

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO-MATEMÁTICAS

“MAT. LUIS MANUEL RIVERA GUTIÉRREZ”

Maestría en Ciencias en Ingeniería Física



Determinación de la concentración de bioetanol en el proceso de fermentación por reflectometría en el ángulo crítico

Presenta:

LCFM. José Ángel Ramírez García

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Física

ASESORES:

Dra. Mary Carmen y Monserrat Peña Gomar

Dr. Gonzalo Viramontes Gamboa

Morelia Michoacán

Abril de 2018

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
Índice de figuras	4
Resumen	5
Abstract	6

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Antecedentes	7
1.1.1 Fermentación	7
1.1.2 Reflectometría cerca del ángulo crítico	10
1.2 Justificación.....	11
1.3 Objetivos	12
1.4 Descripción de la tesis.....	13

Capítulo 2

MARCO TEÓRICO	14
2.1 Proceso de fermentación	14
2.1.1 Limitaciones del proceso de fermentación	17
2.2 Técnicas de medición de etanol	18
2.2.1 Reflectometría	18
2.2.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	23
2.2.3 Refractometría ABBE	28

Capítulo 3

METODOLOGÍA	32
3.1 Equipo y material utilizado	32
3.2 Preparación de muestras.....	32
3.2.1 Preparación de muestras para calibración de etanol y glucosa en agua	32
3.2.2 Preparación de muestras para fermentación controlada	33

3.3 Calibración y medición de Reflectometría cerca del ángulo crítico.....	35
--	----

Capítulo 4

RESULTADOS.....43

4.1 Curvas de calibración con Abbe y reflectometría cerca del ángulo crítico	43
4.2 Variación de etanol y glucosa con la concentración	45
4.3 Fermentación.....	47
4.4 HPLC y RAC	50

Capítulo 5

CONCLUSIONES.....52

Anexo A53

Anexo B56

Anexo c57

Referencias.....58

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas y a la Maestría en Ciencias en Ingeniería Física.

A mis asesores de tesis el Dr. Gonzalo Viramontes Gamboa y la Dra. Mary Carmen y Monserrat Peña Gomar, a mis sinodales Dr. Luis Mariano Hernandez, Dr. Martin Sobral, Dr. Armando Lopez y la Dra. Guadalupe Garnica.

A toda mi familia por su apoyo incondicional, que gracias a ello fue posible dar este gran pasó en mi vida escolar y profesional.

A mi esposa Nancy, a mi hijo Amauri y a mi hija Nicol por su cariño y amor.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme la beca para realizar mi estudio de maestría.

A todos mis compañeros y amigos.

Índice de figuras

Figura 1: Concentración de glucosa y etanol vs tiempo obtenidos en una fermentación (das Neves, et al., 2006).....	9
Figura 2 Índice de refracción vs concentración de etanol (Francelli, et al., 2010).....	9
Figura 3 Índice de refracción vs concentración de sacarosa (Jaw Luen & Jien Neng, 2008)	10
Figura 4: Onda incidente cuyo campo E es a) normal al plano de incidencia y b) paralelo al plano de incidencia.....	21
Figura 5. Reflexión y transmisión de un haz incidente.....	22
Figura 6. Reflexión interna.....	23
Figura 7: Esquema de un cromatógrafo de líquidos	26
Figura 8: Equilibrio de distribución entre dos fases inmiscibles	26
Figura 9: Diagrama esquemático del sistema óptico del refractómetro ABBE	29
Figura 10: Ángulo crítico.....	31
Figura 11: Arreglo experimental para la fermentación controlada	35
Figura 12: Arreglo experimental de la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico	36
Figura 13: Configuración de un haz de luz que incide en un prisma semi-cilíndrico.....	37
Figura 14: Configuración de rayos incidentes en un prisma semi-cilíndrico.....	38
Figura 15: Trazo geométrico de la luz saliente del prisma semi-cilíndrico	38
Figura 16: Grafica de los puntos experimentales del agua y el ajuste de la ecuación de Fresnel para 589 nm.....	42
Figura 17: Comparación del índice de refracción obtenido a 589nm con un refractómetro ABBE y el reflectómetro cerca del ángulo crítico de la a) glucosa y b) etanol (Sobral & Peña-Gomar, 2015)	44
Figura 18: Reflectancia vs. ángulo de incidencia ($^{\circ}$) de mezclas agua destilada y concentraciones de glucosa.....	46
Figura 19: Reflectancia vs. ángulo de incidencia ($^{\circ}$) de mezclas de agua destilada y concentraciones de etanol	47
Figura 20: Reflectancia de muestras de una fermentación controlada a 589 nm.....	49
Figura 21: Concentración de glucosa y etanol vs. tiempo.....	51

RESUMEN

Durante el proceso de fermentación, los microorganismos consumen el azúcar de alguna biomasa (frutas, desechos agrícolas, residuos orgánicos, etc.), generando bioetanol durante el proceso. La concentración de bioetanol es normalmente medida por técnicas convencionales de alto costo, como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), además esta técnica requiere previa preparación de la muestra. En este trabajo de tesis se propone, el uso de la técnica de Reflectometría Espectroscopia cerca del Ángulo Crítico [(Sanchez Perez & Garcia Valenzuela, 2012)], para la determinación de la concentración de glucosa y etanol de muestras en un proceso de fermentación controlado. Usando una fuente de luz blanca (300 a 1000 nm), es posible obtener la curva de la reflectancia, para varias longitudes de onda, y determinar el índice de refracción debido a las distintas concentraciones de las muestras líquidas. Además se medirá la reflectancia de muestras preparadas con distintas concentraciones de etanol y glucosa diluidas en agua destilada, a fin de poder caracterizar la técnica. La fermentación controlada consiste en el caldo de cultivo PDB (Potato Dextrose Broth), levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* y dextrosa diluidos en agua destilada, colocada en agitación constante, a una temperatura de 30°C y a pH 5.5.

Palabras claves: Bioetanol, glucosa, HPLC, reflectometría, espectroscopia, fermentación.

ABSTRACT

During the fermentation process, microorganisms consume the sugar of a certain biomass (Fruits, agricultural waste, organic residue, etc) thus generating bio ethanol in the process. The concentration of bio ethanol is normally measured through high cost conventional techniques, such as high performance liquid chromatography (HPLC) this technique requires a prior sample preparation. In this thesis dissertation, the use of the spectroscopic reflectometry near the critic angle (Sanchez & Garcia Valenzuela, 2012) is proposed, for the determination of the levels of concentration of glucose and ethanol in samples in a controlled fermentation process. Using a white light source (300 a 1000 nm) it is possible to obtain the curve of the refractory for various wave lengths and to determine the refraction rate due to different concentrations of various samples. Furthermore, the refractory of samples with different concentrations of ethanol and glucose diluted in distilled in water will be measured with the purpose of determining the technique. Controlled fermentation consists of the culture broth PDB (Potato Dextrose Broth), commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* and dextrose diluted in distilled water, placed in constant stirring to a temperature of 30°C and to a 5.5 pH level.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Vivimos el inicio de un nuevo milenio, y presentamos la época más espectacular de la historia en cuanto a los logros tecnológicos y científicos. Basta, por ejemplo, pensar en los diversos métodos y formas sofisticadas, para medir elementos o compuestos químicos, cada vez de manera más precisa. Las energías renovables que están de moda en la actualidad, debido al incremento exponencial de la contaminación global, es estudiado desde diferentes vertientes, este es un claro ejemplo del incremento tecnológico, que se abordara en este trabajo de tesis.

En general, las fuentes de energía, se clasifican como renovables y no renovables. Entre las primeras se encuentra la energía eólica, hidráulica, geotérmica, maremotriz, solar y las energías de la biomasa (bioetanol, combustión directa de biomasa leñosa, combustión con gasificación, la pirolisis y la producción de gas por biodigestión anaeróbica). Dentro de las energías no renovables se encuentra el petróleo, el gas natural (metano) y la energía nuclear.

La biotecnología ofrece diversas opciones para la generación de energías renovables. Una de ellas es la producción de bioetanol, el cual se obtiene mediante fermentación. El sector energético es uno de los campos en los que se resalta la importancia de efectuar cambios y mejoras, la producción de bioetanol es un caso claro de ello.

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Fermentación*

La fermentación es un proceso natural que ocurre en determinados compuestos o elementos a partir de la acción de diferentes actores y que se podría simplificar como un proceso de oxidación incompleta. La fermentación es un proceso que se da en algunos alimentos tales como el pan, las bebidas alcohólicas, el yogurt, etc., y que tiene como agente principal a la levadura o a diferentes compuestos químicos que cumplen su acción. La fermentación es realizada por diferentes bacterias y microorganismos en medios anaeróbicos, es decir, en los que falta aire, por eso es un proceso de oxidación incompleta. Las bacterias o microorganismos, así también como las levaduras, se alimentan de algún tipo de componente natural y se multiplican, cambiando la composición del producto final. En el caso de las levaduras que se utiliza para hacer fermentar el pan, las mismas requieren la presencia de azúcar o glucosa ya que es esta la que se convierte en su alimento y les permite crecer en tamaño. Lo mismo sucede con la fermentación alcohólica que da como resultados bebidas como el vino o la cerveza.

El etanol se utiliza en la preparación de bebidas alcohólicas (vino, cerveza, etc.) [(Padín González & Díaz Fernandez, 2009)], combustible, desinfectante o disolvente de muchos compuestos orgánicos insolubles en agua y, sirve como materia prima para fabricar varios productos químicos.

Hay algunos otros trabajos donde se busca obtener bioetanol a partir de cascaras de naranja y piña [(Tejeda, et al., 2010)], agua Jacinto [(Chartchalermsri, et al., 2007)], desechos o subproductos de origen agrícola [(Vazquez & Dacosta, 2007)], sacarosa, caña de azúcar y melaza [(da Silva, et al., 2005), (Behera, et al., 2012)], residuos sólidos urbanos [(Cavinato, et al., 1990)], etc.

Das Neves et al. (2006) reporta las curvas del comportamiento de las concentraciones de glucosa y etanol como se muestra en la Figura 1, para muestras con bajo grado de harina de trigo (LG1 y LG2). Los resultados se obtienen de una fermentación con una duración de 24 horas, obteniendo como resultado final 38.6 g/L de etanol para LG1 y 24.9 g/L de etanol para LG2. Iniciando con una concentración de glucosa de 37 g/L y 26 g/L aproximadamente para LG1 y LG2 respectivamente.

En la Figura 2 se observa la gráfica del índice de refracción vs la concentración de etanol, elaborado por Francelli, et al, 2010, para concentraciones de mezclas de distintas

concentraciones de etanol y agua. En la cual se observa un comportamiento lineal para concentraciones bajas de etanol. De igual manera se observa un comportamiento lineal en la gráfica de la Figura 3, donde se muestra el índice de refracción contra la concentración de glucosa en agua, trabajo elaborado por Jaw Luen y Jien Neng, 2008.

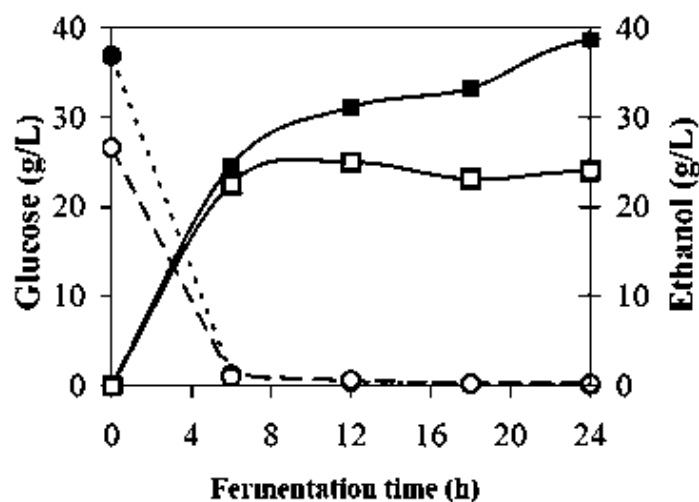


Figura 1: Concentración de glucosa y etanol vs tiempo obtenidos en una fermentación (das Neves, et al., 2006)

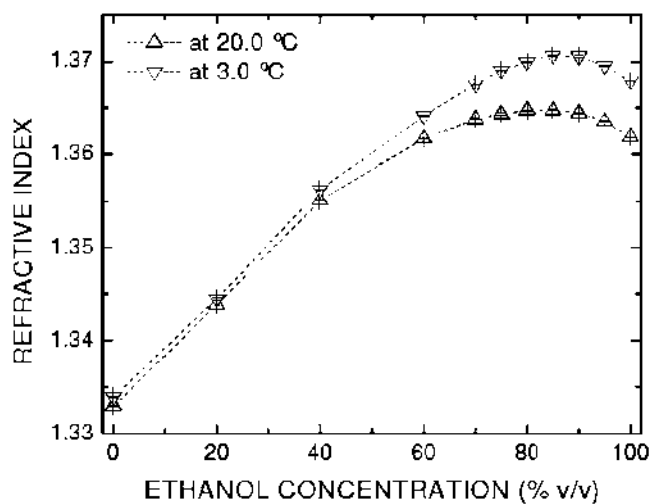


Figura 2 Índice de refacción vs concentración de etanol (Francelli, et al., 2010)

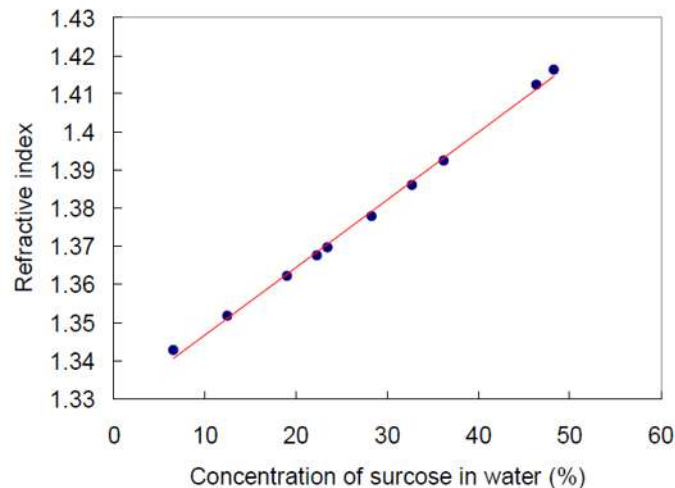


Figura 3 Índice de refracción vs concentración de sacarosa (Jaw Luen & Jien Neng, 2008)

1.1.2 Reflectometría cerca del ángulo crítico

La reflectometría cerca del ángulo crítico es un método muy importante, ya que permite detectar pequeños cambios en el índice de refracción dado por la concentración de soluciones líquidas, y debido a esa sensibilidad podemos medir los cambios de la concentración de las muestras. Algunos trabajos han sido realizados usando el método de reflectometría cerca del ángulo crítico para medir, por ejemplo: el índice de refracción complejo para ver la concentración de lignina [(J. Raty, 1997)] en una solución líquida; el índice de refracción dependiente de la concentración de malaquita verde o concentración de glucosa [(Yeh, 2008)]; la dependencia del índice de refracción con la concentración de NaCl y la temperatura [(Jia Rong Zhao, 2009)]; la relación entre el índice de refracción y los cambios en una solución electrolítica de la relación $\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^-$ [(Chang-Martinez, et al., 2009)]; la investigación teórica y experimental [(García-Valenzuela, et al., 1998)] de los pequeños cambios del índice de refracción para un haz gaussiano; la resolución del índice de refracción de la primera y segunda derivada de la reflectancia [(Peña-Gomar & García-Valenzuela, 2000)]; la reflectancia de una monocapa de partículas grandes adsorbidas sobre una superficie de vidrio [(Peña-Gomar, et al., 2006)]; la medición del tamaño de partículas grandes adsorbidas en una superficie de vidrio [(Alarcon-Oseguera, et al., 2009)], etc.

