y m_2 peso del picnómetro con agua. La densidad obtenida con esta ecuación sirvió para determinar la concentración de etanol (g/L).

Diseño experimental y análisis estadístico

Para la producción continua de etanol con células inmovilizadas, se realizó un planeamiento factorial de 2^3 con 8 experimentos y tres puntos centrales, estudiando la concentración de sacarosa (X_1)(A), pH (X_2)(B), la temperatura (X_3)(C) y el etanol (Y) obtenido en fermentación continua. Se tuvo como niveles centrales de concentración de sustrato, pH y temperatura a los valores de 150 g/l, 4,6 y 30 °C, respectivamente. Los parámetros máximos y mínimos de cada variable independiente se escogieron dentro de las posibilidades operacionales del proceso.

Tabla 2
Variables y niveles de variación del planeamiento experimental

Variabes	Codificada	Real	Nivel (-)	Nivel (+)
[Sacarosa] (g/L)	X_1 (A)	S	100	200
pH	X_2 (B)	pH	3,6	5,6
Temperatura (°C)	X_3 (C)	T	25	35

Para establecer la mejor producción de etanol, se tomó como referencia los datos de producción de etanol obtenidos según el diseño experimental y luego a través de análisis de variables y sus interacciones más importantes, mediante el diagrama de Pareto, diagrama de efecto de variables y el análisis de superficie de respuesta.

Resultados

Concentración de etanol

La siguiente tabla presenta los resultados del proceso de fermentación continua establecido según el diseño experimental, teniendo como valores máximos de concentración de etanol a 14,40 g/L y 10,10 g/L cuando se trabajó con variables de 100 g/L de sacarosa, 25 °C de temperatura y con pH de 3,6 y 5,6, respectivamente (tabla 3). El TRH fue de 8,33 h.

Tabla 3
*Producción de etanol a diferentes concentraciones de sustrato, pH y temperatura por fermentación continua de *S. cerevisiae* inmovilizado*

Experimento	Sustrato (g/l)(A)	pH (B)	Temperatura (°C) (C)	Etanol (g/l)
1	100	3,6	25	14,40
2	200	3,6	25	8,50
3	100	5,6	25	10,10
4	200	5,6	25	5,80
5	100	3,6	35	6,40
6	200	3,6	35	3,70
7	100	5,6	35	4,20
8	200	5,6	35	3,20
9	150	4,6	30	8,80
10	150	4,6	30	9,30
11	150	4,6	30	8,30

Efecto de las variables estudiadas según la figura estandarizada de Pareto

La importancia relativa de cada una de las variables se puede observar mediante el diagrama de Pareto, el cual representa gráficamente los efectos estandarizados de las variables y sus interacciones. En este diagrama se observan los efectos principales sobre la producción de etanol en forma gráfica; se evidencia que el mayor efecto lo tiene la temperatura seguido de la concentración de sustrato, del pH y sus interacciones. En cuanto a la línea vertical nos indica que los efectos de temperatura y concentración de sustrato son significativos estadísticamente (figura 1).

Figura 1

Efectos de las variables y su interacción en la producción de etanol (Pareto)

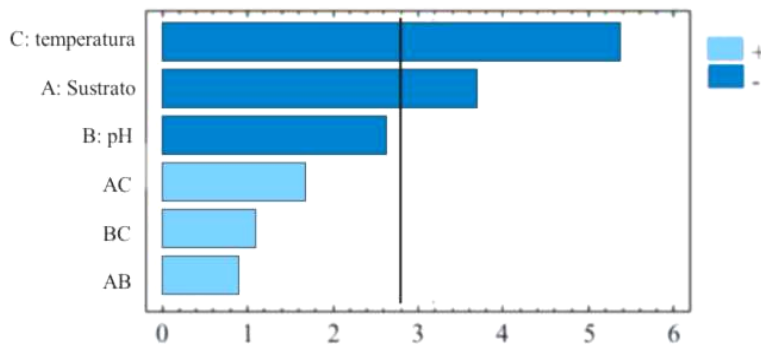


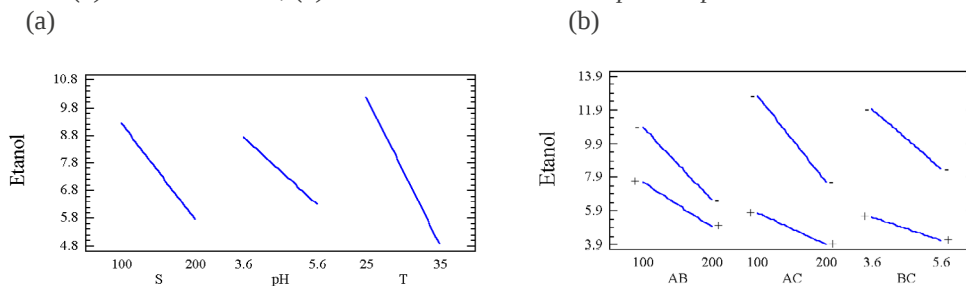
Figura N° 10: Gráfico de los efectos de las variables y su interacción en la producción de etanol

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

En la figura 2 se presentan líneas con pendientes negativas de los factores: sustrato, pH y temperatura, es decir, los tres factores presentan efectos en el proceso que son negativos en la producción de etanol. En cuanto a la presencia de líneas paralelas indican la ausencia de la interacción de las variables.