1.2 Justificación

Durante el proceso de fermentación, los microorganismos consumen el azúcar de algunas biomásas (frutas, desechos agrícolas, etc), generando bioetanol durante el proceso. La producción de bioetanol en la actualidad ha crecido considerablemente, debido a que se está usando como energía renovable, usada como combustible para disminuir la contaminación.

La utilización de biocarburantes presenta ventajas medioambientales, como es el hecho de que estos biocombustibles emiten entre un 40 y un 80% menos del dióxido de carbono que los convencionales, y no emiten dióxido de azufre (una sustancia que facilita la lluvia ácida) ni partículas y se disminuye la concentración de partículas en suspensión emitidas, de metales pesados, de monóxido de carbono, de hidrocarburos aromáticos policíclicos y de compuestos orgánicos volátiles. Por otro lado, el etanol presenta una importante alternativa como aditivo o como combustible automotriz; reporta un índice de octano superior al de la gasolina y tiene una presión de vapor inferior, resultando en menores emisiones evaporativas. Por esta razón, la producción de bioetanol en la actualidad ha crecido considerablemente.

A nivel mundial, aproximadamente el 90% de la energía consumida proviene de fuentes no renovables, por lo que estos recursos fósiles se están agotando aceleradamente y su tasa de disminución es cada vez mayor. Por lo anterior, desde hace algunos años, distintas naciones han incursionado en la búsqueda de fuentes alternas de energía.

No obstante ese esfuerzo de investigación, sólo se ha llegado a producir una cantidad de energía renovable que sustituye, aproximadamente, 10% de la energía total consumida, pero se estima que, a corto plazo, la producción de este tipo de energía tienda a aumentar.

En México, solo el 9.5% de la oferta total de energía es renovable, mientras que en Brasil el 38.7% de su energía es de fuentes renovables. Además, habrá que aclarar que la poca energía renovable que se produce en México, a diferencia de Brasil, es fundamentalmente hidráulica, solar y eólica, y no se utiliza hasta el momento la producción comercial de biocombustibles a partir de cultivos agrícolas o forestales [(Becerra Perez, s.f.)].

La medición de la concentración de bioetanol en un proceso de fermentación es normalmente realizada por técnicas convencionales de alto costo como cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), además esta técnica requiere preparación previa de la muestra y, otra desventaja es ser poco accesible para la mayoría de las personas. En esta tesis se utilizará la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico, con esta técnica se pretenden realizar análisis de medios turbios, sin preparación previa de la muestra. Por lo que, se tendrá la opción de medir la producción de bioetanol en un proceso de fermentación en tiempo real. Por el momento se utilizara esta técnica en soluciones que contienen solamente glucosa y etanol disueltos en agua destilada y, para muestras previamente filtradas recolectadas de una fermentación controlada.

Aunado a lo anterior, se hace mención que la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico, es de bajo costo y se pudiera incorporar a sistemas establecidos, para realizar mediciones inmediatas.

1.3 Objetivos

Objetivo General:

- Determinar la capacidad de la reflectometría cerca del ángulo crítico, para determinar en forma simultánea la concentración de etanol y glucosa para aplicarlo al estudio de un proceso de fermentación.

Objetivos Particulares:

- Aprender los fundamentos e implementación de la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico.
- Aplicar la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico para determinar concentración de etanol y glucosa en agua.
- Implementar un proceso de fermentación controlado.

1.4 Descripción de la tesis

Esta tesis está organizada de la siguiente forma. Se dividió en cinco capítulos: Capítulo 1, en este se muestra la importancia, justificación, y la descripción de la tesis. Capítulo 2, se muestra la revisión de literatura, donde se explica el proceso de fermentación y las técnicas de medición del etanol. Capítulo 3, se presenta el equipo y material utilizado, la metodología que se llevó a cabo en el laboratorio para la toma de muestras y análisis de la misma, así como la explicación de la calibración del sistema. Capítulo 4, consta de los resultados de la reflectometría cerca del ángulo crítico y los resultados del HPLC. Finalmente, en el Capítulo 5 se listan las conclusiones del trabajo.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Proceso de fermentación

El etanol es un líquido incoloro, inflamable con un punto de ebullición de 78°C, de olor característico y es el alcohol de menor toxicidad. Tiene aspecto similar al agua pero bastante más volátil que ésta. El etanol, también conocido como alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) o de grano, se obtiene mediante la fermentación a partir de cuatro tipos de materia prima: los productos ricos en sacarosa, como la caña de azúcar y la remolacha; fuentes ricas en almidón, como cereales (maíz, trigo, cebada etc.) y tubérculos (yuca, papa, etc.); hidrólisis de los materiales ricos en celulosa, como la madera y los residuos agrícolas; y mediante origen petroquímico de la hidrólisis del etileno.

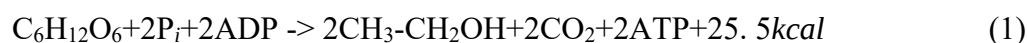
La fermentación es un proceso biológico catabólico de oxidación incompleta, que no requiere oxígeno, y el producto final es un compuesto orgánico, la fermentación es ampliamente utilizada por el hombre desde hace miles de años para la producción de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza. Según los productos finales, existen diversos tipos de fermentaciones, por ejemplo fermentación alcohólica [(Padín González & Díaz Fernandez, 2009), (Antonius, et al., 2006)], fermentación biocarburante [(Vazquez & Dacosta, 2007)], etc. Fue descubierta por Louis Pasteur, que la describió como “*la vie sans l’air*” (la vida sin aire). La fermentación es un proceso biológico, originada por la actividad de algunos microorganismos (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que procesan los hidratos de carbón (por regla general azúcares: como por ejemplo la glucosa, la fructuosa, la sacarosa, sirve como cualquier sustancia que tenga la forma empírica de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), es decir, que sea una hexosa.) para obtener como productos finales: un

alcohol en forma de etanol (cuya fórmula química es: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), y dióxido de carbón (CO_2) en forma de gas y una molécula de ATP (trifosfato de adenosina ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$)) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea como ya se mencionó, en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra, la cava, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible.

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno a partir de la glucosa. En el proceso las levaduras obtienen energía disociando las moléculas de glucosa y generan como desecho alcohol y dióxido de carbón. Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales, y constituyen en gran medida al sabor de los productos fermentados [(wikipedia, 2015)].

Las principales responsables de la fermentación son las levaduras. Las levaduras son cuerpos unicelulares (generalmente de forma esférica) de un tamaño que ronda de 2 a 4 μm y que están presentes de forma natural en algunos productos como las frutas, cereales y verduras. Son los que se denominan: organismos anaeróbicos facultativos, es decir, que pueden desarrollar sus funciones biológicas sin oxígeno. Existen diferentes especies de levaduras, entre las que se encuentran principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulaspora* y *Zymomonas mobilis*. Siendo las primeras, la especie de levadura usada con más frecuencia [(wikipedia, 2015)].

A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos, una forma esquemática de la reacción química (ecuación 1) de la fermentación alcohólica puede describirse como una glicólisis, de tal forma que puede verse como participa inicialmente una molécula de hexosa.



Se puede ver que la fermentación alcohólica es desde el punto de vista energético, una reacción exotérmica, donde se libera una cierta cantidad de energía. La fermentación

alcohólica produce gran cantidad de CO_2 , que es la que provoca que la cava (vino espumoso) tenga burbujas [(wikipedia, 2015)].

El éxito de una buena fermentación depende de la eficiencia del tratamiento preliminar: concentración de azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaeróbicas y la inmediata destilación del producto fermentado.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO_2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g. Los rendimientos en la industria varía entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984) [(wikipedia, 2015)].

La fermentación de tipo industrial está enfocada, en aumentar la eficiencia de los biorreactores, con el fin de obtener mejores resultados en cuanto a productos, empleando teorías de control, en las variables que determinan la eficiencia del proceso, como es la temperatura, contaminaciones, pH, niveles de alcohol, concentraciones del sustrato, biomasa producida entre otras.

El propio proceso de fermentación, conocido como la fase de incubación, es solamente una parte del ciclo. Un ciclo de fermentación completo suele incluir los pasos siguientes:

- Esterilización en vacío de tanque y conductos utilizando vapor directo
- Inyección
- Carga del caldo base
- Esterilización del material
- Preinoculación: entorno del tanque controlado
- Inoculación: inyección de una pequeña muestra del monocultivo
- Incubación: el propio proceso de fermentación
- Recogida: producto separado y listo para el proceso de extracción

2.1.1 Limitaciones del proceso de fermentación

En las limitaciones que surgen durante el proceso se puede enumerar algunos de los más importantes como son:

- **Concentración de etanol resultante**

Una de las principales limitaciones del proceso, es la resistencia de las levaduras a las concentraciones de etanol que se llegan a producir durante la fermentación, algunos microorganismos como el *Saccharomyces cerevisiae* pueden llegar a soportar hasta el 20 por ciento de concentración en volumen.

- **Acidez del substrato**

El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación ya que las levaduras se encuentran afectadas claramente por el ambiente, bien sea alcalino o ácido. Por regla general el funcionamiento de las levaduras está en un rango que va aproximadamente desde 3.5 a 5.5 pH

- **Concentración de azúcares**

La concentración excesiva de hidratos de carbono en forma de monosacáridos y disacáridos puede frenar la actividad bacteriana. De la misma forma la baja concentración puede frenar el proceso. Las concentraciones límite dependen del tipo de azúcar así como la levadura responsable de la fermentación.

- **La temperatura**

El proceso de fermentación es exotérmico, y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento en unos rangos de temperatura óptimos. Si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55°C por un tiempo de 5 minutos se produce su muerte. La Mayoría cumple su misión alrededor de la temperatura de 30°C.

- **Ritmo de crecimiento de las cepas**

Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levadura.

- **Fuentes con alto contenido de almidón**

Como por ejemplo el maíz, malta, cebada, avena, trigo, sorgo y otros. Estas fuentes deben ser tratadas previamente para obtener los azúcares fermentables. En el caso de los cereales, estos deben someterse previamente a un proceso de hidrólisis del almidón, con el fin de romper este biopolímero en azúcares fermentables que estén disponibles para los microorganismos encargados de la fermentación.

- **Fuentes ricas en celulosa**

Como la madera, residuos de pasta y el papel. Las materias primas con alto contenido de celulosa son las fuentes más abundantes de biomasa a nivel global, y su uso ha tenido un creciente interés global; sin embargo, la compleja composición química de estas fuentes ha planteado retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados [(Garzón Castaño & Londoño, s.f.)].

2.2 Técnicas de medición de etanol

Generalmente la cuantificación del etanol se basa en métodos químicos y ópticos tradicionales como cromatografía de líquidos, cromatografía de gases, reflectometría, espectroscopia, picnometría, método enzimático, entre otros. A continuación se muestra el marco teórico de los métodos utilizados en este trabajo de tesis.

2.2.1 *Reflectometría*

La luz, vista como onda electromagnética, se propaga en distintos medios con una velocidad distinta y menor que 3×10^8 m/s, la cual solo se obtiene en el vacío. Esto provoca interesantes fenómenos en la reflexión y refracción de la luz al pasar de un medio a otro

con diferentes propiedades físicas. La relación entre la velocidad de la luz en el vacío (c) y la velocidad de la luz en un medio (v), es el índice de refracción del medio (ecuación 2):

$$n = \frac{c}{v}. \quad (2)$$

Cuando un rayo de luz incide en la superficie de un material transparente, como una lámina de vidrio, la onda ve una enorme distribución superficial de átomos muy próximos entre sí que harán que se esparza la onda. Recordemos que la onda puede medir ≈ 500 nm, mientras que los átomos y las separaciones entre ellos (≈ 0.2 nm) son miles de veces más pequeños. En el caso de la transmisión a través de un medio denso, los trenes de onda se anulan mutuamente en todas las direcciones excepto en la frontal y solamente se mantiene el rayo que avanza hacia adelante. Pero esto sucede sólo cuando no hay discontinuidades. Este no es el caso de una interfaz entre dos medios transparentes diferentes (como el aire y el cristal), donde se produce una discontinuidad de salto. Cuando un haz de luz alcanza tal interfaz, siempre hay una parte de la luz que se esparce hacia atrás, y a este fenómeno se le denomina reflexión [(Hecht, 2000)].

Los materiales absorbentes tienen índice de refracción complejo $n = n' - in''$, donde n' es el índice de refracción, n'' es el índice de absorción e $i = \sqrt{-1}$. Para muestras transparentes, no absorbentes, el gradiente de la reflexión $dR/d\theta$ cambia discontinuamente en el ángulo crítico θ_c , tiende a infinito justo antes de θ_c , y cero justo después de θ_c . El efecto de absorción óptica en una muestra reemplaza la discontinuidad del gradiente por una función continua. El ángulo crítico es reemplazado por un ángulo crítico aparente θ_c^* como un punto de inflexión, donde $d^2R/d\theta^2 = 0$ y el gradiente de reflexión $dR/d\theta$ es un máximo [(Meeten, 1997)].

Los fenómenos de refracción y reflexión son ya bien conocidos y vienen dados por la ley de Snell (ecuación 3). Esta ley considera dos medios caracterizados por índices de refracción distintos, y establece la forma en como un rayo de luz varía su dirección de propagación dependiendo de la relación entre los índices de refracción. Considerando un haz de luz que incide a un ángulo θ_i con respecto a la normal de la interface entre los dos medios y sea θ_t la dirección que sigue el rayo transmitido en el segundo medio, la ley de Snell establece que

$$n_i \sin(\theta_i) = n_t \sin(\theta_t), \quad (3)$$

donde n_i y n_t corresponden a los índices de refracción de los medios en el cual se encuentra el haz incidente y el haz transmitido, respectivamente.