Figura 2

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

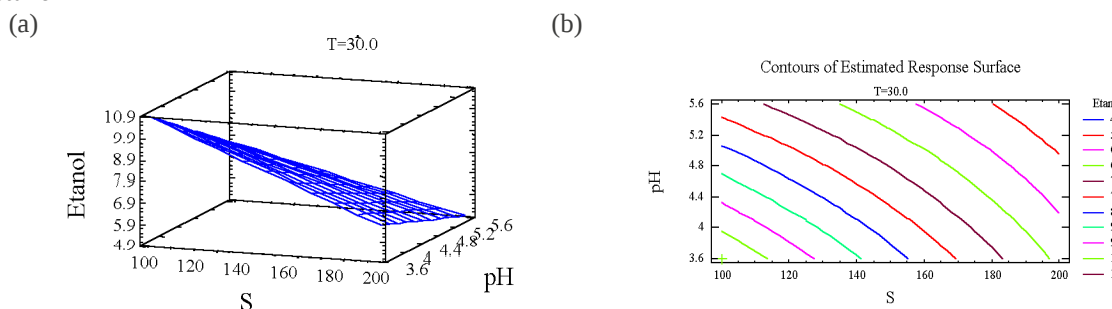


Efecto de las variables estudiadas según el análisis de superficie de respuesta

El gráfico inferior muestra el efecto de las variables de sustrato, pH y temperatura sobre la concentración de etanol en forma cúbica (superficie de respuesta) y en forma cuadrática (líneas de contorno) (figura 3).

Figura 2

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



Modelo matemático que representa a la experimentación de fermentación continua

Con base en los análisis estadísticos realizados computacionalmente (Statgraphics), se determinó que el modelo matemático de la mejor producción de etanol dado en la fermentación continua fue:

$$[\text{Etanol}] \text{ g/l} = 69,4 - 0,17A - 5,675B - 1,5C + 8,25 \times 10^{-3}AB + 3,25 \times 10^{-3}AC + 0,11BC$$

Donde, A es concentración de sacarosa, B es valor de pH, y C es valor de temperatura en °C.

Discusión

En la tabla 3 se observa que las mayores concentraciones de etanol fueron de 14,40 g/l y 10,10 g/l, cuando se utilizó concentración de sacarosa de 100 g/l, pH 3,6 y pH 5,6, y menores concentraciones, 3,70 g/l y 3,20 g/l, cuando fue la concentración de sacarosa 200 g/l, pH 3,6 y pH 5,6, con una temperatura de 35 °C. Por el análisis de varianza se encuentra que existe influencia de la concentración de sacarosa y la temperatura. A concentraciones de 200 g/l de sacarosa y 35 °C de temperatura el biocatalizador tiende a disminuir la producción del contenido alcohólico. La inhibición por sustrato es muy frecuente en este tipo de biorreactores (Atkinson, 1986). A temperaturas elevadas, las levaduras inmovilizadas tienden a inactivarse; esto aumenta cuando se eleva la temperatura (Wiseman, 1991). La fermentación continua con un pH establecido por un buffer con un rango de 3,6 y 5,6 no causó mayor variación. Según el análisis de varianza existen diferencias significativas en los tratamientos sustrato (sacarosa) y temperatura al ser los F. Exp. 13,27 y 31,16, respectivamente, valores mayores a la F. tabular de 7,71 con un 95 % de confianza; esto no sucedió con el pH, el cual presentó una F. experimental de 6,46, que es menor a la F. tabular, indicando así que no existió diferencia significativa, utilizando esta variable con un 95 % de confianza, es decir, que no hay mayor efecto usando pH mayor o menor. Esta afirmación se puede corroborar con el gráfico estandarizado de Pareto, que indica que el proceso es afectado mayormente por la variable temperatura, seguida por la variable sustrato, siendo el pH y las interacciones de las variables no significativas (figuras 1 y 2); asimismo, lo indicado por las figuras de los efectos y las líneas de contorno hace de ver que las variables presentan un efecto negativo, es decir, que a valores elevados, la producción de etanol disminuye.