Supongamos que una onda monocromática plana, de un haz de luz electromagnética, incide en una superficie plana que separa dos medios isótropos. Supongamos que $\mathbf{E}$ (campo eléctrico) perpendicular al plano de incidencia y que $\mathbf{B}$ (campo magnético) sea paralelo a él (Figura 4a). Recordemos que $\mathbf{E} = v\mathbf{B}$, de modo que

$$\mathbf{k} \times \mathbf{E} = v \mathbf{B} \quad (4)$$

$$\text{y,} \quad \mathbf{k} \cdot \mathbf{E} = 0. \quad (5)$$

Entonces el coeficiente de reflexión de fresnel para el campo eléctrico transversal está dado por

$$r_{TE} \equiv \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{TE} = \frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t}, \quad (6)$$

donde r_{TE} denota el coeficiente de reflexión para la amplitud, E_{0i} es la amplitud de la onda eléctrica incidente, y E_{0r} es la amplitud de la onda eléctrica reflejada.

Ahora considerando que $\mathbf{E}$ es paralelo al plano de incidencia y $\mathbf{B}$ es perpendicular al plano de incidencia (Figura 4b). Entonces el coeficiente de reflexión de fresnel para el campo magnético transversal está dado por

$$r_{TM} \equiv \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{TM} = \frac{n_t \cos \theta_i - n_i \cos \theta_t}{n_t \cos \theta_i + n_i \cos \theta_t}, \quad (7)$$

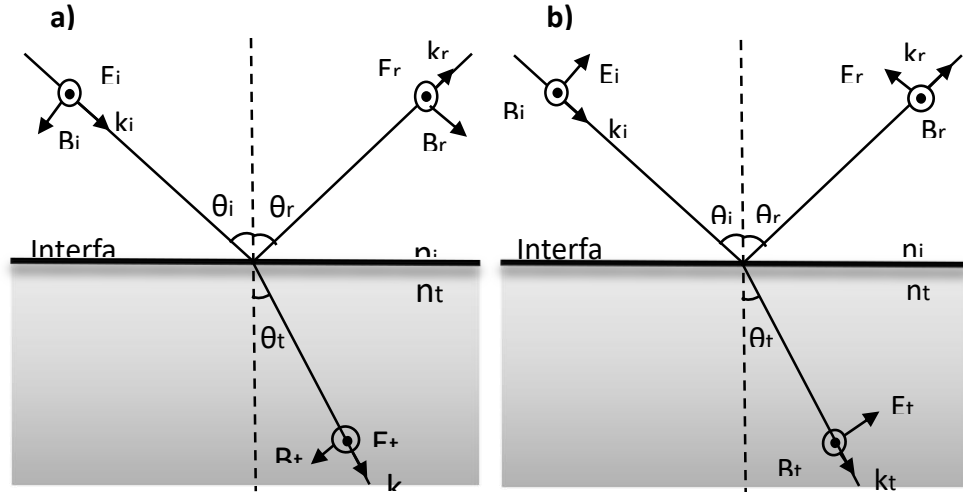


Figura 4: Onda incidente cuyo campo E es a) normal al plano de incidencia y b) paralelo al plano de incidencia

La reflectometría está basada en las ecuaciones de Fresnel (ecuación 8 y 9). La ecuación 8 corresponde a la reflectancia para el campo eléctrico Transversal (R^{TE}) al plano de incidencia y la ecuación 9 corresponde a la reflectancia para el campo magnético transversal (R^{TM}) al plano de incidencia, para un haz de luz con onda plana que va del medio 1 con índice de refracción n_1 al medio 2 con índice de refracción n_2 y entra en un ángulo θ_{int} respecto a la normal. Para el caso en que la luz es no polarizada, entonces se usa la ecuación 10 para calcular la reflectancia total.

$$R^{TE}(\theta_{int}) = \left| \frac{n_1 \cos(\theta_{int}) - n_2 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{int})}}{n_1 \cos(\theta_{int}) + n_2 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{int})}} \right|^2 \quad (8)$$

$$R^{TM}(\theta_{int}) = \left| \frac{n_2 \cos(\theta_{int}) - n_1 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{int})}}{n_2 \cos(\theta_{int}) + n_1 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(\theta_{int})}} \right|^2 \quad (9)$$

$$R(\theta_{int}) = 0.5R^{TE} + 0.5R^{TM} \quad (10)$$

Consideremos un haz de luz circular que incide en una superficie, tal y como se muestra en la Figura 5, de tal modo que se produzca una zona iluminada cuya área sea A .

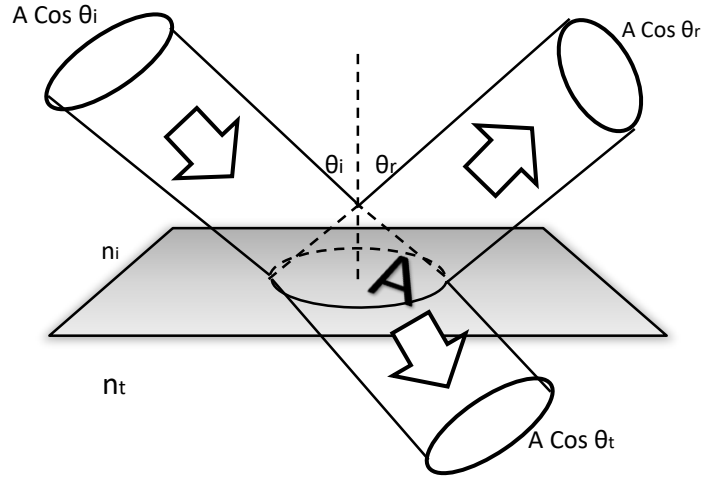


Figura 5. Reflexión y transmisión de un haz incidente.

Recordemos que la potencia por unidad de área que cruza una superficie en el vacío cuya normal es paralela a $\mathbf{S}$, el vector de Poynting, viene determinada por

$$S = c^2 \epsilon_0 E \times B \quad (11)$$

Además, la densidad de flujo radiante (W/m^2) o irradiación es entonces

$$I = \langle S \rangle_T = \frac{c \epsilon_0}{2} E_0^2 \quad (12)$$

Ésta es el promedio de energía por unidad de tiempo que cruza un área normal a $\mathbf{S}$. En el caso que nos ocupa (Figura 5) sean I_i , I_r e I_t las densidades de flujo incidente, reflejado y transmitido respectivamente, por lo que las áreas transversales de los rayos incidentes, reflejados y transmitidos serán, respectivamente, $A \cos \theta_i$, $A \cos \theta_r$ y $A \cos \theta_t$. De acuerdo con esto, la potencia incidente es $I_i A \cos \theta_i$. Ésta es la energía por unidad de tiempo que fluye en el rayo incidente y, por consiguiente, la potencia que llega a la superficie de A . Del mismo modo, $I_r A \cos \theta_r$ es la potencia del rayo reflejado. Definimos la reflectancia R como el cociente entre la potencia (o flujo) reflejada y la potencia incidente, es decir,

$$R \equiv \frac{I_r}{I_i} \quad (13)$$

El cociente I_r/I_i es igual a $(v_r \epsilon_r E_r^2/2) / (v_i \epsilon_i E_i^2/2)$ y dado que la onda reflejada y la incidente están en el mismo medio, $v_r = v_i$, $\epsilon_r = \epsilon_i$, y

$$R = r^2 \quad (14)$$

Analizando el caso de la reflexión interna ($n_i > n_t$), donde se observa algo interesante cuando θ_i es igual o más grande que θ_c , el llamado ángulo crítico. Supongamos que tenemos sumergida una fuente en un medio ópticamente denso y que permitimos que θ_i aumente gradualmente, tal y como se indica en la Figura 6.

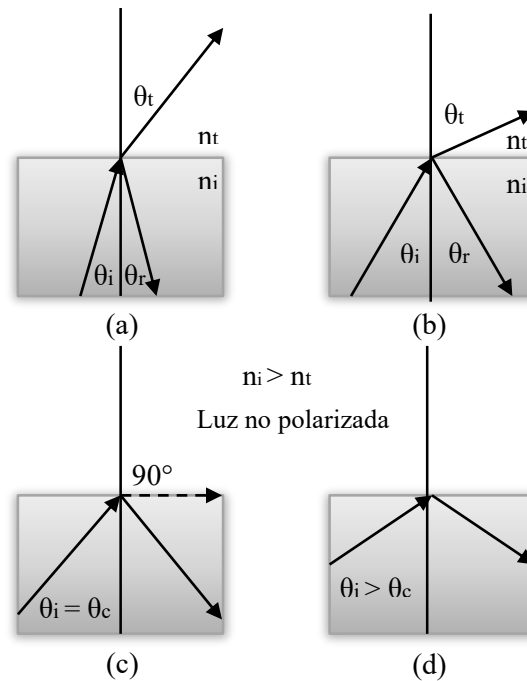


Figura 6. Reflexión interna

Así pues, al crecer θ_i , el rayo transmitido se aproxima gradualmente a la tangente con la frontera conforme lo va haciendo, una mayor cantidad de la energía disponible va apareciendo en el haz reflejado. Por último, cuando $\theta_t = 90^\circ$, el $\sin \theta_t = 1$ y

$$\sin \theta_c = n_t/n_i \quad (15)$$

Tal y como se dijo anteriormente, el ángulo crítico es ese valor especial de θ_i para el cual $\theta_t = 90^\circ$. Cuanto mayor sea n_i , menor será n_t/n_i y menor será también θ_c . Para ángulos incidentes mayores o iguales a θ_c , toda la energía incidente se refleja de nuevo hacia el medio incidente en un proceso conocido como reflexión total interna.

2.2.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

El HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Por lo general, la cronología de la cromatografía líquida se divide en tres periodos: primero, un periodo llamado “de origen”, que se ubica a principios de Siglo, cuando Tswett y Day, por separado, comenzaron a establecer las bases de la cromatografía en columna. Las primeras separaciones, con resultados positivos, por medio de métodos cromatográficos fueron llevados a cabo por Tswett en el año 1906; este botánico ruso consiguió separar algunos pigmentos coloreados de hojas de plantas utilizando una columna de alúmina.

En segundo lugar, hacia los años treinta, se asistió a un “renacimiento” de la cromatografía líquida, replanteándose las causas de la separación cromatográfica para intentar superar las limitaciones a que tanto técnicas como teóricamente se hallaba sometida, lo cual derivó de los fundamentos de los diversos tipos de cromatografía, tales como capa delgada (CCD o TLC: thinlayer chromatography), sobre papel (CP o PC: paper chromatography) y gaseosa (CG o GC: gas chromatography).

Finalmente, en 1960, cuando la cromatografía de gases asume el papel de representante más popular y analítico de todas las cromatografías, se produce una serie de investigaciones tanto en el aspecto teórico como en el desarrollo de nuevas y más perfeccionadas generaciones de equipos instrumentales, que han conducido a la cromatografía líquida a su aceptación actual de “moderna cromatografía líquida” o “cromatografía líquida de alta resolución” (*High Performance Liquid Chromatography*), cuyas siglas, HPLC, designan universalmente a esta técnica. Este último periodo es calificado como la “era tecnológica”.

En la actualidad, se da un aumento exponencial de las disponibilidades instrumentales y, sobre todo, de las aplicaciones. Incluso la teoría cromatográfica, suficientemente desarrollada, entra en el campo de la fisicoquímica para explicar a fondo los procesos columnares.

La cromatografía líquida de alta eficacia se encuentra dentro de la cromatografía de elución. En esta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en

la corriente de fase móvil, cada analito avanza a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá en un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

Es decir, existirá una propagación de la muestra en el seno de la fase móvil a lo largo de la columna, pues las fracciones separadas salen por el extremo de la misma opuesto al que llegaron inyectadas. Además existe una migración diferencial, pues no solamente se propagan, sino que unas fracciones lo hacen más rápido que otras, siendo así que todas abandonan la columna diferencialmente, en distintos tiempos.

Precisamente la migración diferencial va a ser la base de la separación cromatográfica, pues permite que las moléculas de un compuesto que avanza con más rapidez que las de otro u otros con los que estaban mezclados, se separen.

Si bien es cierto que para realizar una cromatografía líquida tan solo es necesario disponer de las fases implicadas en el proceso de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficacia, debido al pequeño diámetro de las partículas de fase estacionaria que se utilizan, requiere de la utilización de unos dispositivos que constituyen el cromatógrafo.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).
- Dispositivo de inyección.
- Conducciones y conexiones.
- Detector y registrador.
- Columna.

El esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo se muestran en la Figura 7.

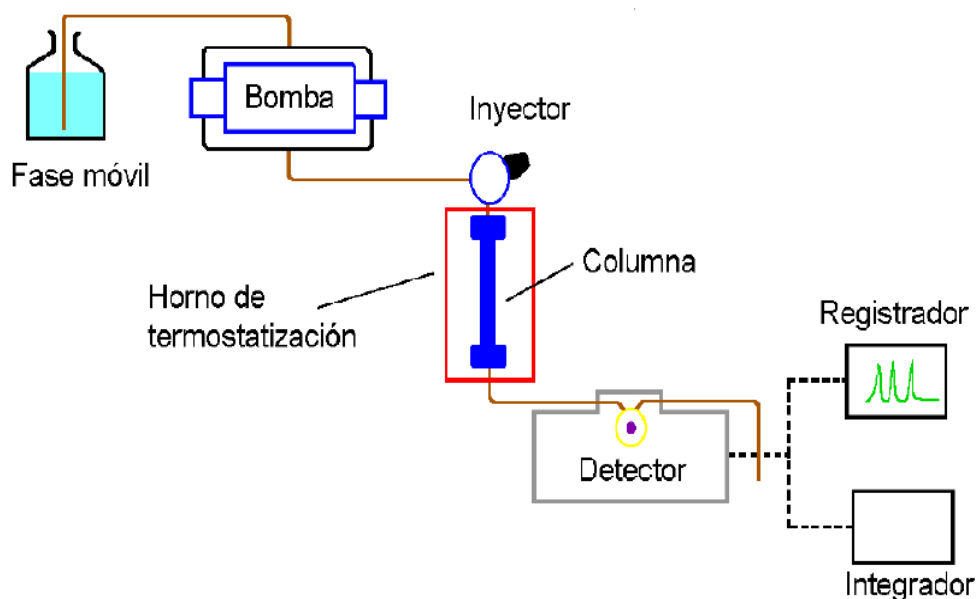


Figura 7: Esquema de un cromatógrafo de líquidos

La pregunta a formular es, ¿qué sucede dentro de la columna para que unas moléculas queden más retenidas que otras? Para contestar es preciso exponer de manera ordenada varios conceptos:

En primer lugar, la cromatografía se basa en las fuerzas competitivas de dos fases, una fija o estacionaria y otra continuamente renovada o móvil, establecen por las moléculas de un soluto. Esto se ve de manera clara si se propone el modelo físico de una extracción entre dos fases inmiscibles: si un soluto x se introduce en una ampolla de decantación en la que hay dos fases líquidas inmiscibles, se distribuirá entre ambas, en función de un equilibrio de partición dinámico (Figura 8).

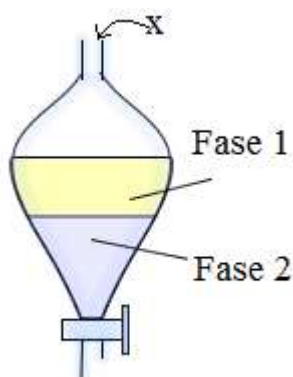


Figura 8: Equilibrio de distribución entre dos fases inmiscibles

Este quedará definido por su constante de equilibrio (ecuación 16), que no es sino la constante de reparto o coeficiente de partición.

$$k = \frac{[x]_2}{[x]_1} \quad (16)$$

Pues bien, si se dispone de una columna de modo que su contenido sea capaz de establecer fuerzas de retención hacia un soluto, a la par que un solvente que pase continuamente por dicha columna, capaz de establecer fuerzas de disolución hacia ese mismo soluto, ya que se tiene un sistema cromatográfico.

La tendencia a solubilizar las moléculas de soluto por parte del solvente, a la larga, habrá de imperar sobre las fuerzas de retención del relleno de la columna, consiguiendo, antes o después, arrastras ese soluto, disuelto, hasta salir con él al exterior de la columna, proceso que se denomina elución.

La fase interna de la columna recibe el nombre de fase fija o estacionaria; la fase líquida que supone el solvente, se llama fase móvil; y el proceso cromatográfico no es sino la competición de cada una de estas fases hacia un soluto determinado.

Pero las fuerzas de retención por parte de la fase estacionaria y las de disolución, o empleando el lenguaje cromatográfico, elución, por parte de una fase móvil, dependen de la estructura molecular, resultando que adquieren magnitudes distintas según se trate de un soluto u otro, de una fase estacionaria u otra o de una fase móvil u otra. Así, una mezcla de varias sustancias o solutos depositada en la cabeza de la columna, saldrá al final de la misma, de modo que cada componente eluirá antes o después que los otros, diferenciándose de ellos. Se trata de un proceso de migración diferencial y su consecuencia es la separación cromatográfica. Se puede anticipar que si se dispone de un detector a la salida de la columna se obtendrá información relativa a la cantidad de moléculas que salen de la columna frente al tiempo transcurrido desde la inyección [(Adrián García de Marina, 1988)].

2.2.3 *Refractometría ABBE*

El Refractómetro se utiliza para medir índices de refracción (n) de líquidos que sean transparentes o translúcidos y de sólidos, siendo el uso más frecuente con líquidos transparentes.

El índice de refracción es una importante constante óptica en las sustancias, y pueden ser utilizadas para determinar el comportamiento óptico, pureza, concentración, dispersión, etc. Es posible calcular el porcentaje de azúcar contenido en disoluciones de sacarosa en un rango de 0 a 95 grados Brix, lo que se corresponde con un índice de refracción de 1.333 a 1.531.

La refractometría es uno de los métodos más antiguos que se utiliza en el área de la óptica. El Refractómetro ABBE fue creado por Ernst Abbe en 1874, el cual describía este instrumento como constituido por dos prismas de vidrio Flint conteniendo una delgada capa de 1/20 de milímetro de espesor del líquido a examinar. Hoy en día es el instrumento más conveniente y ampliamente utilizado para medir el índice de refracción de cualquier material, principalmente líquido transparente; la Figura 9 muestra un diagrama esquemático de su sistema óptico [(Fernández, 2013)].

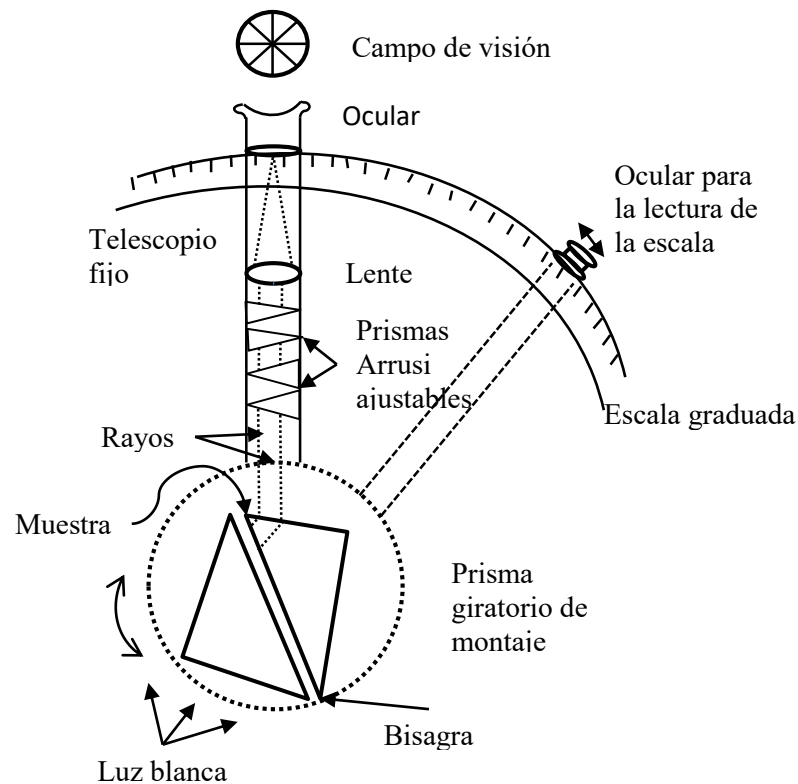


Figura 9: Diagrama esquemático del sistema óptico del refractómetro ABBE

La muestra está contenida en una capa fina (aproximadamente 0.1 mm) entre dos prismas. El prisma superior está firmemente montado sobre un cojinete que permite su rotación por medio del brazo de lodo que muestra en líneas de puntos. El prisma inferior está articulado a la parte superior para permitir la separación para la limpieza y para la introducción de la muestra. La cara inferior del prisma es áspera baja: cuando la luz se refleja en el prisma, esta superficie se convierte efectivamente en el origen de un número infinito de rayos que pasan a través de la muestra a todos los ángulos. La radiación se refracta en la interface de la muestra y la cara liza del suelo del prisma superior. Después de esto pasa dentro del telescopio fijo.

Dos prismas de Amici que se pueden girar con respecto a otro coleccionan los rayos refractados en el ángulo crítico de diferentes colores en un solo haz blanco nuevamente. El ocular del telescopio tiene una retina en forma de cruz; al hacer la calibración, el ángulo del prisma se cambia hasta la interfaz de luz-oscuridad, haciéndolo coincidir con el centro de la

cruz. Posición del prisma a continuación, se establece a partir de la escala que se fijó con la calibración.

El refractómetro ABBE es muy popular, ya que, tiene una amplia gama ($n=1.3$ a 1.7) de medición, y a que de la muestra se necesita una mínima cantidad (una gota en caso de una muestra líquida). La precisión del instrumento es de aproximadamente ± 0.0002 ; su reproducibilidad es la mitad de esta cifra. El error más grave en el instrumento de ABBE es causado por el hecho de que los rayos de acristalamiento casi se cortan por el arreglo de los prismas.

Cuando un rayo de luz llega a la superficie de separación entre dos medios distintos, parte de la luz se refleja y otra se refracta (entra en el interior del segundo medio), propagándose este último con un ángulo y una velocidad diferente al del primer medio. Estas dos magnitudes se pueden caracterizar mediante el índice de refracción, que es un valor característico para cada sustancia.

El índice de refracción está relacionado con la masa, la carga y el número de partículas de la sustancia a través de la cual se transmite la radiación luminosa. Los refractómetros pueden ser de distintos tipos pero la mayoría se basan en el mismo principio.

El principio básico de un refractómetro está acorde con la ley de Refracción o ley de Snell (ecuación 3). Cuando un haz luminoso pasa de un medio ópticamente más denso a otro ópticamente más ligero, el ángulo de incidencia es menor que el ángulo de refracción y, si cambiamos el primero hasta que el segundo llegue a ser de 90° , en este caso el ángulo de incidencia le llamamos ángulo crítico. El principio de este refractómetro para determinar el índice de refracción se basa en determinar el ángulo crítico [(Zuzi, 2004)].

Cuando el haz luminoso cae sobre la superficie AB desde cualquier ángulo (Figura 10), su ángulo de refracción es siempre mayor que i . Si observamos el haz emergente a través del telescopio, aparece el campo visual dividido en dos mitades, una oscura y otra clara. Si situamos la línea que delimita las dos mitades justo en el centro hallamos la posición del ángulo crítico. ABCD es el prisma de refracción cuyo índice de refracción es n_2 . Sobre la superficie AB se coloca la muestra a medir (líquido o sólido transparente) cuyo índice de refracción es n_1 .

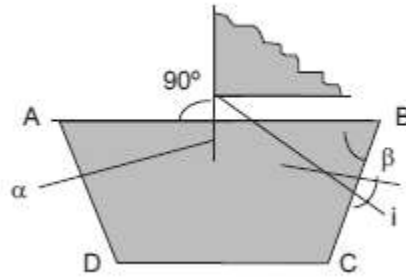


Figura 10: Ángulo crítico

Por la ley de Refracción obtendremos la siguiente ecuación:

$$n_1 \sin(90^\circ) = n_2 \sin(\alpha) \quad (17)$$

$$n_2 \sin(\beta) = \sin(i) \quad (18)$$

$$\phi = \alpha + \beta \quad (19)$$

Poniendo esto en la ecuación 13 tenemos:

$$n_1 = n_2 \sin(\alpha - \beta) = (\sin \phi \cos \beta - \cos \phi \sin \beta) \quad (20)$$

$$n_2^2 \sin^2 \beta = \sin^2 i \quad (21)$$

$$n_2^2 (1 - \cos^2 \beta) = \sin^2 i \quad (22)$$

$$n_2^2 - n_2^2 \cos^2 \beta = \sin^2 i \quad (23)$$

$$\cos \beta = \sqrt{\frac{n_2^2 - \sin^2 i}{n_2^2}} \quad (24)$$

$$n_1 = \sin \phi \sqrt{n_2^2 - \sin^2 i} - \cos \phi - \sin i \quad (25)$$

El ángulo de refracción ϕ y el índice de refracción n_2 del prisma son conocidos, luego al conocer al ángulo crítico i , podemos conocer el índice de refracción de la muestra.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

En el presente capítulo se presenta el material y equipo utilizado para la elaboración del trabajo experimental necesario para la realización de este trabajo de tesis. Así como la metodología correcta a seguir para el cumplimiento eficaz del proceso experimental llevado a cabo.

3.1 Equipo y material utilizado

Equipo	Material
• Campana de flujo laminar	• Vaso de precipitado (100 ml)
• pH-metro (Navich, pH/COND METER F-54 BW)	• Levadura tradipan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
• Bascula (Explorer Pro, DHAUS)	• Matraz volumétrico (1000 ml)
• Parrilla magnética (I R 6100 Infrared Stirring Hot Plate)	• PDB (Potato Dextrose Broth) (marca Difco)
• Centrifugadora (Velab)	• Viales de plástico (50 ml)
• Controlador de temperatura (ver anexo A)	• Tubos de vidrio con tapadera (10 ml)
• Autoclave (Kitlab)	• Pipetas
• Bomba de vacío	• Papel aluminio
• Mechero	• Recipiente de aluminio (1.5 L)
	• Alcohol etílico (95 %)
	• Filtros (Glass Microfibre filters GF/A, Cat No. 1820-047, Whatman)
	• Agua destilada
	• Dextrosa (marca Difco)
	• Guantes

3.2 Preparación de muestras

3.2.1 Preparación de muestras para calibración de etanol y glucosa en agua

Se preparan muestras de glucosa (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g dl⁻¹) y alcohol etílico (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 ml dl⁻¹), diluido en agua destilada para el análisis y caracterización del equipo. Con el objetivo de medir los cambios en el índice de refracción debido a concentraciones conocidas de glucosa y etanol.

3.2.2 Preparación de muestras para fermentación controlada

A continuación se muestra el procedimiento y cuidados para la realización de una fermentación controlada, usando el medio de cultivo PDB y la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) Tradipan.

Preparación y esterilización del material

Pesar 18 g de PDB y 57 g de dextrosa, colocarlos en el matraz volumétrico (1000 ml) y agregar 750 ml de agua destilada, con esto se obtiene una solución con una concentración de 100 g/l de dextrosa aproximadamente. A continuación se agita hasta disolver la dextrosa y el PDB, para tener una solución homogénea, se recomienda calentar la solución para facilitar la disolución. Se utiliza este volumen de solución, para dejar un espacio vacío del matraz volumétrico, que servirá para el dióxido de carbono, producido durante la fermentación.

Medir el pH de la solución, el valor medido debe de rondar alrededor de 5.5. Este valor es el pH adecuado para la sobrevivencia, crecimiento y reproducción de la levadura. Tapar el matraz con un tapón de algodón y colocarlo en el auto clave, junto con el vaso de precipitado, viales (uno para cada muestra), tubos de vidrio (uno para cada muestra) y pipetas. Las pipetas previamente se envuelven en papel aluminio, dos pipetas por cada muestra a tomar, y una más, que se utilizará, al momento de tomar la solución para la activación de la levadura.

Una vez que se tenga todo el material en el auto clave, se calienta hasta 121°C durante 15 minutos. Por último se deja enfriar para poder usar el material.

Limpiar con alcohol etílico la campana de flujo laminar, superficie y paredes, esto para desinfectar el área de trabajo. Además se recomienda remover todo material o insumo que no se utilice dentro de la campana. Finalmente se enciende el motor de la campana.

Activación de la levadura

Colocar el 10% del volumen de operación de la solución previamente esterilizada en el vaso de precipitado, y calentarlo a 35°C aproximadamente, después se colocan 7.7 g de levadura liofilizada y se agita por unos minutos. Si todo está bien, se debe de crear espuma, esto nos indica que la levadura se ha activado satisfactoriamente.

Todo el procedimiento se lleva a cabo dentro de la campana de flujo laminar encendida, al mismo tiempo debe de estar cerca y encendido el mechero, además se debe usar guantes, para evitar contaminación externa del ambiente.