El empleo del biorreactor continuo de lecho fijo, que tuvo un flujo de 72 ml/h, en el que recorrió un volumen de 600 ml, con un tiempo de residencia de 8,33 h, al mostrar una disminución en la producción esperada de alcohol, se explica, sea por diferentes causas como las restricciones disfuncionales (R.D.) externas e internas, la concentración de levaduras inmovilizadas, el tiempo de residencia empleado y los requerimientos de sustrato como medio de mantenimiento. Las R.D. externas en las reacciones con fase heterogénea como en el presente trabajo comprendieron los pasos de transporte del sustrato desde el seno del líquido a la superficie del biocatalizador, estas R.D. externas son consideradas en un medio en constante movimiento hacia una dirección descendente y las R.D. internas en este caso son importantes debido a que el sustrato que está en la superficie del biocatalizador se dirige al interior del soporte y de allí a las células de levaduras, donde se produce la reacción bioquímica para transformar el sustrato (sacarosa) en etanol y CO₂. La producción de etanol puede variar según el tiempo de residencia; puede ser que a menor tiempo de residencia, la difusión del sustrato a través del biocatalizador sea deficiente. Sin embargo, si el TRH fuera mayor, el contacto y reacción del sustrato con las células dentro del biocatalizador también sería mayor, dando como resultado una mayor concentración del producto etanol.

La concentración de levaduras inmovilizadas fue muy importante en la producción de etanol; a mayores concentraciones de levaduras se obtuvo mayor concentración de etanol; es de observar que la concentración del 3 % de levaduras inmovilizadas en gel de alginato de calcio produjo una concentración de 14,40 g/l de etanol. Este valor puede ser mejorado con un adecuado requerimiento de sustrato que contenga nitrógeno como medio de mantenimiento, para que así las levaduras inmovilizadas tengan una óptima producción porque la falta del medio de mantenimiento hace que las levaduras sufran un estrés disminuyendo así la producción de etanol. Otra forma que origina disminución es cuando hay problemas de arrastre de las células inmovilizadas que se ubicaron en la superficie del soporte esférico del biocatalizador.

Según el análisis de superficie de respuesta (figura 3), en la que se observa el efecto de las variables en la producción de etanol, también se alcanza una máxima producción usando valores de concentración de sustrato de 100 g/l, pH 3,6 y temperatura de 30 °C. Esto debido a que su efecto es altamente significativo, el cual se corrobora con el gráfico de líneas que indica que a valores mínimos del rango de las variables, se incrementa la producción de etanol; sin embargo, para la variable pH no es significativo y se puede utilizar el pH de 4,6 propuesto, según el análisis de varianza, por no ser significativo sobre la variable dependiente.

La producción de etanol determinada con uso del modelo matemático obtenido por el paquete estadístico Statgraphics, permite observar que la producción máxima de etanol de 14,8932 g/l, usando valores de rango mínimo, es un valor coherente con los valores reales de producción de etanol; por lo que, el modelo matemático obtenido entre otras aplicaciones puede ser usado para predecir la producción de etanol en niveles diferentes de los parámetros trabajados.

Conclusiones

La producción continua de etanol en un biorreactor de lecho fijo usando células de levaduras inmovilizadas fue de 14,40 g/L en una concentración de sacarosa 100 g/L; pH 3,6 y temperatura 25 °C; con parámetros cinéticos de residencia hidráulica de 8,33 y cinética de fermentación de $S_o = 147,9e^{-0,00224t}$.

El mayor efecto en la producción de etanol lo ejercieron la concentración de sacarosa y la temperatura, según el análisis de varianza con un 95 % de confianza, siendo el modelo matemático representativo de la producción de etanol (PE):

$PE = 69,4 - 0,17A - 5,675B - 1,5C + 8,25 \times 10^{-3}AB + 3,25 \times 10^{-3}AC + 0,11BC$; donde A es concentración de sacarosa, B es pH y C temperatura.

Referencias

- Atares, L. (2011). Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Atkinson, B. (1986). Reactores Bioquímicos. Editorial Reverte, S. A. Barcelona - España.
- Montgomery, D. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. S. A. de C. V. México D. F.
- Nuñez, M. J. & Lema, J. M. (1987). Cell immobilization: application to alcohol production. *Enzyme Microbiology Technology* 9(11), 642-651. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90121-9)
- Palacios, S. (1997). Diseño y Análisis de Experimentos Industriales. Editorial Latina Editores Oruro - Bolivia
- Park, J. k. & Chiang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology advances South Korea*. 18(4), 303-319. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00040-9](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00040-9)
- Pérez, S. (1994). Tópicos sobre Biotecnología. Editorial Libertad E.I.R.L. Lima - Perú.
- Prescott, S. & Gordon, D. (1986). Microbiología Industrial. Editorial Acribia. España.
- Quinteros, R. (1981). Ingeniería Bioquímica Teoría y aplicaciones. Editorial Alambra Mexicana-México.
- Vogt, E. (1986). El vino. Novena edición. Editorial Acribia. SA. Zaragoza, España.
- Wiseman, A. (1986). Principios de Biotecnología. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Wiseman, A. (1991). Manual de biotecnología de los enzimas. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Yarleque, J. y Col. (1993). Producción de etanol por bioconversión de pericarpio de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando células inmovilizadas de *S. Cerevisiae* ATCC 4126 - UNSCH. Ayacucho - Perú.