Inicio de la fermentación

Una vez activada la levadura, se agrega a la solución total del matraz volumétrico. En este momento se inicia la fermentación. El matraz se coloca en el recipiente de aluminio y se mantiene en agitación constante, al igual que se controla a una temperatura de 30°C aproximadamente, a baño maría, esta temperatura se controla mediante el controlador de temperatura elaborado con arduino (ver anexo A), los 30°C es la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de la levadura. En la Figura 11 se muestra el sistema de la fermentación controlada.

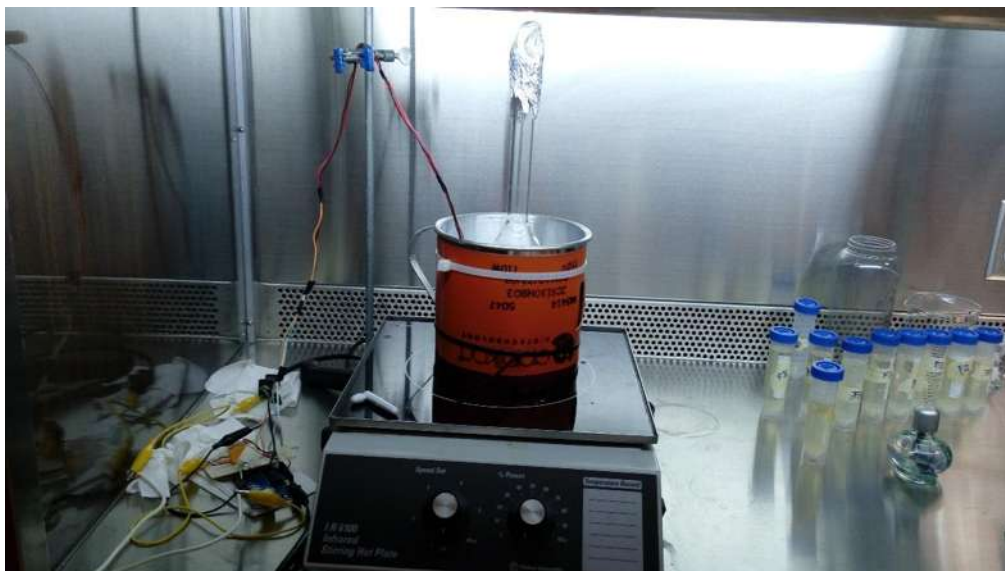


Figura 11: Arreglo experimental para la fermentación controlada

Toma de muestra

Una vez iniciada la fermentación, inmediatamente se prosigue a tomar la primera muestra, con la ayuda de una pipeta previamente esterilizada, se toman 50 ml de solución, con el cuidado de evitar que la pipeta toque cualquier superficie al momento de tomar la muestra. Se usa una pipeta por cada muestra. La solución se coloca en los recipientes de la centrifugadora, los cuales se centrifugan a 10000 rpm/15 min. Posteriormente se filtran mediante una unidad de filtrado con diámetro de membrana de 1.6 μm . Una vez filtrada, se colocan alrededor de 3 ml, en un tubo de vidrio esterilizado, y el resto en uno de los viales de plástico. El tubo con los 3 ml, se coloca inmediatamente en el congelador, para su posterior análisis en HPLC. La solución del vial, es medida en el dispositivo de reflectometría cerca del ángulo crítico. Posteriormente se toman muestras cada hora, y se hace el mismo procedimiento anteriormente descrito, teniendo el cuidado de colocar una etiqueta a cada muestra.

3.3 Calibración y medición de Reflectometría cerca del ángulo crítico

Experimentalmente se obtiene la reflectancia de un haz de luz en el rango UV-Visible (177 – 888 nm), en función del ángulo de incidencia θ_{int} , usando el dispositivo experimental que se muestra en la Figura 12. En este dispositivo es posible medir el espectro de reflexión de soluciones líquidas. La muestra líquida es colocada en un contenedor de plástico unido a un prisma de vidrio semi-cilíndrica SK7 de tal manera que la muestra está directamente en contacto con el prisma. La luz es emitida por una fuente de luz (Fiber Optic Illuminator, Model 190, Dolan-Jenner, Industries Lawrence, Ma 01843), esta luz pasa por una lente positiva, la lente colima la luz, y por ultimo pasa por un diafragma antes de llegar al prisma de vidrio. Una vez que la luz entra en el prisma semi-cilíndrico, está se refleja de la interface prisma-solución líquida. Posteriormente la luz sale, y es captada por una fibra óptica, que se mueve linealmente para poder hacer un escaneo discreto, y por último la luz es enviada a un espectrofotómetro (Ocean-Optics USB4000-XR1-ES), el cual envía la señal a la computadora para poder ser analizada. La reflectancia se realizó cerca del ángulo crítico, para poder calibrar con agua destilada. Y posteriormente calcular el índice de refracción para cada muestra.

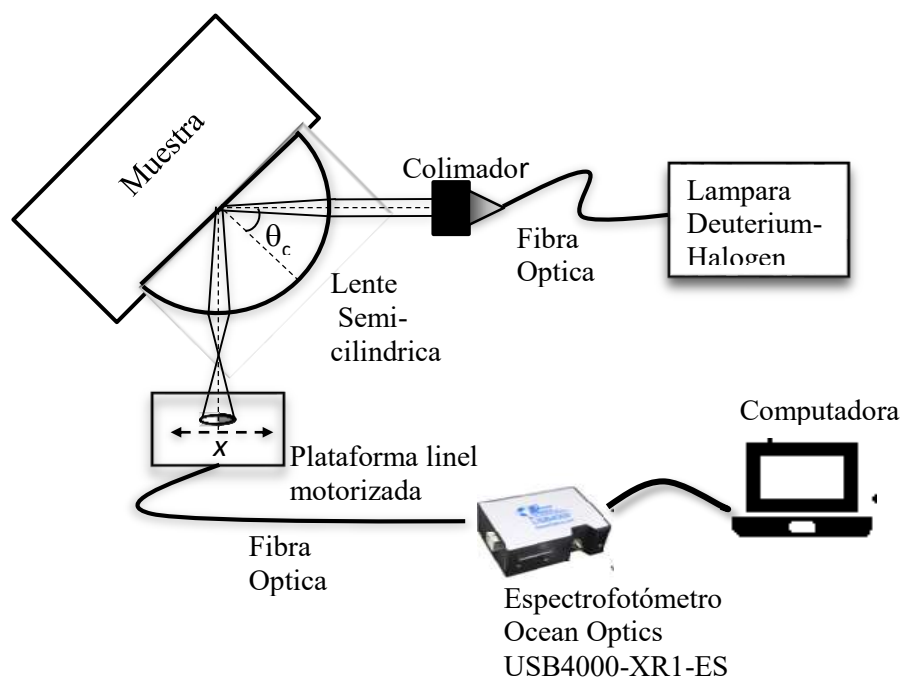


Figura 12: Arreglo experimental de la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico

En la Figura 13 se muestra la configuración de un haz de luz que incide en un prisma semi-cilíndrico, y que se refleja debido a la interface prisma-solución líquida.

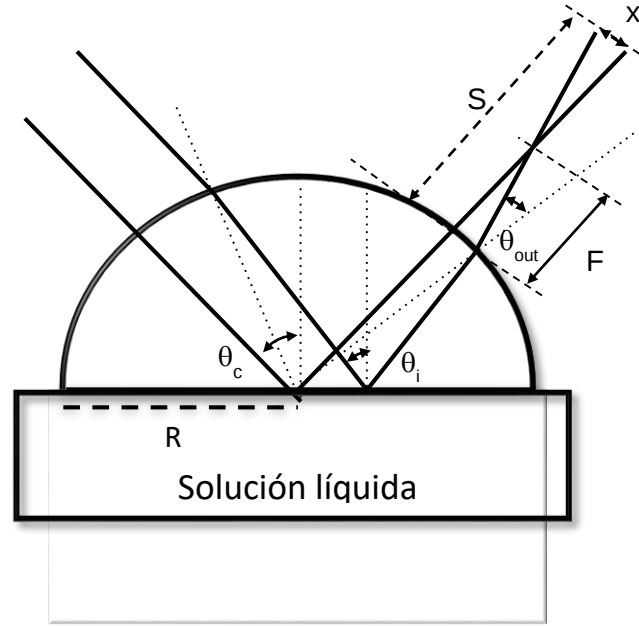


Figura 13: Configuración de un haz de luz que incide en un prisma semi-cilíndrico

Haciendo un análisis geométrico de la configuración del haz de luz que entra en el prisma (Figura 13). Considerando la suma de ángulos interiores de los triángulos ABC (ecuación 22) y CDE (ecuación 23) de la Figura 14.

$$\theta_{int} + \alpha + \theta_y = 180 \quad (22)$$

$$\theta_c + \theta_y + \theta_x = 180 \quad (23)$$

Restando 23 a 22 y despejando θ_{int} , tenemos

$$\theta_{int} = \theta_c + \theta_x - \alpha \quad (24)$$

donde,

$$\theta_x = \sin^{-1}\left(\frac{d}{R}\right) \quad (25)$$

$$\alpha = \sin^{-1}\left(\frac{\sin(\theta)}{n_1}\right) \quad (26)$$

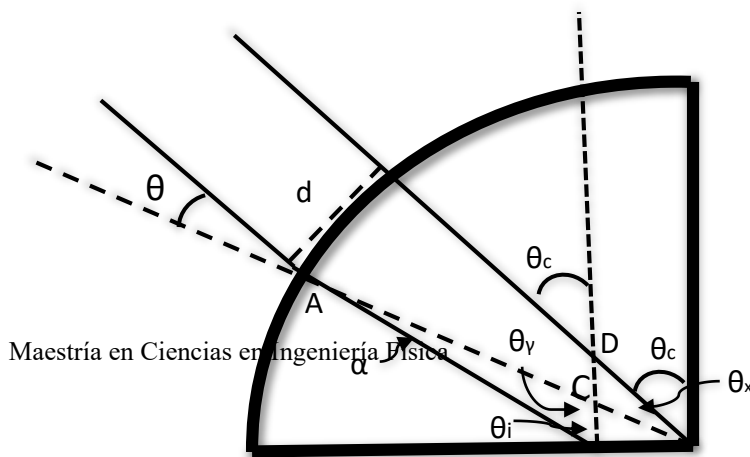


Figura 14: Configuración de rayos incidentes en un prisma semi-cilíndrico

Por lo tanto

$$\theta_{int} = \theta_c + \sin^{-1}\left(\frac{d}{R}\right) - \sin^{-1}\left(\frac{\sin(\theta)}{n_1}\right) \quad (27)$$

Ahora podemos calcular θ_{int} en términos del desplazamiento lineal x , considerando θ como θ_{out} (Figura 13) y colocando d en términos de x . De la Figura 15a se observa que

$$\tan \varepsilon = \frac{d}{f} \quad (28)$$

$$y \quad \tan \varepsilon = \frac{x}{s-f} \quad (29)$$

Por lo tanto

$$d = \frac{xf}{s-f} \quad (30)$$

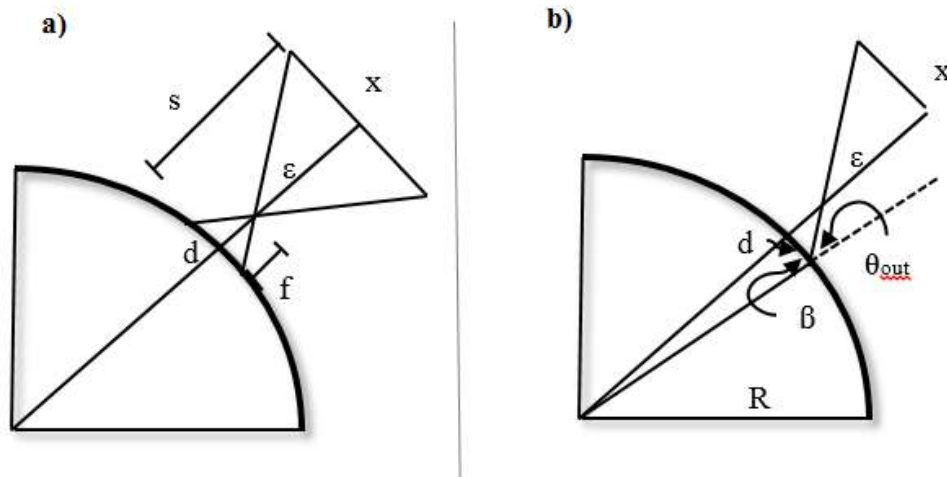


Figura 15: Trazo geométrico de la luz saliente del prisma semi-cilíndrico

Falta poner θ_{out} en términos de x . De la Figura 15b se observa que,

$$\theta_{out} = \varepsilon + \gamma \quad (31)$$

donde,

$$\varepsilon = \sin^{-1} \frac{x}{s-f} \quad (32)$$

$$\gamma = \frac{\pi}{2} - \cos^{-1} \frac{x f}{R(s-f)} \quad (33)$$

Sustituyendo 30, 32 y 33 en 27 se encuentra que

$$\theta_{int}(x) = \theta_c + \sin^{-1} \left(\frac{x f}{R(s-f)} \right) - \sin^{-1} \left(\frac{\sin\left(\frac{\pi}{2} + \sin^{-1}\left(\frac{x}{s-f}\right) - \cos^{-1}\left(\frac{x f}{R(s-f)}\right)\right)}{n_1} \right) \quad (34)$$

Donde θ_c es el ángulo crítico, R ($= 2$ cm) es el radio del prisma, F ($= 1$ cm) es la distancia focal del prisma, S ($= 5.7$ cm) es la distancia del prisma al punto de observación. Para pequeños cambios de la posición ($\Delta x = 50$ μ m), corresponde a pequeños cambios en el ángulo ($\Delta\theta_i$), como se muestra en la ecuación 35.

$$\Delta\theta_i(x) = \frac{d\theta_i}{dx} \Delta x \quad (35)$$

El espectrofotómetro mide la intensidad de luz reflejada en la muestra. Primero se mide la intensidad de luz del aire (I_{air}) y del agua destilada (I_{agua}), que corresponden a colocar el recipiente vacío y el recipiente con agua respectivamente, después se mide la intensidad de luz de la muestra ($I_{muestra}$). Para cada muestra se miden varios puntos, que corresponden a los pasos lineales de “x”, el desplazamiento se realiza con un sistema controlador de paso (Pollux Drive Type 123, Micos). Al inicio y al final de cada medida se mide también el espectro oscuro (I_{oscuro}), que corresponde a la medida del espectrofotómetro cuando no hay luz incidente.

Una vez que se tienen las intensidades del aire, agua y de todas las muestras, usamos la ecuación 36, para calcular la reflectancia.

$$R = \frac{I_{muestra} - I_{oscuro}}{I_{air} - I_{oscuro}} \quad (36)$$

A la gráfica de reflectancia del agua contra la posición, se le calcula la derivada discreta, al valor máximo de la derivada se le llama valor crítico. A esté valor se le asigna el ángulo crítico, calculado de la ley de Snell (ecuación 3). El ángulo crítico (θ_c) corresponde al valor

de θ_i , cuando $\theta_t=90^\circ$ respecto a la normal. Para el índice de refracción del vidrio [(RefractiveIndex.INFO, 2016)], y para el índice de refracción del agua [(Daimon & Masumura, 2007)], correspondiente a cada longitud de onda usada.

Una vez, asignado el valor del ángulo crítico, se calcula $\Delta\theta$ de la ecuación 35, para poder hacer el cambio de coordenadas, de posición a grados. Entonces se suman y restan al ángulo crítico, los pasos angulares ($\Delta\theta$) correspondientes para cada longitud de onda. De esta manera, se obtiene la gráfica de reflectancia del agua contra la posición angular.

La calibración del sistema, se realiza ajustando la ecuación 10, a los datos de la reflectancia vs posición angular del agua, mediante el programa mathematica, considerando complejo el índice de refracción de la solución. En ajuste consiste en ajustar el índice de refracción del agua a los datos experimentales, por lo que, se modifica el eje de las abscisas, correspondiente a los grados, para obtener el índice de refracción del agua [(Daimon & Masumura, 2007)] dado para cada longitud de onda. Se puede hacer la modificación de la escala angular, debido a que las mediciones experimentales son discretas, y el ángulo crítico puede estar entre dos de los puntos medidos.

Se hace el cambio de la escala angular obtenida del ajuste del agua, a todas las gráficas de las muestras medidas. Después se le aplica el ajuste a cada una de las muestras, por lo que, se obtendrá el índice de refracción debido a cada muestra. Una vez, que se tenga el índice de refracción ($n_{muestra}$) para cada muestra, se usa la ecuación (37), donde usamos cualquier par de longitudes de onda, para obtener un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas. La ecuación 37 corresponde a la variación del índice refracción, debido a que las muestras contiene dos elementos (glucosa y etanol). De esta manera, al resolver el sistema, se obtendrá la concentración de dextrosa (C_G) y la concentración de etanol (C_E).

$$n_{muestra}(\lambda) = n_{agua}(\lambda) + \frac{dn_E}{dC_E}(\lambda) C_E + \frac{dn_G}{dC_G}(\lambda) C_G \quad (37)$$

Donde dn/dC es la derivada del índice de refracción respecto a la concentración [(Sobral & Peña-Gomar, 2015)], dadas por las ecuaciones 38 y 39, del etanol y la dextrosa respectivamente. Y n_{agua} es el índice de refracción del agua.

$$\frac{dn_E}{dC_E}(\lambda) = (4.58 \pm 0.04)10^{-4} + (2.5 \pm 0.6)10^{-8}\lambda \quad (38)$$

$$\frac{dn_G}{dC_G}(\lambda) = (1.38 \pm 0.003)10^{-3} + \frac{(10 \pm 2)}{\lambda^2} + \frac{(9.8 \pm 2)10^5}{\lambda^4} \quad (39)$$

La calibración del sistema consiste en hacer el cambio de las coordenadas lineales a coordenadas angulares del eje de las abscisas, de los datos de reflectancia vs posición lineal, obtenidos experimentalmente, usando la interfaz agua destilada-prisma semicircular. Para esto, primeramente se calcula la derivada discreta angular de la reflectancia en la longitud de onda de 589 nm, al valor máximo de la derivada se le asigna el valor del ángulo crítico del agua ($\theta_c=61.5287^\circ$), con ayuda de la ecuación 35 se calcula los pasos angulares ($\Delta\theta$) correspondientes y, se le asignan a cada paso lineal. Una vez que se tiene el eje de las abscisas en grados, se prosigue a realizar el ajuste con la ecuación de fresnel (ecuación 10). El ajuste (Anexo B) arroja el índice de refracción complejo, la parte real del índice de refracción debe de ser 1.33326 (Daimon & Masumura, 2007) para el agua destilada en 589 nm a 21°C. Si el resultado del ajuste es un valor distinto, se necesita hacer un reajuste en la escala angular. Realizando pequeños pasos a la derecha o izquierda, según corresponda. Esto se puede realizar debido a que las mediciones son discretas, el punto crítico no pudiera corresponder con el ángulo crítico. En la Figura 16 se presenta la gráfica de los puntos experimentales del agua junto con el ajuste para la longitud de onda de 589 nm, además se muestra el ángulo crítico correspondiente.

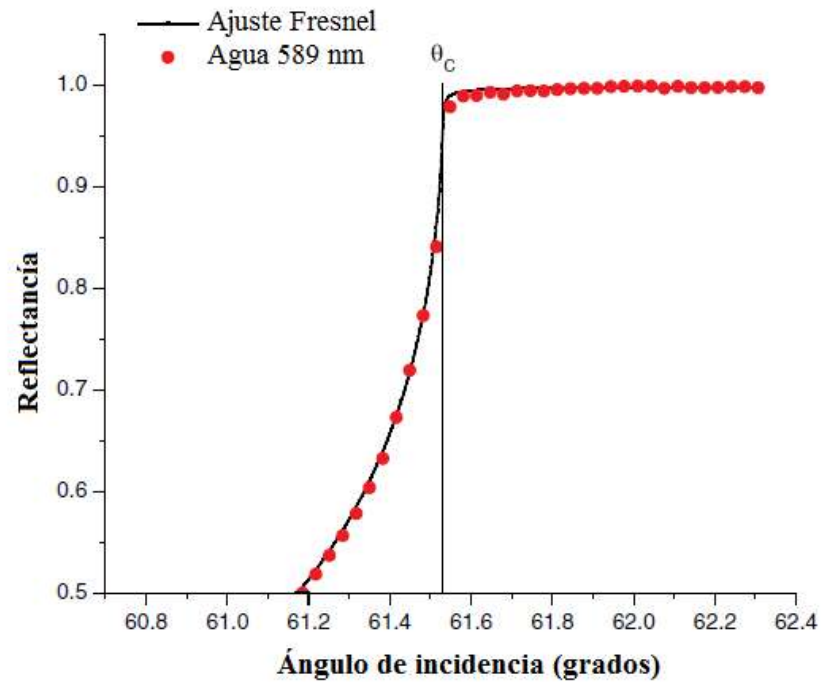


Figura 16: Gráfica de los puntos experimentales del agua y el ajuste de la ecuación de Fresnel para 589 nm

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

El interés principal de este trabajo de tesis fue determinar la capacidad de medición de la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico, para determinar en forma simultánea la concentración de glucosa y etanol en una fermentación controlada. Para obtener las concentraciones de glucosa y etanol, primeramente se calibra el sistema, realizando una comparación entre la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico y la técnica convencional ABBE, de muestras preparadas con concentraciones conocidas de etanol y glucosa. Posteriormente se ajustan las curvas de reflectancia obtenidas de las muestras de la fermentación controlada para obtener el índice de refracción de cada muestra. Finalmente usando el índice de refracción de al menos dos longitudes de onda y la ecuación 37 podemos encontrar la concentración de etanol y glucosa de cada muestra.

4.1 Curvas de calibración con Abbe y reflectometría cerca del ángulo crítico

Como ya se mencionó el refractómetro de Abbe permite obtener una medida del índice de refracción, principalmente de muestras líquidas, éste es un instrumento convencional utilizado ampliamente. Por esta razón se realizará una comparación de medidas de este refractómetro, con la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico utilizada en este trabajo.

En la Figura 17 se muestra una comparación del índice de refracción medido con refractómetro Abbe y la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico, las mediciones se realizaron para muestras líquidas con distintas concentraciones de glucosa (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g dl⁻¹) y etanol (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 ml dl⁻¹), diluidas en agua destilada. Como se puede ver en la Figura 17a, ambos resultados, tienen un comportamiento similar. Mostrando

una relación lineal entre el índice de refracción y la concentración de glucosa, de igual manera se muestra la gráfica del ajuste lineal con una pendiente de 1.42×10^{-3} . En la Figura 17b, se observa un comportamiento lineal similar para las concentraciones de etanol, mostrando el ajuste lineal con pendiente de 4.7×10^{-4} .

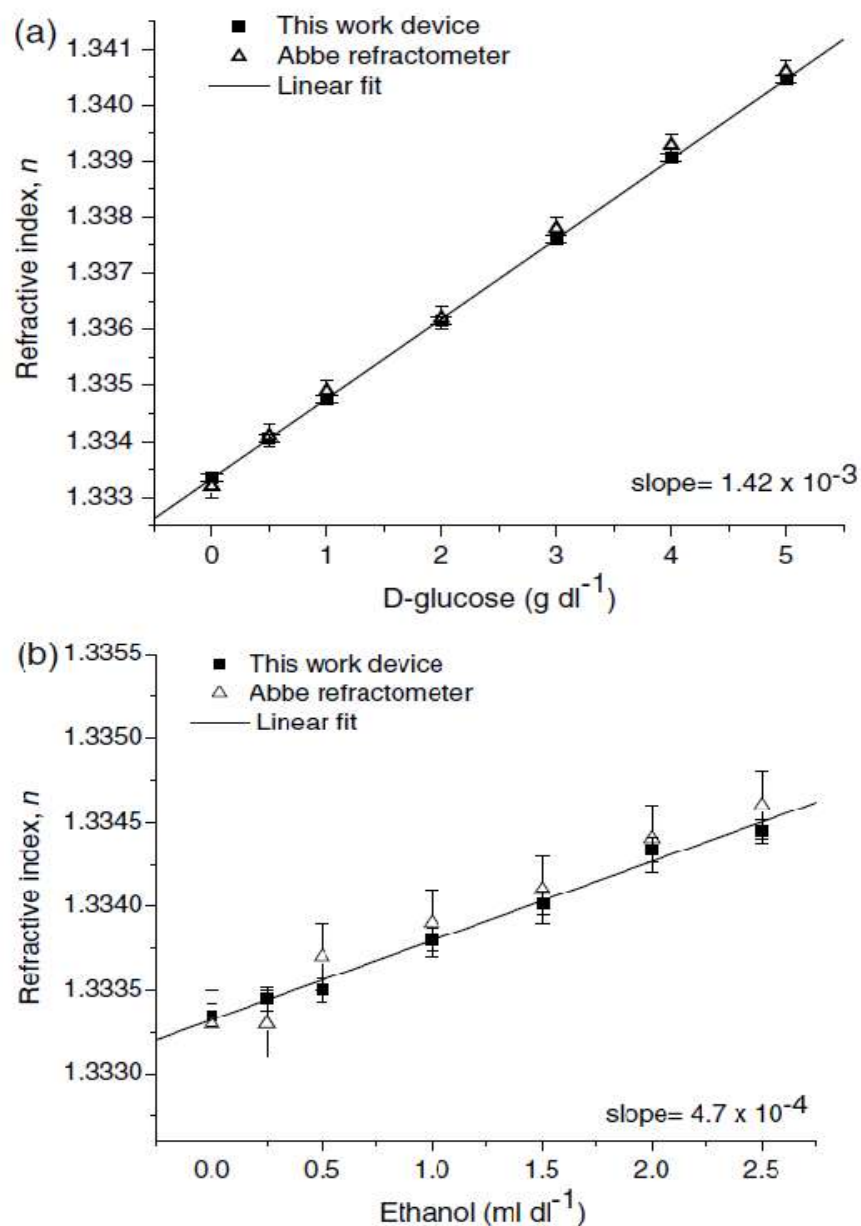


Figura 17: Comparación del índice de refracción obtenido a 589nm con un refractómetro ABBE y el reflectómetro cerca del ángulo crítico de la a) glucosa y b) etanol (Sobral & Peña-Gomar, 2015)

Observando que este comportamiento es lineal para las concentraciones de glucosa y etanol utilizados en este trabajo, podemos usar la ecuación 37, para calcular la concentración de glucosa y etanol. El comportamiento lineal es similar al publicado en la literatura (Figura 2 y Figura 3).

Como ya se menciona la calibración del sistema consiste en hacer el cambio de las coordenadas lineales a coordenadas angulares del eje de las abscisas, de los datos de reflectancia vs posición lineal, obtenidos experimentalmente, usando la interfaz agua destilada-prisma semicircular. De tal manera que se obtenga en el ajuste el índice de refracción del agua correspondiente, el ajuste y ángulo crítico se muestra en la Figura 16.

4.2 Variación de etanol y glucosa con la concentración

Posteriormente se realizan medidas de muestras preparadas de glucosa y etanol en agua destilada. En la Figura 18 se presentan las curvas experimentales de la reflectancia para mezclas de agua destilada y con distintas concentraciones de glucosa (0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g dl^{-1}), para la longitud de onda de 589 nm, de la figura se puede observar que a menor concentración de glucosa, la curva de reflectancia se desplaza a la izquierda (ángulos menores), corriéndose a la curva del agua.

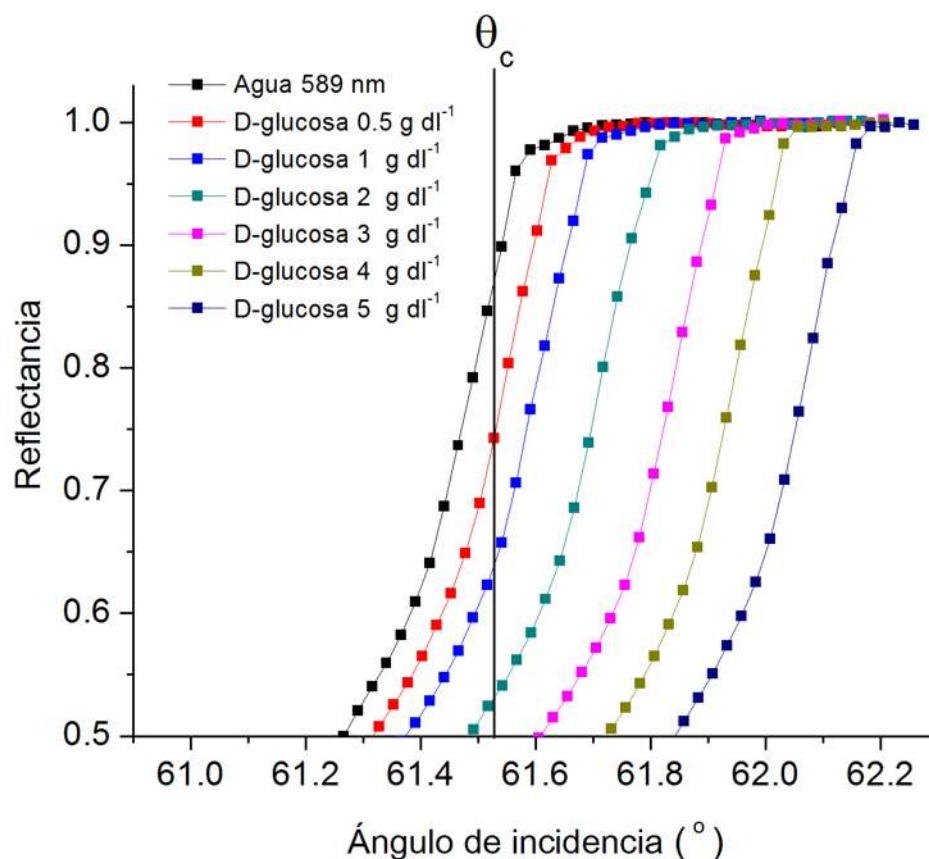


Figura 18: Reflectancia vs. ángulo de incidencia (°) de mezclas agua destilada y concentraciones de glucosa

En la Figura 19 se presentan las curvas experimentales de la reflectancia para mezclas de agua destilada y con distintas concentraciones de etanol (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 ml dl⁻¹), para la longitud de onda de 589 nm, de la figura se puede observar que a menores concentración de etanol, la curva de reflectancia se desplaza a la izquierda (ángulos menores), corriéndose de igual manera que la curva de la glucosa hacia la curva del agua.

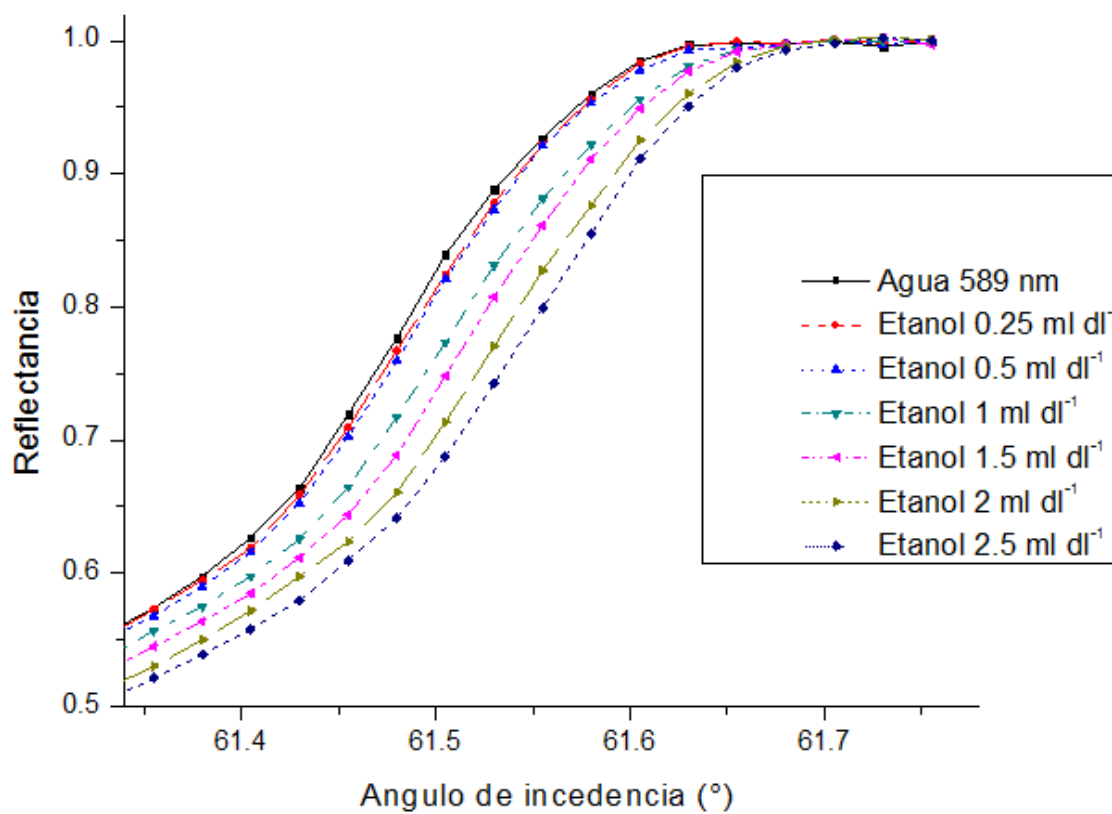


Figura 19: Reflectancia vs. ángulo de incidencia (°) de mezclas de agua destilada y concentraciones de etanol

4.3 Fermentación

De una fermentación controlada se tomaron muestras a 0, 1, 2, 3, 4, 5.5, 7, 9, 11, 18.5 y 20 horas (tabla 1), con el objetivo de monitorear el proceso de fermentación. La muestra E1 corresponde a tomar la muestra antes de colocar la levadura, y E2 es la muestras obtenida inmediatamente después de colocar la levadura. Todas las muestras son centrifugadas y filtradas. Se congelan aproximadamente 6 ml para posteriormente medirlas con HPLC.

Tabla 1: *Tabla de las muestras obtenidas de la fermentación controlada*

MUESTRA	TIEMPO (HRS)
E1	0
E2	0
E3	1
E4	2
E5	3
E6	4
E7	5.5
E8	7
E9	9
E10	11
E11	18.5
E12	20

Una vez que se tiene la escala de los grados en la posición correcta, se grafica la reflectancia de todas las muestras (Figura 20), se observa que entre más tiempo se lleva a cabo la fermentación, las gráficas se corren hacia la curva del agua, lo que implica que el índice de refracción disminuye.

Haciendo un ajuste de la ecuación de la reflectancia a cada una de las muestras, se obtiene los índices de refracción de cada curva, para longitudes de onda de 486, 589, 644, 706 nm, los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: *Índices de refracción de las muestras obtenidas de la fermentación controlada, mediante la técnica de reflectometría cerca del ángulo crítico.*

MUESTRA	TIEMPO (HRS)	LONGITUD DE ONDA			
		486 nm	589 nm	644 nm	706 nm
E1	0	1.34946	1.34506	1.34341	1.34214
E2	0	1.34968	1.34515	1.34352	1.34223
E3	1	1.34865	1.34433	1.34275	1.34152
E4	2	1.34728	1.34272	1.34114	1.33987
E5	3	1.34614	1.3417	1.34017	1.33878
E6	4	1.34501	1.34054	1.33901	1.33762

E7	5.5	1.3436	1.33931	1.33781	1.33631
E8	7	1.34164	1.33738	1.33592	1.33457
E9	9	1.34143	1.33718	1.33566	1.33409
E10	11	1.34116	1.33706	1.33546	1.33408
E11	18.5	1.34135	1.33725	1.33577	1.33426
E12	20	1.3413	1.33719	1.33572	1.33421

En la gráfica 20 se muestran las curvas de las muestras obtenidas de la fermentación controlada, se observa que ha mayor transcurso del tiempo durante la fermentación, la curva se desplaza hacia la izquierda, aproximándose a la curva del agua. Por lo que nos indica que el índice de refracción está disminuyendo.

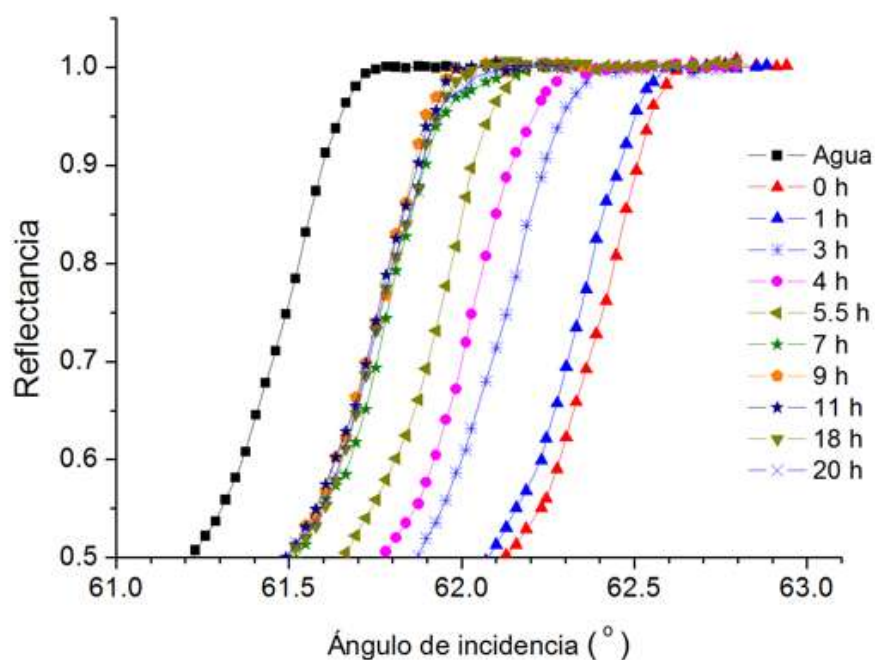


Figura 20: Reflectancia de muestras de una fermentación controlada a 589 nm

4.4 HPLC y RAC

Usando dos de los índices de refracción obtenidos del ajuste para cada muestra (tabla 2), y la ecuación 37, se obtendrá un sistema de ecuaciones de dos ecuaciones con dos incógnitas (C_G y C_E). Resolviendo los distintos pares de ecuaciones posibles para la misma muestra, se obtendrán seis valores para C_G y seis valores para C_E , para los cuales se calculará el promedio. Los resultados obtenidos del proceso se muestran en la tabla 3. En la misma tabla se muestran los resultados de las concentraciones de glucosa y etanol obtenidos con el HPLC

Tabla 3: Concentración de glucosa y etanol obtenido por HPLC y reflectometría, para las muestras de la fermentación controlada.

MUESTRA	TIEMPO (HRS)	HPLC		REFLECTOMETRÍA CERCA DEL ÁNGULO CRÍTICO	
		Glucosa (g/L)	Etanol (g/L)	Glucosa (g/L)	Etanol (g/L)
E1	0	*	*	82.27	-8
E2	0	83.76	0	**	**
E3	1	*	*	73.6	3.85
E4	2	66	13.69704	**	**
E5	3	53.12	21.52392	50.57	21
E6	4	44.32	24.80616	40.41	27.43
E7	5.5	26.48	29.16144	29.75	30.54
E8	7	13.52	34.14792	16.98	28.16
E9	9	7.84	37.99824	11.72	38.73
E10	11	7.2	40.58616	10.19	38.76
E11	18.5	6.4	38.94504	10.33	43.61
E12	20	6.4	39.70248	11.83	37.9

*Muestra no medida con HPLC, **Muestra mal medida por reflectometría

En la Figura 21 se muestra la gráfica de la concentración de glucosa (g/L) y etanol (g/L) vs tiempo (hrs), obtenido por HPLC y por reflectometría cerca del ángulo crítico, de la fermentación controlada.

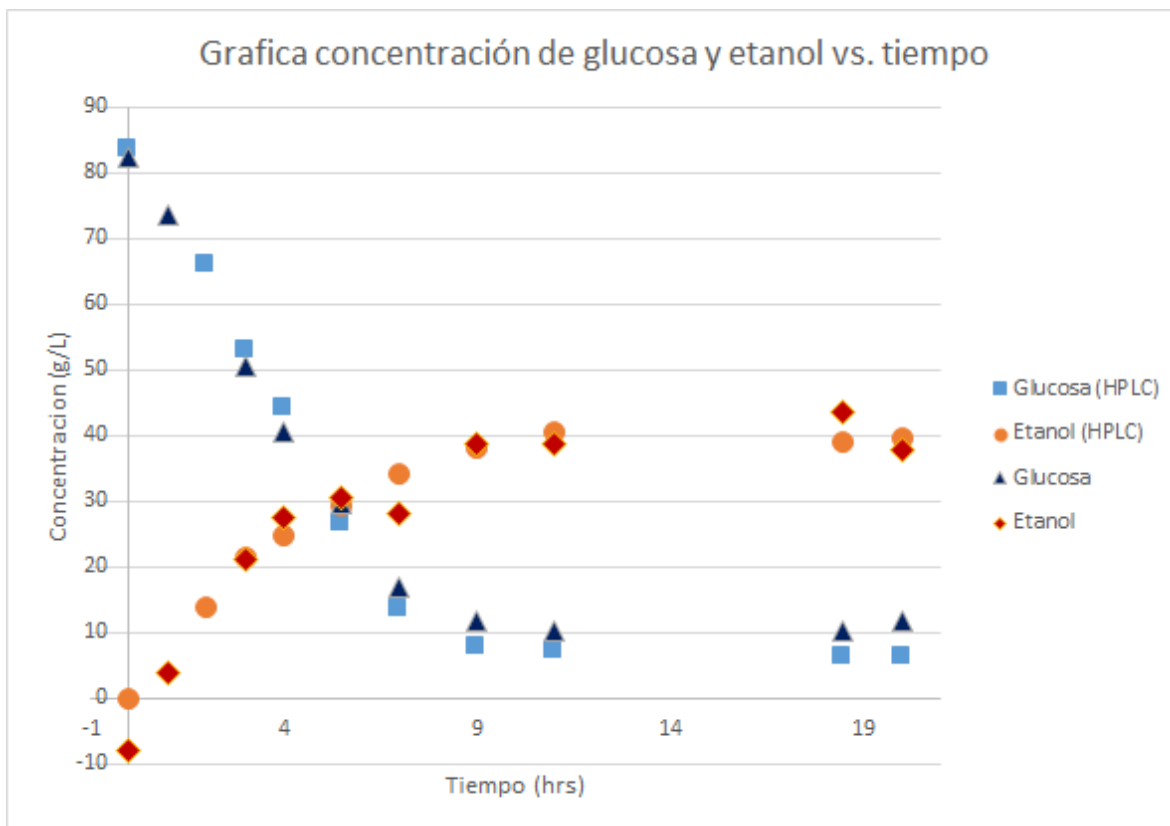


Figura 21: Concentración de glucosa y etanol vs. tiempo

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se usó la técnica de reflectometría espectroscopía cerca del ángulo crítico para determinar la concentración de etanol y glucosa en un proceso de fermentación controlado. Se analizaron las curvas de la reflectancia en un rango espectral de 320 a 1000 nm. Para la fermentación se utilizó la levadura *sacharomisses cerevisiae* y dextrosa () durante 20 horas a 30°C. Las curvas de calibración de la concentración de la glucosa y etanol en agua fueron utilizadas para obtener el índice de refracción diferencial para varias longitudes de onda para determinar la concentración de glucosa y etanol en el sistema de fermentación. Simultáneamente se analizaron las muestras con la técnica HPLC obteniendo una tendencia similar en la cinetica de la concentración de glucosa y etanol. La curva de reflectancia de concentración de etanol y glucosa se corre ángulos mayores que corresponden a un incremento del índice de refracción. Las curvas de calibración de la concentración de glucosa y etanol en agua destilada fueron utilizadas para obtener el índice de refracción diferencial y se utilizó la ecuación () para dos pares de longitudes de onda, para la determinación de la concentración de glucosa y etanol en la fermentación controlada. En la figura 4.4 se muestra los resultados de la curva cinética de los resultados de la técnica reflectometria cerca del ángulo crítico y la técnica HPLC, en la cual se muestra mucha similitud en el comportamiento. Por lo tanto el método de Reflectometria cerca del ángulo crítico se puede usar para realizar un seguimiento en el proceso de fermentación controlada.

ANEXO A

Arduino es una plataforma de hardware libre, basada en una placa con un microcontrolador y un entorno de desarrollo, diseñada para facilitar el uso de la electrónica en proyectos multidisciplinarios.

El hardware consiste en una placa con un microcontrolador Atmel AVR y puertos de entrada y salida. El software consiste en un entorno de desarrollo que implemente el lenguaje de programación Processing/Wiring y el cargador de arranque que es el ejecutado en la placa. Se programa en el ordenador para que la placa controle los componentes electrónicos.

Arduino puede tomar información del entorno a través de sus entradas analógicas y digitales, puede controlar luces, motores y otros actuadores. El microcontrolador en la placa Arduino se programa mediante el lenguaje de programación Arduino (basado en Wiring) y el entorno de desarrollo Arduino (basado en Processing). Los proyectos hechos con Arduino pueden ejecutarse sin necesidad de conectar a un ordenador.

También cuenta con su propio software que puede descargar en su página oficial que ya incluye los drivers de todas las tarjetas disponibles, lo que hace más fácil la carga desde el computador [ard].

Con ayuda de la tarjeta Arduino Uno, se elaboró un controlador de temperatura. El cual sirvió para controlar la temperatura de la fermentación controlada, elaborada en este trabajo de tesis. La temperatura se controla alrededor de los 30°C.

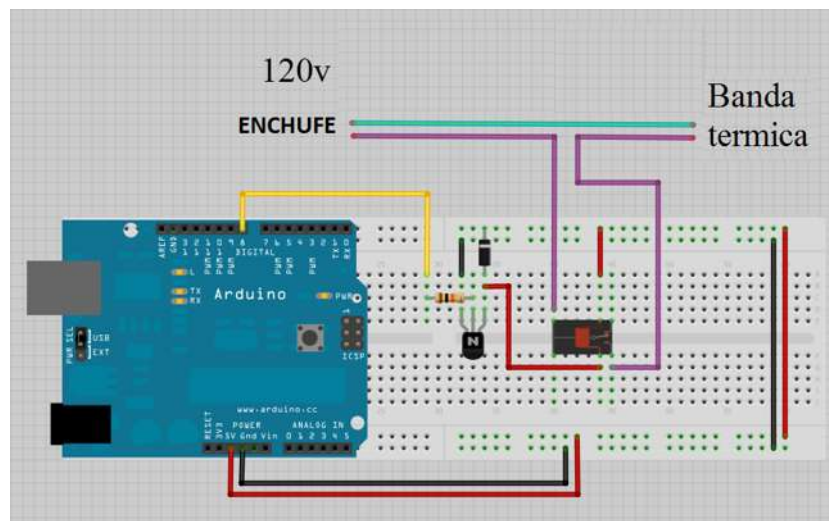


Figura A.1: Esquema del controlador de temperatura elaborado con Arduino.

Para la elaboración del controlador de temperatura (Figura A.1) se necesita el siguiente material:

- 1 Placa Arduino Uno
- 1 Protoboard
- 1 Banda térmica
- 1 Reley (Sun Hold Ras-0610)
- 1 Resistencia 10 kohms
- 1 Transistor BC548
- 1 Diodo

El código de programación para el controlador de temperatura se presenta a continuación.

```
/*Programa para controlar temperatura (120v)
*/
```

```
int reley=8;
```

```
float tempC;
int tempPin = 1;
```

```
void setup()
{
  pinMode(reley,OUTPUT);
  Serial.begin(9600);
  pinMode(13, OUTPUT);
}
```

```
void loop()
{
  tempC = analogRead(tempPin);
  tempC = (5.0*tempC*100.0)/1024.0;
  Serial.print(tempC);
  Serial.println();
  delay(1000);
```

```
  if(tempC < 27)
  {
    digitalWrite(reley,HIGH);
    digitalWrite(13, HIGH);
  }
```

Anexo

```
if(tempC > 28)
{
    digitalWrite(reley,LOW);
    digitalWrite(13, LOW);
}
```

```
// digitalWrite(reley,HIGH);
// delay(10000);
// digitalWrite(reley,LOW);
// delay(10000);
}
```

ANEXO B

Programa de Mathematica para calcular el índice de refracción de agua (o de cualquier sustancia líquida). En este caso se está calculando para la longitud de onda de 589 nm

$$R[x_] := \left(\frac{1}{2} \right) \left(\text{Abs} \left[\frac{\left(np \cos \left[x * \frac{Pi}{180} \right] - (ns + I n) \sqrt{1 - \left(\frac{np}{(ns + I n)} \right)^2 \left(\sin \left[x * \frac{Pi}{180} \right] \right)^2} \right)}{\left(np \cos \left[x * \frac{Pi}{180} \right] + (ns + I n) \sqrt{1 - \left(\frac{np}{(ns + I n)} \right)^2 \left(\sin \left[x * \frac{Pi}{180} \right] \right)^2} \right)} \right] \right)^2 + \left(\frac{1}{2} \right) \left(\text{Abs} \left[\frac{\left((ns + I n) \cos \left[x * \frac{Pi}{180} \right] - np \sqrt{1 - \left(\frac{np}{(ns + I n)} \right)^2 \left(\sin \left[x * \frac{Pi}{180} \right] \right)^2} \right)}{\left((ns + I n) \cos \left[x * \frac{Pi}{180} \right] + np \sqrt{1 - \left(\frac{np}{(ns + I n)} \right)^2 \left(\sin \left[x * \frac{Pi}{180} \right] \right)^2} \right)} \right] \right)^2$$

(*Reflectancia total (ecuación 2.9)*)

agua589a= Import["Documentos/Resultados Tesis/F/agua589a.dat"]; (*Importación del archivo agua589a.dat, que consiste en los datos medidos experimentalmente de la reflectancia y la posición en grados*)

np=1.5167; (*Indice de refracción del vidrio (lente) en 589 nm*)

Print["agua 589 a"]

Ragua589a=FindFit[agua589a,R[x],{{ns,1.333},{n,0.009}},x]

Show[ListPlot[{agua589a},PlotStyle->

PointSize[Medium]],Plot[{R[x]/.Ragua589a},{x,60.0,62.5}]] (*Se gráfica y se calcula el índice de refracción del agua*)

ANEXO C

Programa para determinar la concentración de glucosa y etanol, para el programa de Mathematica.

```

KE[λ_] := 4.58 × 10^-4 + 2.5 × 10^-8 λ
KG[λ_] := 1.38 × 10^-3 + 10 / λ^2 + (9.8 × 10^5) / λ^4

Longitud de onda y indice de refraccion del agua

M = {{486, 1.33734}, {546, 1.33468}, {589, 1.33326}, {644, 1.33167}, {656, 1.33137}, {706, 1.33024}, {780, 1.32882}};

Nombre de la muestra y el indice de refraccion correspondiente

Mf0a = {{f0486a, 1.34941}, {f0546a, 1.34648}, {f0589a, 1.34674}, {f0644a, 1.34335}, {f0656a, 1.34338},
{f0706a, 1.34194}, {f0780a, 1.34089}};
Mf1b = {{f1486b, 1.34814}, {f1546b, 1.34537}, {f1589b, 1.3439}, {f1644b, 1.34235}, {f1656b, 1.34205},
{f1706b, 1.34091}, {f1780b, 1.33964}};
Mf2b = {{f2486b, 1.34644}, {f2546b, 1.34369}, {f2589b, 1.34225}, {f2644b, 1.34063}, {f2656b, 1.34043},
{f2706b, 1.33928}, {f2780b, 1.33792}};
Mf3b = {{f3486b, 1.34525}, {f3546b, 1.34254}, {f3589b, 1.34103}, {f3644b, 1.33942}, {f3656b, 1.33916},
{f3706b, 1.3381}, {f3780b, 1.33669}};
Mf4c = {{f4486c, 1.34378}, {f4546c, 1.34104}, {f4589c, 1.33961}, {f4644c, 1.33797}, {f4656c, 1.33763},
{f4706c, 1.33562}, {f4780c, 1.33503}};
Mf5c = {{f5486c, 1.34183}, {f5546c, 1.33915}, {f5589c, 1.33776}, {f5644c, 1.33615}, {f5656c, 1.33578},
{f4706c, 1.33456}, {f5780c, 1.33306}};
Mf6c = {{f6486c, 1.3411}, {f6546c, 1.33848}, {f6589c, 1.33687}, {f6644c, 1.33533}, {f6656c, 1.33499},
{f6706c, 1.33374}, {f6780c, 1.33235}};

f0 (0 hrs)

For[i = 1, i < 8, i++, For[j = 1, j < 8, j++, If[i ≠ j, If[i < j, Print[Mf0a[[i]][[1]], "-", Mf0a[[j]][[1]]];
Print[Solve[KE[M[[i]][[1]]] / 10 CE + KG[M[[i]][[1]]] / 10 CG + M[[i]][[2]] == Mf0a[[i]][[2]] &&
KE[M[[j]][[1]]] / 10 CE + KG[M[[j]][[1]]] / 10 CG + M[[j]][[2]] == Mf0a[[j]][[2]], {CE, CG}]]]]]]

f1 (1 hrs)

```

El programa continua, como tantas muestras se tengan.

REFERENCIAS

- Adrián García de Marina, B. d. C., 1988. *Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Cátedra de Técnicas Instrumentales*. Madrid : Limusa.
- Alarcon-Oseguera, F., Peña-Gomar, M., F. Castillo, A. G.-V. & Perez, E., 2009. On the characterization of a random monolayer of large particles from coherent optical reflectance. *SPIE*.
- Anon., n.d. <http://www.eurotherm.es/industries/life-sciences/applications/fermentation/>. [Online].
- Antonius, J. A. v. M. et al., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Springer*.
- Becerra Perez, L. A., n.d. La industria del etanol en Mexico. *ECONOMIAUNAM*.
- Behera, S., Mohanty, R. & Ray, R., 2012. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 22 immobilized in luffa cylindrical. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Cavinato, A., Mayes, D., Ge, Z. & Callis, J., 1990. Noninvasive Method for Monitoring Ethanol in Fermentation Processes Using Fiber-Optic Near-Infrared Spectroscopy. *American Chemical Society*.
- Chang-Martinez, T. O., Peña-Gomar, M. C. & Viramontes-Gamboa, G., 2009. Laser reflectometry near the critical angle for the analysis of chemical reaction. *SPIE*.
- Chartchalerm, I.-N.-A. et al., 2007. Appropriate Technology for Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. *EXCILI Journal*.
- da Silva, G., de Araújo, E., Silva, D. & Guimaraes, W., 2005. Etanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Daimon, M. & Masumura, A., 2007. Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. *Optical So.*
- das Neves, M. A., Kimura, T., Shimizu, N. & Shiiba, K., 2006. Production of Alcohol by Simultaneous Saccharification and Fermentation of lowgrade Wheat Flour. *Brazilian archives of biology and technology an international journal*.
- das Neves, M. A., Kimura, T., Shimizu, N. & Shiiba, K., 2006. Production of Alcohol by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Low-grade Wheat Flour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Fernández, F. G., 2013. *Determinación de etanol en productos alimenticios por métodos ópticos*, Morelia: UMSNH.

García-Valenzuela, A., Peña-Gomar, M., García-Segundo, C. & Flander-Aburto, V., 1998. Dynamic reflectometry near the critical angle for high-resolution sensing of the index of refraction. *ELSEVIER*.

Hecht, E., 2000. *Optica*. Madrid: Addison Wesley.

J. Raty, E. K. K.-E. P., 1997. The complex refractive index measurement of liquids by a novel reflectometer apparatus for the UV-visible spectral range. *IOP science*.

Jia Rong Zhao, X. G. H. J. H. C., 2009. A fresnel-reflection-based fiber sensor for simultaneous measurement of liquid concentration and temperature. *AIP*.

Meeten, G. H., 1997. Refractive index errors in the critical-angle and the Brewster-angle methods applied to absorbing and heterogeneous materials. *IOPscience*.

Padín González, C. & Díaz Fernandez, M., 2009. Fermentación alcohólica del lactosuero por *kluveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes.. *Sociedad Venezolana de Microbiología*.

Peña-Gomar, M. C., Castillo, F. & García-Valenzuela, A., 2006. Coherent optical reflectance from a monolayer of large particles adsorbed on a glass surface. *Optical Society of America*.

Peña-Gomar, M. C. & García-Valenzuela, A., 2000. Reflectivity of a gaussian beam near the critical angle with external optically absorbing media. *Optical Society of America*.

RefractiveIndex.INFO, 2016. *Refractive index database*. [Online]
Available at: refractiveindex.info/lagacy/?group=SCHOTT&material=N-SK7

Sanchez Perez, C. & Garcia Valenzuela, A., 2012. Apectroscopic refractometer for transparent and absorbing liquids by reflection of white light near the critical angle. *AIP*.

Sobral, H. & Peña-Gomar, M., 2015. Determination of the refractive index of glucose-ethanol-water mixtures using spectroscopic refractometry near the critical angle. *appliedoptics*.

Tejeda, L. P. et al., 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de la cáscara de naranja y piña. *Educación en ingeniería*.

Vazquez, H. & Dacosta, O., n.d. Fermentación alcohólica: Una opinión para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *INGENIERÍA*.

Vazquez, H. J. & Dacosta, O., 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícola.. *INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII*.

wikipedia, 2015. *Fermentation-Wikipedia*. [Online]
Available at: http://es.wikipedia.org/wiki/Fermentaci%C3%B3n_alcoh%C3%B3lica

Yeh, Y.-L., 2008. Real time measurement of glucose concentration and average refractive index using a laser interferometer. *ELSEVIER*.

Zuzi, 2004. *Manual Refractómetro ABBE. modelo 315.*, s.l.: s.n.

